

Untersuchungen zur Lyse und Rückführung bakterieller Biomasse als Medienbestandteil in den Fermentationsprozess

DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
an der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Dipl.-Ing. (FH) Markus Blaesen
geboren am 11. Mai 1977
in Vechta

Dezember 2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Oktober 2003 bis Dezember 2006 am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld.

Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn PD Dr. Karl Friehs danke ich für seine fachliche Unterstützung, für die Gesprächsbereitschaft und die vielen hilfreichen Tipps.

Herrn PD Dr.-Ing. Ralf Takors danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe Fermentationstechnik möchte ich für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre, die über den gesamten Zeitraum herrschte, danken. Die regelmäßig abgehaltenen abendlichen Hefeseminare halfen mir sehr die Gedanken auf andere Dinge zu lenken; sie werden mir immer in guter Erinnerung bleiben. Mein besonderer Dank gilt Chefingenieur Thomas Schäffer - einem Mitglied der alten Lemgoer Schule - für die Hilfe bei allen technischen Problemen und Eberhardt Wünsch, dem Herren über meine Gele.

Dr. Joe Max Risse und Dr. Carsten Voss danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich Barbara Teichner für die hundertfachen Elementaranalysen und Angela Ehrlich für die zahlreichen Bestimmungen des Aminosäurespektrums danken.

Meinem gesamten Freundeskreis danke ich für die vielen schönen Aktivitäten und Urlaube.

Gianna möchte ich für ihre Geduld, Liebe und fortwährende Unterstützung in allen Situationen danken.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern Anne und Ferdinand, ohne deren nicht nur finanzielle Unterstützung ich diese Arbeit nie hätte anfertigen können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel der Arbeit	2
2	Theoretischer Hintergrund	4
2.1	Mikrobielle Biomasseabfälle und deren Entsorgung	4
2.2	Alternative Wege zur Verwendung mikrobieller Biomasseabfälle	5
2.3	Zusammensetzung bakterieller Biomasse	9
2.4	Zellaufschlussverfahren für den industriellen Maßstab	11
2.4.1	Zellaufschluss und dessen Messung	13
2.4.2	Hochdruckaufschluss	13
2.4.3	Chemische Hydrolyse	15
2.4.4	Autolyse	16
2.5	Projektbeschreibungen	19
2.5.1	Bedeutung von Aminosäuren	19
2.5.2	Die essentielle Aminosäure <i>L</i> -Threonin	20
2.5.3	Klassifizierung von Proteasen	23
2.5.4	Quellen für die Proteasegewinnung	24
2.5.5	Eigenschaften der alkalischen Proteasen	25
2.5.6	Einsatz der alkalischen Proteasen	26
3	Material	28
3.1	Geräte	28
3.2	Chemikalien	29
3.3	Bakterienstämme	32
3.3.1	<i>Klebsiella planticola</i>	32
3.3.2	<i>Escherichia coli</i> B-3996	32
3.3.3	<i>Bacillus licheniformis</i> P300	33
3.4	Medien und Stammhaltung	33
3.4.1	Medien zur Kultivierung von <i>Klebsiella planticola</i>	33
3.4.2	Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> B-3996	34
3.4.3	Medien zur Kultivierung von <i>Bacillus licheniformis</i> P300	35

3.4.4	Stammhaltung.....	37
3.5	Bioreaktoren	37
4	Methoden.....	42
4.1	Kultivierungsparameter	42
4.2	Zellernte	43
4.3	Fermentationsanalytik.....	44
4.3.1	Übersicht	44
4.3.2	Bestimmung der optischen Dichte	45
4.3.3	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration.....	45
4.3.4	Bestimmung der Zellzahldichte	47
4.3.5	Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität	47
4.3.6	Enzymatische Glucose- und Saccharosebestimmung	47
4.3.7	Bestimmung der Glycerinkonzentration	47
4.3.8	DNS-Methode zur Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Zuckern ..	48
4.3.9	<i>L</i> -Threonin-Nachweis durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	50
4.3.10	Bestimmung der α -Aminogruppenkonzentration.....	54
4.3.11	Bestimmung der Proteaseaktivität.....	56
4.3.12	Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes	57
4.3.13	Proteinbestimmung mit dem modifizierten Bradford-Test	58
4.3.14	Qualitativer Proteinnachweis mittels Disk-SDS-PAGE	59
4.3.15	Qualitativer Nukleinsäurenachweis.....	61
4.4	Lyseverfahren	62
4.4.1	Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab	63
4.4.2	Lysatherstellung für Kultivierungen	64
4.5	Lysanalytik	64
4.5.1	Proteinbestimmung mit dem modifizierten Bradford-Test	65
4.5.2	Bestimmung der Feststoffkonzentration	65
4.5.3	Bestimmung der Acetatkonzentration.....	65
4.5.4	Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes	66
4.5.5	Bestimmung des Aminosäurespektrums	66
4.5.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	66
4.5.7	Qualitativer Proteinnachweis mittels Disk-SDS-PAGE	67

5	Ergebnisse und Diskussion - <i>Klebsiella planticola</i>	68
5.1	Fermentationen zur Biomassegewinnung auf TB-Medium	68
5.2	Lyseversuche	72
5.2.1	Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes.. für die <i>Klebsiella planticola</i> -Zellen bei Verwendung des Hochdruckhomo-	72
	genisators.....	
5.2.2	Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH.....	74
5.2.3	Enzymatische Lyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation der	
	Enzymkonzentration.....	76
5.2.4	Alkalische und saure Hydrolyse ganzer Zellen.....	77
5.2.5	Alkalische und saure Hydrolyse nach Hochdruckaufschluss.....	80
5.2.6	Zusammenfassende Betrachtung der Lyseversuche.....	82
5.3	Fermentationen von <i>Klebsiella planticola</i> auf einem halbsynthetischen Medium	84
5.4	Bilanzierungen für die Fermentationen von <i>Klebsiella planticola</i> auf einem halbsynthetischen Medium	91
5.5	Lysatanalytik	99
5.6	Fermentationen mit Lysat	107
5.7	Zusammenfassung	116
6	Ergebnisse und Diskussion - <i>Escherichia coli</i> B-3996	118
6.1	Fermentationen zur Biomassegewinnung	118
6.2	Lyseversuche	118
6.2.1	Autolyse ganzer Zellen unter Variation des pH.....	118
6.2.2	Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes.. für die <i>Escherichia coli</i> -Zellen bei Verwendung des Hochdruckhomogenisators...	120
6.2.3	Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH.....	123
6.2.4	Enzymatische Lyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation der	
	Enzymkonzentration.....	124
6.2.5	Enzymatische Lyse ohne Hochdruckaufschluss	127
6.2.6	Enzymatische Lyse mittels zweier Enzyme nach Hochdruckaufschluss	127
6.2.7	Alkalische und saure Hydrolyse ganzer Zellen.....	128
6.2.8	Alkalische und saure Hydrolyse nach Hochdruckaufschluss.....	131

6.2.9	Zusammenfassende Betrachtung der Lyseversuche.....	132
6.3	Fermentationen von <i>Escherichia coli</i> B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160	135
6.4	Bilanzierungen für die Fermentationen von <i>Escherichia coli</i> B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160.....	143
6.5	Lysatanalytik	151
6.6	Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat	157
6.7	Rückführung der Biomasse über mehrere Zyklen.....	169
6.8	Zusammenfassung.....	173
7	Ergebnisse und Diskussion - <i>Bacillus licheniformis</i> P300	175
7.1	Biomassegewinnung	175
7.2	Lyseversuche.....	176
7.2.1	Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes.. für die <i>Bacillus licheniformis</i> -Zellen bei Verwendung des Hochdruckhomo-	177
7.2.2	Autolyse unter Variation des pH.....	178
7.2.3	Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH - Teilversuch 1... 180	180
7.2.4	Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH - Teilversuch 2... 182	182
7.2.5	Alkalische Hydrolyse ganzer Zellen	183
7.2.6	Zusammenfassende Betrachtung der Lyseversuche.....	186
7.3	Kultivierungen auf dem Produktionsmedium.....	188
7.4	Bilanzierungen für die Fermentationen von <i>Bacillus licheniformis</i> P300 auf dem KF-Medium	201
7.5	Lysatherstellung und -analytik	209
7.6	Kultivierungen mit Lysat.....	216
7.6.1	Ersatz des Maisquellwassers durch Zelllysat.....	216
7.6.2	Teilersatz des Sojapeptons	223
7.7	Zusammenfassung.....	232
8	Zusammenfassung.....	235
9	Literaturverzeichnis.....	242
10	Anhang.....	255

10.1	Formelzeichen.....	255
10.2	Griechische Formelzeichen.....	256
10.3	Indices.....	256
10.4	Abkürzungen	257
10.5	Aminosäurenomenklatur nach IUPAC.....	258
10.6	Tabellen	260
11	Lebenslauf	262
12	Publikationen	263

1 Einleitung

Bei der industriellen Herstellung von biotechnischen Massenprodukten wie Enzymen oder Aminosäuren treten für den Fall, dass die Biomasse nicht das gewünschte Produkt darstellt, Biomassenabfälle auf. In der Praxis existieren für deren Entsorgung verschiedene betriebliche Strukturen.

Seit dem 27. September 1994 ist im Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Beseitigung von Abfällen (Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz) die Förderung der Kreislaufwirtschaft zur Schonung der natürlichen Ressourcen und die Sicherung der umweltverträglichen Beseitigung von Abfällen vorgeschrieben. Nach § 4 sind Abfälle generell zu vermeiden, insbesondere durch die Verminderung ihrer Menge und Schädlichkeit. Darüber hinaus sollen solche Abfälle stofflich verwertet oder zur Gewinnung von Energie zu genutzt werden. Eine geeignete Maßnahme zur Vermeidung von Abfällen ist insbesondere die anlageninterne Kreislaufführung und die abfallarme Produktgestaltung. Die stoffliche Verwertung beinhaltet die Substitution von Rohstoffen durch das Gewinnen von Stoffen aus Abfällen (sekundäre Rohstoffe) sowie die Nutzung der stofflichen Eigenschaften der Abfälle für den ursprünglichen Zweck oder für andere Zwecke mit Ausnahme der unmittelbaren Energierückgewinnung. Eine stoffliche Verwertung liegt vor, wenn nach einer wirtschaftlichen Betrachtungsweise, unter Berücksichtigung der im einzelnen Abfall bestehenden Verunreinigungen, der Hauptzweck der Maßnahme in der Nutzung des Abfalls und nicht in der Beseitigung des Schadstoffpotentials liegt. In § 5 werden die Grundpflichten der Kreislaufwirtschaft genannt. Es heißt hier u. a., dass die Verwertung von Abfällen Vorrang vor deren Beseitigung hat. Eine der Art und Beschaffenheit des Abfalls entsprechende hochwertige Verwertung ist anzustreben.

Im Sinne eines produktionsintegrierten Umweltschutzes (PIUS) führt die betriebsinterne Kreislaufführung eines Großteils der anfallenden Biomasse zur Schonung energetischer und stofflicher Ressourcen. Zudem eröffnet die Nutzung von Stoffkreisläufen, durch die Reduzierung von einzusetzenden Rohstoffen und die Verminderung der Abfallmengen, eine Verbesserung der Ökonomie des Herstellungsprozesses.

Auch in Hinblick darauf, dass die weiße Biotechnologie in den nächsten Jahren eine immer stärkere Rolle innerhalb der chemischen Industrie spielen und dadurch die Mengen an bakteriel-

ler Biomasse ansteigen wird, bietet die Nutzung dieser als Rohstoff einen Beitrag zur Förderung der Nachhaltigkeit von industriellen Herstellungsprozessen.

1.1 Ziel der Arbeit

Das generelle Ziel dieser Arbeit besteht darin, alternative Wege für die in der biotechnischen Industrie anfallenden Abfallströme an bakterieller Biomasse zu entwickeln. Die Idee ist, durch den Aufschluss der Bakterien deren Inhaltsstoffe freizusetzen und in Form eines löslichen Lysates in den Fermentationsprozess als Mediumskomponente zurückzuführen.

Für die Untersuchungen sollen drei Organismen mit ganz unterschiedlichen Eigenschaften herangezogen werden. Durch die Wahl der Stämme, der Medien und der Kultivierungsbedingungen werden industrienähe und somit für die Praxis relevante Systeme untersucht.

Eines der Hauptziele der Arbeiten soll darin liegen, eine effiziente Methode für die Lyse des jeweiligen Organismus zu finden. Dabei spielt neben den verfahrenstechnischen und ökonomischen Anforderungen an das Lyseverfahren auch die Lysatqualität eine Rolle. Wichtige Faktoren für eine spätere mögliche industrielle Realisierung werden u. a. die effiziente Prozessierung großer Stoffströme unter Einsatz eines Minimums an stofflichen und energetischen Ressourcen sein. Außerdem wird eine gleichbleibende Qualität der Lysate und die daraus resultierende reproduzierbare Prozessführung eine entscheidende Rolle spielen.

Die hergestellten Lysate sollen durch eine eingehende Lysatanalytik charakterisiert werden. Im Vordergrund stehen hier die Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes und die Bestimmung des Aminosäurespektrums. Zahlreiche weitere Parameter werden die Analytik auf Seite der Lysate abrunden. Innerhalb dieses Arbeitsblockes wird auch ein Vergleich mit konventionell eingesetzten komplexen Substraten erfolgen.

Zur Überprüfung der Eignung der Lysate als Mediumsbestandteil sollen zunächst Kultivierungen auf den jeweiligen Originalmedien durchgeführt werden. Durch eine genaue Auswertung dieser Kultivierungen wird eine Beurteilungsgrundlage geschaffen, die einen Vergleich mit Kultivierungen mit Lysat zulässt.

Abschließend soll durch Kultivierungen mit Lysat, bei denen sowohl unterschiedliche Komponenten als auch deren Menge durch bakterielles Lysat ersetzt werden, der Einfluss dieses Lysats auf wichtige Prozessgrößen wie spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten, Produktivitäten oder Ertragskoeffizienten beurteilt werden. Der Einfluss des Lysateinsatzes soll dabei über mehrere zyklische Rückführungen verfolgt werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Mikrobielle Biomasseabfälle und deren Entsorgung

Genauere Angaben über die Menge an anfallender bakterieller Biomasse bei fermentativen Prozessen liegen nicht vor. Anhand der Jahresproduktion einiger wichtiger Produkte lässt sich jedoch die Menge an anfallender Biomasse abschätzen. **Tabelle 2.1** gibt einen Überblick über die Menge einiger biotechnisch hergestellter Produkte. Über die Jahresproduktion von Enzymen wird in der Literatur keine Angabe gemacht. Der Marktwert aller Enzyme wird jedoch mit 1,83 Milliarden Euro angegeben. Davon fallen 580 Millionen Euro auf die Waschmittelenzyme. Die Jahresproduktion der drei wichtigsten Aminosäuren liegt bei 2.230.000 Tonnen. In der Literatur werden über Ertragskoeffizienten bei der Produktion von Aminosäuren keine Angaben gemacht, so dass ein in dieser Arbeit ermittelter Wert für die Abschätzung des Biomasseaufkommens herangezogen werden soll. Für die Herstellung der Aminosäure Threonin durch satzweise Kultivierung eines *E. coli*-Stammes auf einem halbsynthetischen Medium wurde für den Ertragskoeffizienten $Y_{P/X}$ ein Wert von 1 ermittelt. Somit ergibt sich rechnerisch alleine für das Threonin ein Jahresaufkommen an Biomasse von 30.000 Tonnen Biotrockenmasse. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der angegebene Ertragskoeffizient unter Produktionsbedingungen weitaus höher ausfällt und sich somit die Abfallmenge reduziert.

Tabelle 2.1: Jahresproduktion von ausgewählten durch fermentative Prozesse gewonnene Produkte (Positionspapier der DECHEMA e. V. zur Weißen Biotechnologie, November 2004)

Produkt	Jahresproduktion [t a ⁻¹]
Aminosäuren	
<i>L</i> -Glutamat	1.500.000
<i>L</i> -Lysin	700.000
<i>L</i> -Threonin	30.000
Säuren	
Zitronensäure	1.000.000
Essigsäure	190.000
Lösungsmittel	
Bioethanol	>18.500.000
Vitamine	
Ascorbinsäure (Vitamin C)	80.000
Riboflavin (Vitamin B ₂)	30.000

Genauere Angaben über die Art und Weise der Entsorgung dieser Biomasse­mengen lassen sich in der Literatur nicht finden. Generell kann der Abfall entweder Deponien (Mangold *et al.*, 1994), nach Sterilisierung dem Abwasser (Mutzall, 1993; Atkinson & Mavituna, 1991), Tier­futttermitteln als Supplement (Mangold *et al.*, 1994), der Verbrennung (Mangold *et al.*, 1994) oder nach Kompostierung Düngemitteln (Schierl, 1995) zugeführt werden.

2.2 Alternative Wege zur Verwendung mikrobieller Biomasseabfälle

In der Literatur finden sich einige Patente aus den 50er und 60er Jahren des letzten Jahrhunderts, die sich mit der Nutzung von Pilzmycelien beschäftigen.

Ein Patent aus dem Jahre 1951 (GB 649 818) beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Streptomycin durch *Streptomyces griseus* unter Zugabe von Penicilliummycel in einer Konzentration von 0,1 % - 5,0 % zum Produktionsmedium, welches Nährsalze und eine assimilierbare Kohlenstoffquelle enthalten muss. Dieses Verfahren wurde auch zur Gewinnung von Riboflavin erfolgreich angewendet.

In einem Patent aus dem Jahre 1959 (DE 1 000 572) wird u. a. dargelegt, dass Schimmelpilzmycelien, die unter sauren Bedingungen partiell hydrolysiert wurden, sodass sie noch polymere Gerüst- und Inhaltsstoffe enthalten, sehr gute Nährböden für Mikroorganismen ergeben. Dabei wurde nach der Lyse nur der lösliche Anteil verwendet. Es musste keine weitere Supplementierung mittels Nährsalzen oder Kohlenstoffquellen erfolgen, was den Unterschied zu dem bereits vorgestellten Patent aus dem Jahr 1951 darstellt. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Hydrolysate werden Pilzmycelien, die bei der Produktion von Zitronensäure, Itacon-, Gluconsäure sowie Penicillin anfallen, vorgeschlagen. Die Nachteile der vier vorgestellten Herstellungsverfahren sind der hohe zeitliche und apparative Aufwand, der Einsatz von organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Diäthylether und der Einsatz starker Säuren und Laugen, was eine Anwendung im großen Maßstab ausschließt.

1968 ließ sich die Farbwerke Hoechst AG ein Verfahren zur fermentativen Gewinnung des Antibiotikums Moenomycin schützen (DE 1 247 549). Dazu wurden u. a. Mycelabfälle von verschiedenen Schimmelpilzen wie *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten, von Actinomyceten,

Rhizopus-Arten, Hefen und anderen Mikroorganismen als Medium eingesetzt. Die Mycelien dienten als alleinige Nährstoffquelle und ersetzen sowohl die Kohlenstoff- als auch die Stickstoffquelle. Weiterhin enthielten sie alle für die Fermentation notwendigen Mineralstoffe, Vitamine und Wachstoffsstoffe.

Aus einem weiteren Patent von 1968 (DE 1 467 764) über Verfahren zur fermentativen Herstellung von Antibiotika durch *Streptomyces sp.* werden mehrere Medien unter Zusatz von *Streptomyces*-Mycel als Stickstoffquelle und Wachstumstofflieferant genannt. Die Antibiotikumausbeute konnte dadurch deutlich gesteigert werden.

Über die Herstellung von Silagen aus einem Gemisch von Schlempen bzw. Ablaugen und Pilzmycelien durch den Zusatz von nisinbildenden *Streptococcus lactis* Bakterien berichtet ein Patent aus dem Jahre 1961 (DE 1 103 735). Als geeignete Ablaugen werden z. B. die nach Ausfällung der Zitronensäure anfallende Melasseschlempe und die Kristallisationsmutterlaugen der Calciumgluconatgewinnung genannt. Als Pilzmycellieferanten dienten *Aspergillus*-, *Rhizopus*- und *Penicillium*-Stämme.

Weitere Literatur beschäftigt sich nicht mit der Verwertung der anfallenden mikrobiellen Biomasse, sondern mit dem Recycling von Kulturüberständen. Das größte Problem hierbei ist die Gefahr der Akkumulation von inhibierend wirkenden Substanzen, die sich negativ auf das Wachstum und/oder die Produktbildung auswirken (Hsiao *et al.*, 1994). Solche Inhibitoren können entweder einzelne Komponenten des Mediums oder bei komplexen Substraten Bestandteile dieser Komponenten sein. Außerdem können Inhibitoren während der Kultivierung in das Medium abgegeben oder durch Zellyse freigesetzt werden.

Babu (Babu & Panda, 1990) berichtet über die Möglichkeit Kulturüberstände, die bei der Produktion der Penicillin-Amidase, ein wichtiges Enzym zur Herstellung von Penicillinen, durch *Escherichia coli* NCIM 2400 anfallen, in den Fermentationsprozess zurückzuführen und dabei den Bedarf an Prozesswasser und die anfallende Menge an Abwasser um 40 % bis 60 % zu reduzieren.

Bei der fermentativen Lipidgewinnung durch *Apiotrichum curvatum* in einem definierten Medium kann nach Hsiao (Hsiao *et al.*, 1994) 64 % des Abwassers durch Recycling des Fermentationsüberstandes eingespart werden. Außerdem konnte der Einsatz des Wassers bei der Me-

diumsvorbereitung auf 25 % gesenkt werden. Sieben zyklische Rückführungen blieben ohne negativen Einfluss auf das Wachstum und die Lipidproduktion. In einem weiteren Artikel berichtet Hsiao (Hsiao & Glatz, 1996) darüber, dass bei der *L*-Lysin Produktion durch *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 in einem definierten Medium 75 % des Wasserverbrauches durch Rückführung des Überstandes eingespart werden konnte. Dies hatte bei drei aufeinander folgenden Fermentationen weder negativen Einfluss auf das Wachstum noch auf die *L*-Lysinbildung.

Lu (Lu *et al.*, 2003) entwickelte ein repeated fed-batch Verfahren zur Produktion von Ethanol mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Y002, bei der fast 100 % des Wassers durch Kulturüberstand ersetzt werden konnte. Dabei wurden nach beendeter Fermentation durch einen Filtrationsschritt und anschließender Evaporation die Zellen unlösliche Inhibitoren und der Ethanol aus dem Überstand entfernt. Der Überstand wurde dann in ein Vorlagegefäß überführt und diente dort als Lösungsmittel für die Medienkomponenten. Über 25 Rückführungen wurde keine Verschlechterung der wichtigsten Prozessgrößen beobachtet.

Bei den bisher aufgeführten Beispielen für die alternative Verwendung mikrobieller Biomasse ist die Umsetzung in großtechnisch anwendbare Prozesse fraglich und auch nicht belegbar. Im Folgenden sollen drei Beispiele für die Nutzung von mikrobieller Biomasse im industriellen Maßstab zur Gewinnung von Produkten vorgestellt werden.

Das bekannteste Verfahren zur Nutzung von Biomasseabfällen im großen Maßstab ist die Herstellung von Hefeextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Biomasse stammt hauptsächlich aus dem Brauereiwesen (Kelly, 1986). Ein Teil der bei der Bierherstellung anfallenden Biomasse wird im Prozess zum Animpfen einer neuen Fermentation benötigt, jedoch bleiben etwa drei Viertel der Biomasse als Abfallprodukt erhalten. Eine weitere Rohstoffquelle für die Herstellung von Hefeextrakt sind Fermentationen auf Melasse, die das alleinige Ziel der Biomassebildung haben (Baltes, 1970). Neben seiner Anwendung als Bestandteil zahlreicher Medien in der Biotechnologie findet Hefeextrakt hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als Bestandteil von Fertigprodukten Verwendung.

Diller gibt drei verschiedene Verfahren zur Herstellung von Hefeextrakt an: Autolyse, Plasmolyse und Hydrolyse (Diller, 1941). Die genauen Parameter der Verfahren sind nicht bekannt. Wichtige Faktoren sind der pH-Wert, die Temperatur und die Inkubationszeiten. Nach

Kelly gibt es jedoch einen grundsätzlichen Ablauf bestehend aus Plasmolyse, Autolyse, Pasteurisation, Klärung und Konzentrierung (Kelly, 1986). Während der Plasmolyse werden die Zellen aufgeschlossen und inaktiviert, deren Enzyme bleiben jedoch katalytisch aktiv. Die Zugabe von Salzen oder organischen Lösungsmitteln ist möglich (Uhlig, 1991). Während der anschließenden Autolysephase erfolgt der Abbau der Zellbestandteile durch zelleigene Enzyme wie β -1,3- und β -1,6-Glukanasen, Proteasen, Mannanasen und Nukleasen (Middelberg, 1995). Eine zusätzliche Zugabe der Protease Papain kann die Autolyse unterstützen (Kelly, 1986). Die Pasteurisation führt zum Abtöten vegetativer Zellen und zur Inaktivierung der Enzyme. Durch die Klärung werden unlösliche Bestandteile abgetrennt, und durch die Konzentrierung wird das fertige Endprodukt erhalten.

Ein weiteres Beispiel für die industrielle Nutzung von Biomasse stammt von der norwegischen Firma Norferm AS. Diese stellte mit Hilfe eines Schlaufenreaktors unter Nutzung von Methan aus *Methylococcus capsulatus*-Biomasse verschiedene Produkte für die Lebensmittel- und Futtermittelindustrie her. Die Kapazität der Anlage lag bei 8000 Tonnen Biomasse pro Jahr. Seit März 2006 ist der Betrieb jedoch eingestellt.

Kircher und Pfefferle (Kircher & Pfefferle, 2001) beschreiben ein Verfahren zur Herstellung eines lysinhaltigen Futtermitteladditivs (Biolys[®] 60) auf Basis der Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*. Dabei wird die gesamte anfallende Biomasse mit in das Endprodukt integriert. Nach beendeter Fermentation wird die Kulturbrühe konzentriert und anschließend granuliert. Das einzige Abfallprodukt ist das anfallende Kondensat aus dem Konzentrations- und Granulierschritt.

Bei den folgenden Beispielen wurden aus bakterieller Biomasse Lysate gewonnen, die als Mediumbestandteil in den Ursprungsprozess zurückgeführt wurden. Dieser Umstand steht im klaren Gegensatz zu den am Anfang des Kapitels vorgestellten Verfahren zur Nutzung von Pilzmycelien, die ausschließlich in anderen Prozessen als Nährstoffquelle dienen.

Durch Schierl (Schierl, 1995) konnte gezeigt werden, dass sich aus der Biomasse des *Escherichia coli*-Stammes MM294 durch Autolyse ein Extrakt gewinnen ließ, der in einem halbsynthetischen Medium bei der Kultivierung des gleichen Stammes zu einer erhöhten Produktivität bezogen auf die Biomasse führte. Neben dem vollständigen Verzicht auf konventionelle

Stickstoffquellen konnte teilweise auch der Einsatz der Kohlenstoff- und Thiaminquelle verringert werden. Die Abfallmengenreduzierung betrug bis zu 87 %.

Menssing (Menssing, 1996) arbeitete während seiner Untersuchungen zur Extrakterstellung aus bakterieller Biomasse mit den *Escherichia coli*-Stämmen DH5 α und MM294. Er stellte eine Abhängigkeit der Autolyse vom physiologischen Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Zellernte, der Lagerungszeit und der Lagerungsform fest. Die Autolyse führte zu einer maximalen Abfallmengenreduzierung von 76 %. Wachstumsversuche auf definierten und halbsynthetischen Medien führten zu einer niedrigeren Biomassebildung im Vergleich zu konventionellem Hefeextrakt und Caseinpepton. Als Grund wurde der niedrigere Gehalt an organischen Verbindungen in den *E. coli*-Extrakten angegeben.

Eine weitere interessante Arbeit auf dem Gebiet der Extraktgewinnung aus bakterieller Biomasse und ihrer Rückführung in den ursprünglichen Fermentationsprozess stammt von Risse (Risse, 1998). Die Arbeiten wurden mit einem *Bacillus licheniformis*-Wildtypstamm, ein Produzent der alkalischen Protease Subtilisin Carlsberg, durchgeführt. Verschiedene Lyseverfahren wie Plasmolyse, Autolyse und enzymatische Lysen unter Einsatz von Proteasen und Lysozym führten zu Lysegraden von bis zu 97 %. Wachstumsversuche zeigten die Eignung der Lysate als Ersatz für konventionelle Extrakte wie Caseinpepton und Hefeextrakt. Außerdem erfolgten Wachstumsversuche mit der Hefe *Hansenula polymorpha*, *Escherichia coli* und *Klebsiella planticola*. Alle Organismen zeigten keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum bei Kultivierung auf Medium mit *Bacillus*-Lysat. Ein besonderes Augenmerk wurde auf den Einfluss des Lysateinsatzes auf die Bildung der alkalischen Protease gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass das Lysat auf die alkalische Proteasebildung nicht repressiv wirkte.

2.3 Zusammensetzung bakterieller Biomasse

Neben dem Lyseverfahren spielt die Zusammensetzung der bakteriellen Biomasse eine entscheidende Rolle für die Qualität des Lysates. Beide Faktoren entscheiden darüber, welche Komponenten in welcher Form das hergestellte Lysat enthält.

Tabelle 2.2 gibt zunächst einen Überblick über die Elementarzusammensetzung bakterieller Biomasse. Der Kohlenstoff ist mit 50 % das am häufigsten auftretende Element der Bakterientrockenmasse, gefolgt vom Sauerstoff und Stickstoff.

Tabelle 2.2: Elementarzusammensetzung bakterieller Biomasse, Angaben in Prozent des Trockenstoffes (%TS)

Elementarzusammensetzung bakterieller Biomasse				
Quelle	Doran, 1995	Falbe & Regitz, 1992	Chmiel, 2005	Schlegel, 1992
C	50,0	50,0	46,0 - 52,0	50,0
O	20,0	20,0	k. A.	20,0
N	14,0	14,0	10,0 - 14,0	14,0
H	8,0	8,0	k. A.	8,0
P	3,0	3,0	2,0 - 4,0	3,0
S	1,0	1,0	0,2 - 1,0	1,0
K	1,0	1,0	k. A.	1,0
Na	1,0	1,0	0,5 - 1,0	k. A.
Ca	0,5	0,5	0,01 - 1,10	0,5
Mg	0,5	0,5	0,1 - 0,5	0,5
Cl	0,5	0,5	k. A.	k. A.
Fe	0,2	0,2	0,02 - 0,20	0,2
Mn	k. A.	k. A.	0,001 - 0,010	k. A.
Rest	0,3	k. A.	k. A.	k. A.

k. A.: keine Angabe

Da für ein Substrat weniger die elementare Zusammensetzung, sondern die Verfügbarkeit der Inhaltsstoffe eine Rolle spielt, zeigt **Tabelle 2.3** den Anteil der wichtigsten Gruppen von Biomolekülen an der bakteriellen Biotrockenmasse. Der Wassergehalt von Bakterien wird mit Werten zwischen 70 %TS und 85 %TS angegeben. Die mengenmäßig am häufigsten auftretende Gruppe ist die der Proteine. Sie macht 40 %TS - 70 %TS des Trockenstoffs der Bakterienzelle aus. Nukleinsäuren, die sich in die Fraktion der DNA und RNA aufspalten, sind die am zweit häufigsten auftretende Gruppe, wobei die RNA innerhalb dieser Gruppe stärker vertreten ist. Die Zellwand und die Lipide, wie die der Membranen, bilden eine weitere wichtige Gruppe.

Tabelle 2.3: Stoffliche Zusammensetzung bakterieller Biotrockenmasse, Angaben in Prozent des Trockenstoffes (%TS)

Stoffliche Zusammensetzung von bakterieller Biomasse				
Quelle	Storhas, 2002	Falbe & Regitz, 1992	Muttzall, 1993	Schlegel, 1992
Proteine	40 - 50	50	50 - 70	50
Nukleinsäuren	13 - 34	10 - 20	10 - 20	10 - 20
davon DNA	3 - 4	3 - 4	k. A.	3 - 4
davon RNA	10 - 20	10 - 20	k. A.	10 - 20
Lipide	10 - 15	10	2 - 7	10
Zellwand	k. A.	10 - 20	k. A.	k. A.
Asche	k. A.	k. A.	3 - 7	k. A.
Kohlenhydrate	k. A.	k. A.	5 - 15	k. A.

k. A.: keine Angabe

Neben den genannten Biomolekülen ist über den Gehalt an Aminosäuren, Vitaminen, Cofaktoren, Vorstufen von Coenzymen und Coenzymen nichts bekannt, obgleich deren Menge und Erhalt während der Lysatherstellung neben dem Depolymerisationsgrad der Proteine, Nukleinsäuren etc., einen großen Einfluss auf die Eignung des Lysates als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle sowie als Wuchsstofflieferant hat.

2.4 Zellaufschlussverfahren für den industriellen Maßstab

Neben der Zusammensetzung der bakteriellen Biomasse spielt das Lyseverfahren eine entscheidende Rolle für die Lysatqualität und die Ökonomie des Herstellungsprozesses. Es entscheidet zunächst darüber in welchem Maße die Inhaltsstoffe der Zelle freigesetzt werden. Darüber hinaus wird durch das gewählte Aufschlussverfahren der Depolymerisationsgrad der zellulären Makromoleküle bestimmt. Außerdem lassen sich durch die Wahl der Lysebedingungen, wie z. B. den pH-Wert oder die Temperatur, enzymatische Prozesse und der Erhalt wichtiger Wuchsstoffe beeinflussen. Beides entscheidet später darüber, ob das hergestellte Lysat als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle oder auch als Wuchsstofflieferant wie z. B. Hefeextrakt oder Maisquellwasser dienen kann. Der Depolymerisationsgrad hat weiterhin Einfluss

auf physikalische Eigenschaften des Lysates wie das Verhalten bei Erhitzen oder pH-Änderungen. All dies hat wiederum Einfluss auf die Verfügbarkeit also die Verstoffwechselbarkeit der Inhaltsstoffe für die Zellen.

Wie ersichtlich wurde, ist die Wahl des Aufschlussverfahrens, durch seinen Einfluss auf die Zusammensetzung und damit die Qualität des Lysates, immens wichtig. Im Folgenden sollen nun aus den in der Literatur zahlreich beschriebenen Möglichkeiten des Zellaufschlusses solche vorgestellt werden, die für den industriellen Maßstab geeignet sind und in dieser Arbeit angewendet wurden. Dabei spielten bei der Wahl der Verfahren neben verfahrenstechnischen Faktoren wie Prozessierbarkeit großer Volumenströme auch ökonomische Faktoren wie die Minimierung stofflicher und energetischer Ressourcen eine entscheidende Rolle.

Tabelle 2.4 zeigt im Überblick wichtige Zellaufschlussverfahren im Pilot- und Produktionsmaßstab. In dieser Arbeit wurden die chemische Hydrolyse, die Autolyse mit und ohne Unterstützung von Enzymen und der mechanische Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisator angewandt.

Tabelle 2.4: Darstellung wichtiger im Pilot- und Produktionsmaßstab angewendeter Zellaufschlussverfahren

Zellaufschlussverfahren			
Chemische Methoden	Biologische Methoden	Physikalische Methoden	
		Nicht-mechanisch	mechanisch
Alkalische Hydrolyse	Enzymatische Lyse	Osmotischer Schock	Hochdruckhomogenisation
Saure Hydrolyse	Autolyse	Einfrieren/Auftauen	Mahlen in Kugelmøhlen
Behandlung mit Detergentien	Phagenlyse	Dekompression	Prallstrahlverfahren
Behandlung mit chaotropen Agenzien		Trocknung	Ultraschallaufschluß
Behandlung mit Chelatbildner		Thermolyse	
Behandlung mit organischen Lösungsmittel			

2.4.1 Zellaufschluss und dessen Messung

Für die Beurteilung des Zellaufschlusses ist seine quantitative Erfassung wichtig.

Es existieren verschiedene Messmethoden für die Bestimmung des Zellaufschlusses. Die einfachste Form ist die Bestimmung des volumen- oder zahlenmäßigen Anteils der aufgeschlossenen Zellen. Diese Methoden zählen zu den direkten Arten der Messung und können optisch u. a. nach Anfärben bestimmt werden (Middelberg, 1995). Ein Nachteil ist die zeitintensive Durchführung, jedoch werden sie zur Modellierung von Aufschlussprozessen benötigt. Alternativ gibt es indirekte Methoden. Durch sie lassen sich nur indirekt Aussagen über den Zellaufschluss machen, jedoch ermöglichen sie die direkte Messung von spezifischen Produkten. Dies können Enzymaktivitäten oder die Gesamtproteinkonzentration sein. Indirekte Methoden werden aufgrund ihrer schnellen, einfachen und apparativ wenig aufwendigen Durchführung häufig bevorzugt (Middelberg, 2000).

In dieser Arbeit wird der Aufschluss indirekt über die freigesetzte Proteinkonzentration und den auf die Feststoffkonzentration bezogenen Lysegrad bestimmt.

2.4.2 Hochdruckaufschluss

Der mechanische Hochdruckaufschluss ist die in der Industrie am weitesten verbreitete Methode für den Aufschluss nicht filamentöser Organismen (Harrison, 1991; Middelberg, 2000). Es ist ein unspezifischer Prozess (Andrews & Asenjo, 1987), der die Freisetzung des Cytoplasmainhaltes durch Zerstörung der Zellwand bewirkt.

Der Hochdruckhomogenisator wurde, wie auch die Kugelmühle, erst lange nach seinem Einsatz in der klassischen Dispergiertechnik innerhalb der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie, für den Zellaufschluss entdeckt (Middelberg, 1995). Seit etwa 100 Jahren ist das Prinzip der Hochdruckhomogenisation zur Erzeugung stabiler Emulsionen bekannt. Trotz zahlreicher Modifikationen hat sich das Grundprinzip der Hochdruckhomogenisation bis heute jedoch nicht verändert (Jahnke, 2000).

Der Hochdruckhomogenisator besteht aus einer Hochdruckkolbenpumpe mit nachgeschaltetem Entspannungsventil. Die Kolbenpumpe hat die Aufgabe, das für die Entspannung notwendige Energieniveau aufzubringen. Ist das Homogenisierergut auf den eingestellten Druck gebracht, öffnet das Ventil etwas (ca. 0,1 mm) und in sehr kurzer Zeit entspannt sich die Suspension (10 - 100 μs). Das Entspannungsventil besteht aus einem festen Ventilsitz und einem einstellbaren Ventil. Beide Teile bilden einen verstellbaren radialen Spalt von etwa 10 μm bis 20 μm . Je nach Krafteinwirkung auf das Ventil ändern sich die Spaltverhältnisse, der Widerstand und damit der Homogenisierdruck. Ein äußerer Prallring bildet einen definierten Austrittsquerschnitt und schützt das Ventilgehäuse vor strömungsmechanischer Beschädigung. Es werden Geschwindigkeiten in der Größenordnung von 200 m s^{-1} bis 300 m s^{-1} erreicht (Jahnke, 2000).

Das Entspannungsventil ist die für die Desintegration entscheidende Baugruppe. Beim Durchtritt durch dieses werden die Zellmembranen und -wände durch hydrodynamische Scherung (Kleinig & Middelberg, 1998), Kavitation (Büschelberger & Loncin, 1989; Kleinig & Middelberg, 1998) und Turbulenz (Middelberg, 1995) aufgeschlossen. Während des Durchtritts können aber auch Makromoleküle des Cytoplasmas wie DNA in kleinere Fragmente zerfallen. Welche Mechanismen während des Aufschlusses im Hochdruckhomogenisator jedoch überwiegen, ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Middelberg, 2000), weshalb es teilweise zu widersprüchlichen Aussagen kommt. Laut Middelberg (Middelberg, 1995) spielt beispielsweise der Aufprall der Zellen nach Austritt aus dem Zellaufschlussventil auf den Prallring nur eine untergeordnete Rolle. Wohingegen Engler und Robinson (Engler & Robinson, 1981) diesen Effekt als Voraussetzung für einen effektiven Aufschluss ansehen. Generell bestimmt eine Kombination aus vielen Faktoren zusammen mit den herrschenden Strömungsverhältnissen und der Art des Organismus das Aufschlussergebnis (Jahnke, 2000).

Die Einflussgrößen auf den Aufschluss lassen sich in drei Gruppen einteilen. Erstens spielen Stoffwerte wie die Viskosität und die Dichte der dispersen und kontinuierlichen Phase eine Rolle (Jahnke, 2000). Weitere wichtige Stoffwerte sind der Dampfdruck der kontinuierlichen Phase, der Gasgehalt und die Ausgangspartikelgröße (Jahnke, 2000). Zweitens beeinflusst die Geometrie des Homogenisatorventils mit Größen wie den effektiven Durchmesser, den Einlassradius und den Anprallabstand das Aufschlussergebnis (Hetherington *et al.*, 1971). Drittens sind es die Prozessparameter wie der Aufschlussdruck, der Volumenstrom, die Anzahl

der Durchgänge und die Anzahl der Druckstufen, die den Aufschluss entscheidend mitbestimmen (Middelberg, 1995).

2.4.3 Chemische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse ist eine sehr harsche aber effektive Methode des Zellaufschlusses. Sie ist für die Freisetzung von intrazellulären Produkten, die unempfindlich gegenüber hohem pH sind, interessant (Middelberg 1995). Weitere Vorteile der alkalischen Lyse sind ihre Unabhängigkeit vom Maßstab (Middelberg, 1995), die kostengünstige Durchführung (Schütte *et al.*, 1990) und der geringe apparative Aufwand.

In der Literatur werden für die Lyse von Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen (pH = 10,5 - 12,5) bereits 20 bis 30 Minuten als ausreichend beschrieben (Stanbury & Whitaker, 1984; Schütte & Kula, 1990). Die wichtigsten Einflussfaktoren sind dabei der pH-Wert und die Temperatur (Middelberg, 1995). Jedoch werden für die alkalische Totalhydrolyse von Proteinen Temperaturen von 110 °C und Haltezeiten von 18 bis 70 Stunden vorgeschlagen (Kellermann, 1998a). Als Hydrolysemedium werden 4 M Barium-, Natrium- oder Lithiumhydroxidlösungen empfohlen. Der Einsatz starker Laugen erfordert jedoch spezielle Reaktionsgefäße, da Glas geätzt wird und die freigesetzten Silikate Nebenreaktionen begünstigen. Im Gegensatz dazu sieht die Standardmethode zur sauren Hydrolyse von Proteinen (Kellermann, 1998a) Temperaturen von 110 °C und Reaktionszeiten von 24 Stunden bei Verwendung von 6 M Salzsäure unter Sauerstoffausschluss vor. Die Standardbedingungen sind ein Kompromiss von Hydrolysezeit und Temperatur, wobei in Kauf genommen wird, dass einige Aminosäuren, wie auch Aminosucker und phosphorylierte Aminosäuren partiell zerstört werden. Asparagin und Glutamin werden unter diesen Reaktionsbedingungen vollständig zu den entsprechenden Säuren Asparagin- bzw. Glutaminsäure desamidiert (Nelson & Cox, 2001).

Sowohl bei der sauren als auch bei der alkalischen Hydrolyse muss nach der Reaktion der Ansatz neutralisiert werden. Dies kann bei Verwendung von Bariumhydroxid zu Verlusten an Aminosäuren durch Adsorption an das präzipitierte Bariumsalz führen (Kellermann, 1998a). Außerdem führt es zu ungewollt hohen Salzkonzentrationen. Ein weiterer Nachteil der chemischen Hydrolyse ist die Zerstörung von Wachstumsfaktoren wie Coenzymen und Vitaminen.

Das wichtigste Beispiel für die Anwendung der alkalischen Hydrolyse ist die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im Labor- und Pilotmaßstab (Clemson & Kelly, 2003; Jurk, 1998). Viele kommerziell erhältlichen Kits zur Aufreinigung von Nukleinsäuren bedienen sich der alkalischen Hydrolyse zur Freisetzung der Nukleinsäuren. Weitere Beispiele sind die Gewinnung von Polyhydroxybuttersäure aus *Alcaligenes eutrophus* (Harrison, 1991), die Gewinnung der *L*-Asparaginase aus *Erwinia carotovora* (Wade, 1971) und die Gewinnung eines rekombinanten humanen Wachstumsfaktors aus *Escherichia coli* (Schütte & Kula, 1990).

Der erste Schritt bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen ist die Freisetzung der einzelnen Aminosäuren. Die Spaltung der Peptidbindung erfolgt dabei hauptsächlich durch saure Hydrolyse. Die alkalische Hydrolyse wird wie auch die enzymatische Hydrolyse, nur selten und dann zur Verbesserung der Tryptophanausbeute angewandt (Kellermann, 1998a). Ein weiteres Einsatzgebiet der sauren Hydrolyse ist die Gewinnung von Aminosäuren aus proteinogenen Rohstoffen (Peters-Wendisch *et al.*, 2003).

2.4.4 Autolyse

Die meisten Eubakterien besitzen eine Zellwand, die das Cytoplasma von der äußeren Umgebung abtrennt. Es handelt sich dabei um eine mehr oder weniger ausgeprägte Schicht von Peptidoglykanen, die der Cytoplasmamembran aufgelagert ist. Hierbei handelt es sich um parallel verlaufende unverzweigte Polysaccharidketten, alternierend β -1,4-glykosidisch verknüpfte N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäuremoleküle, die durch kurze Peptide miteinander vernetzt sind. Diese Peptidoglykanschicht wird auch als Mureinsacculus bezeichnet. Bei Gram-positiven Bakterien besteht die Zellwand aus einer dicken Schicht von solchen Peptidoglykanen. Bei Gram-negativen Bakterien folgt auf einen sehr dünnen Mureinsacculus die äußere Membran. Diese Lipiddoppelschicht ist asymmetrisch gebaut und besteht aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden. Der Raum zwischen innerer und äußerer Membran wird als periplasmatischer Raum bezeichnet.

Die Zellwand gibt der Zelle ihre Form und sorgt für eine mechanische Stabilität. So wird z. B. ein Platzen der Zelle aufgrund des hohen inneren osmotischen Druckes verhindert (Schlegel, 1992). Für das Zellwachstum und die Zellteilung ist es jedoch notwendig die kovalenten Bindungen des Peptidoglykans zu hydrolysieren. Diese Aufgabe übernehmen Autolysine, speziel-

le Enzyme, die Peptidoglykane an spezifischen Stellen spalten können und in allen Bakterien zu finden sind (Ghuysen, 1968). Sie werden in drei Gruppen aufgeteilt: Muramyl-*L*-alanin-Amidasen, Glykosidasen und Peptidasen. Beispiele solcher Autolysine sind die N-Acetylmuramyl-*L*-alanin-Amidase (Harz *et al.*, 1990) und die β -N-Acetylglycosaminidase (Calamita *et al.*, 2002). Autolysine können gelöst oder membrangebunden vorliegen.

Der unkontrollierte Abbau des Peptidoglykangerüsts führt zum Verlust der Zellintegrität und der schützenden Eigenschaften der Zellwand (Shockman & Barret, 1983). Trotzdem ist die Degradation des Mureinsacculus für das Zellwachstum und die Zellteilung essentiell. Da Autolysine eine potentiell letale Wirkung auf die Zelle ausüben, ist eine stringente Regulation notwendig. Durch Eingriff in die Regulationsmechanismen der Autolysine lässt sich unter bestimmten Bedingungen eine Autolyse auslösen. Dazu sind aber Kenntnisse über die autolytischen Systeme des jeweiligen Organismus notwendig. Nach Middelberg (Middelberg, 1995) und Calamita (Calamita *et al.*, 2002) sind die Mechanismen der Autolyse jedoch weiterhin nur unvollständig aufgeklärt und scheinen für verschiedene Bakterien unterschiedlich zu sein. Dies mag auch ein Grund dafür sein, dass die Autolyse in der industriellen Praxis bisher nur wenig Eingang gefunden hat. Die Vorteile der Autolyse sind die einfache Maßstabsübertragung, die einfache Prozessführung und der geringe apparative Aufwand. Die einzige bisher bekannte Anwendung der Autolyse im großen Maßstab ist die bereits erwähnte Herstellung von Hefeextrakt.

Da es sich bei der Autolyse um enzymatisch katalysierte Prozesse handelt, kann generell über die Temperatur, den pH-Wert und die Anwesenheit von Cofaktoren, Inhibitoren und Aktivatoren auf die Enzymaktivität Einfluss genommen werden. Im Folgenden werden bekannte Regulationsmechanismen anhand von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* vorgestellt.

In *Escherichia coli* existieren neun Mureinhydrolasen, von denen vier als Autolysine charakterisiert wurden. Es handelt sich um zwei Muramidasen und zwei Endopeptidasen (Calamita *et al.*, 2002).

Die vorgeschlagenen Regulationsmechanismen der Autolysine in *E. coli* sind vielfältig. Die Aktivität der membrangebundenen Autolysine scheint nur auf die Wachstumszonen begrenzt zu sein. Es wird angenommen, dass zwischen den membrangebundenen Hydrolasen und ihrem Substrat dem Peptidoglykan eine Barriere vorliegt. Diese Barriere lässt sich durch einen

osmotischen Schock der Zellen mit 20 % Saccharose oder der Behandlung mit Natriumchlorid bei 0 °C aufheben (Hartmann *et al.*, 1974). Zusätzlich können Chelatbildner durch Komplexierung der divalenten Kationen die Autolyse hervorrufen (Hartmann *et al.*, 1974).

Die löslichen Endopeptidasen, Amidasen und periplasmatischen Hydrolasen werden in ihrer Aktivität durch die Zellwandstruktur beeinflusst. Es wird angenommen, dass periplasmatische Hydrolasen an der äußersten Schicht der Zellwand binden und somit die innenliegenden Schichten geschützt sind (Höltje & Tuomanen, 1991). Verschiedene Inhibitoren und Cofaktoren beeinflussen darüber hinaus die gelösten autolytisch wirksamen Enzyme. Ingram zeigte, dass durch die Behandlung der Zellen mit Ethanol die Autolyse herbeigeführt werden kann und erklärte diesen Effekt damit, dass durch das Ethanol inhibierend wirkende Lipide von den Enzymen entfernt werden (Ingram, 1981). Über den Einfluss des pH auf die Regulationsmechanismen der Autolyse berichtet Lopez (Lopez *et al.*, 1976).

In *Bacillus subtilis* spielen bei autolytischen Vorgängen zwei Enzyme die Hauptrolle: eine N-Acetylmuramyl-L-alanin-Amidase (Amidase) und eine N-Acetylglucosaminidase (Calamita *et al.*, 2002).

Verschiedene Mechanismen der Regelung der Autolyse in *Bacillus subtilis* sind vorgeschlagen worden. Eine Möglichkeit ist die Regulation durch Proteasen, die die Autolyse durch Abbau von extrazellulär auftretenden Autolysinen verhindern (Calamita *et al.*, 2002). Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus ist der Grad der Proteinfaltung. Sekretiertes Autolysin kann erst außerhalb der Zelle die endgültige und damit katalytisch wirksame Struktur annehmen (Chambert & Petit-Glatron, 1999). Teichonsäure spielt hierbei im Gegensatz zur Teichuronsäure eine Rolle, indem sie die Faltung von sekretierten Enzymen verbessert (Hyryläinen *et al.*, 2000). Einen weiteren Einfluss auf die Mechanismen der Autolyse haben divalente Kationen. Außerdem zeigen Untersuchungen, dass monovalente Kationen die Autolyse bei *Bacillus subtilis* herbeiführen, wohingegen divalente Kationen die Autolyse verhindern (Svarchorn *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse zeigen einen in der Literatur häufig zu findenden Zusammenhang zwischen enzymatischer Aktivität und Anwesenheit von bestimmten Ionen als Cofaktoren.

2.5 Projektbeschreibungen

In dieser Arbeit wurde unter anderem mit einem *Escherichia coli*-Stamm zu Produktion der essentiellen Aminosäure *L*-Threonin und mit einem *Bacillus licheniformis*-Stamm, der die alkalische Protease Subtilisin Carlsberg produziert, gearbeitet. Bei beiden Stämmen handelte es sich um Hochleistungsstämme, die in der Industrie Einsatz fanden. In den nächsten Kapiteln wird daher auf einige wichtige Aspekte aus dem Bereich der fermentativen Herstellung von Aminosäuren und Enzyme eingegangen.

2.5.1 Bedeutung von Aminosäuren

Der weltweite Verbrauch an Aminosäuren wird auf 2 Millionen Tonnen geschätzt (Kusumoto, 2001). Der jährliche Bedarf an Aminosäuren wie Mononatriumglutamat als Geschmacksverstärker oder *L*-Lysin, *D,L*-Methionin und *L*-Threonin als Futtermitteladditive wird auf über eine Millionen Tonnen je Aminosäure geschätzt (Hermann, 2003). Für den pharmazeutischen Bereich werden Aminosäuren hauptsächlich für die intravenöse und enterale Ernährung vor und nach Operationen benötigt. Der Bedarf wird hier mit 15.000 Tonnen jährlich angegeben (Hermann, 2003).

Im Gegensatz zu den Aminosäuren Mononatriumglutamat und *L*-Lysin, die hauptsächlich durch coryneforme Bakterien gewonnen werden, wird *L*-Threonin wie auch Phenylalanin (Gerigk *et al.*, 2002) durch *Escherichia coli*-Stämme gewonnen.

Die Produktion von Aminosäuren kann durch drei Verfahren erfolgen: Extraktion, chemische Synthese und mikrobielle Methoden. Letztere Gruppe wird unterteilt in fermentative und enzymkatalysierte Prozesse (Ikeda, 2003). Die Extraktion verliert durch die fortlaufende Entwicklung biotechnischer Verfahren immer mehr an Bedeutung (Hermann, 2003). Sie ist stark von der Verfügbarkeit der natürlichen Proteinquellen wie Haaren, Keratin, Federn oder Sojabohnen abhängig. Jedoch werden *L*-Tyrosin, *L*-Cystein, *L*-Leucin und *L*-Hydroxyprolin zurzeit noch von verschiedenen Herstellern durch Extraktion gewonnen (Kusumoto, 2001). Da durch die chemische Synthese ausschließlich ein Gemisch aus *D*- und *L*-Form der jeweiligen Aminosäure gewonnen werden kann, muss in einem weiteren Schritt die Trennung des Racemats erfolgen. Es gibt nur wenige Beispiele für die Herstellung von Aminosäuren durch

chemische Synthese. Zum einen wird die achirale Aminosäure Glycin chemisch synthetisiert und zum anderen *D,L*-Methionin, da die optische Konfiguration auf die Wirkung als Futtermitteladditiv in diesem Fall keine Auswirkung hat (Kusumoto, 2001). Die Ökonomie bei den fermentativen Verfahren wird hauptsächlich durch die Kosten der Kohlenstoffquelle und die der Aufreinigung, die Ausbeute und die Produktivität bestimmt.

2.5.2 Die essentielle Aminosäure *L*-Threonin

L-Threonin ist eine essentielle Aminosäure, die hauptsächlich als Futtermitteladditiv in der Nutztierhaltung eingesetzt wird (Debabov *et al.*, 1992). Außerdem findet sie in der pharmazeutischen und chemischen Industrie sowie als Vorstufe für die Synthese von Aminosäuren wie *L*-Lysin und *L*-Homoserin durch Mikroorganismen Verwendung (Debabov *et al.*, 1996). Sie wird durch fermentative Verfahren unter Verwendung von Glucose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle gewonnen. Die verwendeten Stämme müssen für eine effiziente Produktion in der Lage sein Threonin in großen Mengen zu synthetisieren (Debabov, 2003).

Alle Aminosäuren entstehen aus Zwischenstufen der Glykolyse, des Citratzyklus oder des Pentosephosphatweges. Stickstoff gelangt über Glutamat oder Glutamin in diese Synthesewege (Nelson & Cox, 2001).

Die Threoninsynthese beginnt mit einer zentralen Verbindung aus dem Citratzyklus, dem Oxalacetat. Durch Transaminierung entsteht daraus *L*-Aspartat (Nelson & Cox, 2001). Aus dieser Verbindung kann *Escherichia coli* vier Aminosäuren synthetisieren: *L*-Threonin, *L*-Lysin, *L*-Methionin und *L*-Isoleucin (Debabov, 2003). **Abbildung 2.1** zeigt die Synthesewege schematisch auf.

Der erste Syntheseschritt wird durch drei Aspartat-Kinasen (I, II, III) katalysiert, diese werden durch die Gene *thrA* (I), *metL* (II) und *lysC* (III) codiert. *L*-Aspartat wird unter ATP Verbrauch zu *L*-Aspartylphosphat phosphoryliert. Die Gene *thrA* und *metL* codieren für Enzyme, die zwei enzymatische Reaktionen durchführen können. Neben der bereits angesprochenen Aspartat-Kinaseaktivität weisen beide auch eine Homoserin-Dehydrogenaseaktivität auf (Patte *et al.*, 1966). Diese Enzyme katalysieren somit auch den dritten Schritt der Synthese. Im zweiten Schritt setzt eine durch das Gen *asd* codierte Aspartat-Semialdehyd-

Dehydrogenase *L*-Aspartylphosphat zu *L*-Aspartatsemialdehyd um. Die letzten beiden Schritte werden durch die Homoserin-Kinase (Gen *thrB*) und die Threonin-Synthase (Gen *thrC*) katalysiert.

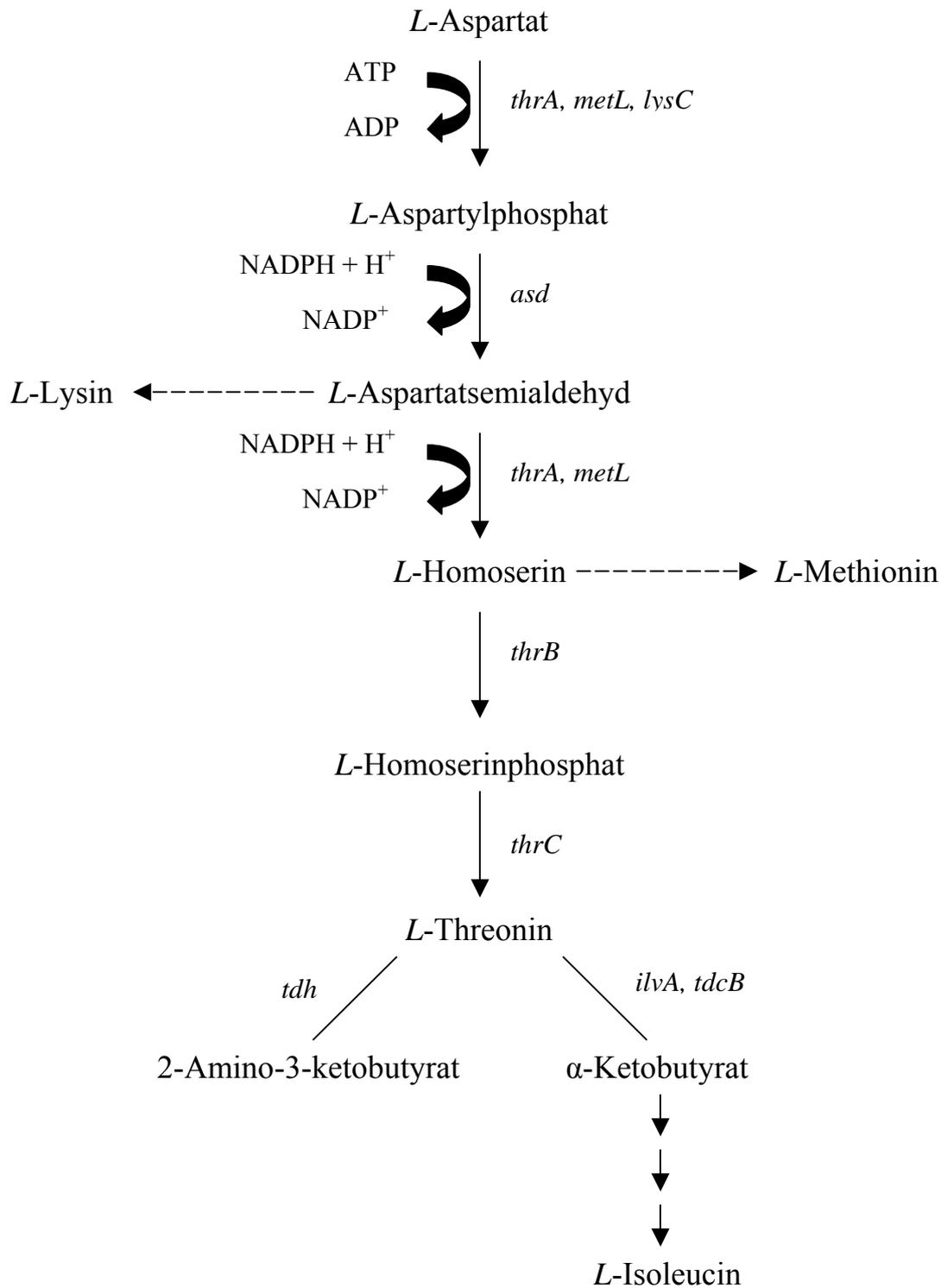


Abbildung 2.1: Biosynthese des *L*-Threonins in *Escherichia coli* (Debabov, 2003)

Generell kann Threonin im Stoffwechsel von *Escherichia coli* durch drei Enzyme abgebaut werden (Debabov, 2003). Es handelt sich um die Threonin-Dehydrogenase (Gen *tdh*), die Threonin-Desaminase (Gen *ilvA*) und die katabolische Desaminase (Gen *tdcB*) (Umbarger & Brown, 1956). Der in dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*-Stamm B-3996 besitzt eine Threonin-Dehydrogenase und eine Threonin-Desaminase mit abgeschwächter Aktivität (Hermann & Rieping, 2003). Die katabolische Desaminase entfaltet ihre Aktivität nur unter anaeroben Bedingungen bei gleichzeitiger Abwesenheit von Glucose und der Anwesenheit von mindestens drei Aminosäuren (Egan & Phillips, 1977) und spielt daher bei der industriellen Herstellung keine Rolle.

Der natürliche Zweck einer Bakterienzelle ist die Bildung einer weiteren Bakterienzelle. Die Synthese von Aminosäuren ist im Allgemeinen strikt reguliert, sodass nur die von der Zelle für Wachstum und Teilung benötigte Menge gebildet wird. Dadurch wird eine überschüssige Produktion ohne Nutzen für die Zelle vermieden. Im Folgenden werden Regulationsmechanismen des Threoninsyntheseweges aufgezeigt.

Die Aspartat-Kinase I (Gen *thrA*) wird durch Threonin inhibiert. Ihre Expression wird durch die kombinierte Anwesenheit von Threonin und Isoleucin unterdrückt (Debabov, 2003). Diese Feedback-Inhibierung der Aspartat-Kinase I bzw. Homoserin-Dehydrogenase I durch Threonin ist die Schlüsselstelle des Syntheseweges dieser Aminosäure. Untersuchungen zeigten, dass durch das Einbringen einer gegenüber Threonin insensitiven Aspartat-Kinase I eine Steigerung in der Threoninsynthese ohne Akkumulation anderer Zwischenprodukte erreicht werden konnte (Szcziul & Wampler, 1976). Der in der Arbeit verwendete *Escherichia coli* Stamm B-3996 besitzt eine Aspartat-Kinase I bzw. Homoserin-Dehydrogenase I mit erhöhter Resistenz gegenüber einer Feedback-Inhibierung durch Threonin (Hermann & Rieping, 2003).

Die Aspartat-Kinase II (Gen *metL*) wird in ihrer Aktivität nicht durch Methionin beeinflusst, obwohl hohe Konzentrationen dieser Aminosäure zu einer Repression der Expression führen (Patte *et al.*, 1967).

Die Aktivität sowie die Expression der Aspartat-Kinase III (Gen *lysC*) wird durch Lysin reguliert (Stadman *et al.*, 1961).

Die Aktivität der Aspartat-semialdehyd-Dehydrogenase (Gen *asd*) wird durch die Anwesenheit von Aminosäuren nicht inhibiert, jedoch führen hohe Konzentrationen an Lysin, Threonin und Methionin zu einer teilweisen Repression (Boy & Patte, 1972). Lysin kann den Enzymlevel dieses Enzyms um das Fünffache senken, Threonin und Methionin können ihn halbieren. Die molekularen Mechanismen sind bisher unklar. Glucose-6-phosphat übt darüber hinaus auch einen regulatorischen Effekt auf die Expression der Aspartat-semialdehyd-Dehydrogenase aus (Boy *et al.*, 1979).

Aus biotechnologischer Sicht sind die Regulationsmechanismen, die eine Überproduktion einzelner Stoffe unterbinden, höchst unerwünscht. Der biotechnologische Zweck einer Bakterienzelle ist zumeist die möglichst hohe Produktion eines bestimmten Stoffes. Aus diesem Grund gibt es ein großes Interesse, die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen für die Synthese eines Stoffes aufzuklären und auszuschalten, um eine Überproduktion zu erreichen (Deregulation).

2.5.3 Klassifizierung von Proteasen

Proteasen gehören nach den Richtlinien der Nomenklatur-Kommission der IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) zu den Hydrolasen, die Peptidbindungen spalten (E.C. 3.4). Aufgrund ihrer vielfältigen katalytischen Wirkung und Struktur fällt die Einordnung in die weiteren Untergruppen schwer. Zurzeit werden Proteasen durch drei Hauptmerkmale charakterisiert: Art der katalysierten Reaktion, Struktur des aktiven Zentrums und evolutionäre Verwandtschaft der Primärstruktur bestimmt durch Sequenzhomologien (A. J. Barrett, 1994).

Proteasen werden nach dem Ort der Spaltung der Peptidbindung im Protein in zwei Hauptklassen unterteilt, nämlich in Exopeptidasen und Endopeptidasen. Die Exopeptidasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen in der Nähe des C- (Carboxypeptidasen) oder N-Terminus (Aminopeptidasen), dabei werden einzelne Aminosäuren, Dipetide oder Tripetide freigesetzt. Die Carboxypeptidasen können aufgrund der Struktur ihres aktiven Zentrums u. a. in die Gruppe der Serincarboxypeptidasen, der Metallo-carboxypeptidasen und der Cystein-carboxypeptidasen unterteilt werden. Endopeptidasen spalten die Peptidkette im Inneren. Sie werden aufgrund ihrer funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum in vier Unterklassen ge-

gliedert: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Metalloproteasen (Hartley, 1960). Diverse Proteasen lassen sich nicht eindeutig einer Gruppe zuordnen (Menon & Goldberg, 1987). Auf Basis der Aminosäuresequenz lassen sich Proteasen in verschiedene Familien (Argos, 1987) einteilen. Weiterhin werden die Familien in Gruppen unterteilt (Rawlings & Barrett, 1993), in denen Proteasen mit gemeinsamer evolutionärer Abstammung zusammengefasst werden.

Die wichtigsten Vertreter der Proteasen mit industrieller Bedeutung sind die alkalischen Proteasen. Diese zählen zu den Serinendopeptidasen. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind das Subtilisin Carlsberg und das Subtilisin Novo (bakterielle Protease Nagase, BPN') (Rao *et al.*, 1998).

2.5.4 Quellen für die Proteasegewinnung

Da Proteasen für alle lebenden Organismen physiologisch notwendig sind, treten sie in einer großen Vielfalt in zahlreichen Quellen wie Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen auf (Rao *et al.*, 1998).

Die wichtigsten Pflanzenproteasen sind Papain, Bromelain und Keratinase. Papain ist historisch gesehen eine der ersten genutzten Pflanzenproteasen (Schechter & Berger, 1967) und wird aus dem Saft und Früchten des Melonenbaumes *Carica papaya* gewonnen. Papain wird zur enzymatischen Fleischreifung (Ashie *et al.*, 2002; Kim & Taub, 1991), zur Gewinnung von Proteinhydrolysaten (Morais *et al.*, 2005) sowie im medizinischen Bereich verwendet (Ruttloff, 1994). Bromelain ist Bestandteil der Stängel und der Frucht der Ananaspflanze. Von Bedeutung ist Bromelain u. a. bei der enzymatischen Fleischreifung (Kim & Taub, 1991) und im medizinischen Bereich hier vor allem in der Sportmedizin und Sporttraumatologie (Berg *et al.*, 2005). Keratinasen stammen aus unterschiedlichen Pflanzen und haben die Fähigkeit keratinhaltige Stoffe wie Haare und Wolle abzubauen (Rao *et al.*, 1998).

Die wichtigsten Proteasen tierischer Herkunft sind Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Rennin (Rao *et al.*, 1998). Die Gewinnung von Trypsin und Chymotrypsin erfolgt über deren Vorstufen Chymotrypsinogen und Trypsinogen aus tierischen Bauchspeicheldrüsen, vor allem aus Rinderpankreas. Trypsin wird zur Herstellung von Mediumskomponenten für die Bio-

technologie, in der Zellkulturtechnik zum Ablösen von adhärennten Zellen vom Kulturgefäß oder zum Vereinzeln von Zellen (Chiplonkar *et al.*, 1985) und für medizinische Anwendungen eingesetzt (Ruttloff, 1994). Chymotrypsin wird aufgrund seiner kostspieligen Herstellung ausschließlich für diagnostische und analytische Zwecke eingesetzt (Rao *et al.*, 1998). Die saure Pepsinase Pepsin wird aus dem Magensaft frisch geschlachteter Schweine und Rinder aus deren Vorstufe Zymogen (Pepsinogen) durch Säureeinwirkung autokatalytisch gewonnen. Zusammen mit dem Labenzym Rennin (Chymosin), gewonnen aus den Mägen säugender Kälber, wird es für die Gerinnung der Käsereimilch verwendet (Böhm, 2003).

Der größte Nachteil der pflanzlichen und tierischen Proteasen liegt in der Abhängigkeit der Herstellung von der Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien. Bei diesen handelt es sich hauptsächlich um Schlachtnebenprodukte oder Abfallstoffe der fleischverarbeitenden Industrie oder um Pflanzenmaterialien (Ruttloff, 1994). Der schwankende Enzymgehalt der Rohstoffe stellt ein weiteres Problem dar. Der weltweite Bedarf an Enzymen kann daher nicht aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden (Rao *et al.*, 1998).

Die wichtigsten Herstellungsverfahren von Proteasen beruhen auf der Kultivierung von Mikroorganismen insbesondere von Bakterien aber auch von Pilzen (Rao *et al.*, 1998). Durch hohe Wachstumsgeschwindigkeiten, den geringen Platzbedarf bei der Kultivierung und die Möglichkeit der genetischen Veränderung bilden sie eine ausgezeichnete Basis für die fermentative Herstellung von Enzymen. Bei 40 % der weltweit verkauften Enzyme handelt es sich um mikrobiell gewonnene Proteasen (Rao *et al.*, 1998). Die meisten kommerziell erhältlichen Proteasen werden durch Bakterien des Genus *Bacillus* gewonnen.

2.5.5 Eigenschaften der alkalischen Proteasen

Das pH-Optimum der alkalischen Proteasen liegt generell zwischen pH 9 und 11 (Kumar & Takagi, 1999). Sie besitzen hohe isoelektrische Punkte und sind stabil zwischen pH 6 und 12. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 50 °C und 70 °C. Sowohl beim pH-Wert als auch bei der Temperatur gibt es Proteasen mit abweichenden Eigenschaften. Die Molmasse der alkalischen Proteasen liegt bis auf wenige Ausnahmen zwischen 15 kDa und 30 kDa. Alkalische Proteasen benötigen divalente Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} oder eine Kombination dieser Kationen für die katalytische Wirkung (Kumar & Takagi, 1999).

2.5.6 Einsatz der alkalischen Proteasen

Alkalische Proteasen besitzen einen breiten industriellen Anwendungsbereich. Sie werden in Waschmitteln, in der Lederverarbeitung, in der Silberrückgewinnung, in medizinischen Bereichen, in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie, in der chemischen Industrie, der Abwasserbehandlung sowie weiteren Bioremediationsprozessen eingesetzt.

Proteasen sind Inhaltsstoff vieler Arten von Reinigungsmitteln, wie Waschmittel für den Hausgebrauch und Reinigungslösungen für Kontaktlinsen und Zahnprothesen. Allein 25 % der weltweit verkauften Enzyme sind Proteasen für den Einsatz in Reinigungsmitteln (Rao *et al.*, 1998).

In der Lederindustrie werden Proteasen u. a. zum Enthaaren von Fellen und Häuten eingesetzt (Tang *et al.*, 2002). Alkalische Bedingungen ermöglichen das Quellen der Haarwurzel und den Angriff der Protease auf die Proteine des Haarfollikels (Varela *et al.* 1996).

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Rückgewinnung von Silber aus belichtetem Röntgen- und Filmmaterial. Dieses Material enthält etwa 1,5 % - 2,0 % Silber in der Gelatineschicht (Kumar & Takagi, 1999). Bei dem konventionellen Verfahren zur Rückgewinnung wird das Filmmaterial verbrannt, was die vorhandene Polyesterschicht einer Wiederverwertung verschließt. Die enzymatische Behandlung ermöglicht durch die Hydrolyse der Gelatineschicht nicht nur die Rückgewinnung des Silbers sondern auch das Recycling der Polyesterschicht (Fujiwara *et al.*, 1991).

In der pharmazeutischen Industrie werden Proteasen z. B. auf Verbänden immobilisiert und damit zur Behandlung von Verbrennungen und eitrigen Wunden genutzt (Kumar & Takagi, 1999). Darüber hinaus ist ein Einsatz zur Auflösung von Blutgerinnseln (Kim *et al.*, 1996) und als Inhaltsstoff in Wundsalben bekannt.

Innerhalb der Lebensmittelindustrie werden alkalische Proteasen in der Fleischindustrie zum Zartmachen (Fleischreifung) von Rindfleisch eingesetzt (Ruttloff, 1994). Außerdem lassen sich durch Proteasebehandlung aus pflanzlichen und tierischen Quellen Hydrolysate mit gut definierter Zusammensetzung und hohem ernährungsphysiologischen Wert herstellen (Kumar & Takagi, 1999). Die Bitterkeit von Proteinhydrolysaten kann durch den Einsatz alkalischer

Proteasen gesenkt werden (Rao *et al.*, 1998). Proteinhydrolysate werden als Bestandteil von diätischen Lebensmitteln, als Zusatz zu Infusionen für die parenterale Ernährung sowie als Aromastoffe genutzt.

Daneben werden alkalische Proteasen zur Behandlung von Industrie- und Haushaltsabwässern und -abfällen eingesetzt. Ziel der Behandlung kann die Gewinnung von Proteinhydrolysaten, Peptiden oder Aminosäuren (Kida *et al.*, 1995), die Entfernung von keratinhaltigen Materialien aus Haushaltsabwässern (Mukhopadhyay & Chandra, 1992) oder Haaren aus Abflussrohren sein (Kumar & Takagi, 1999).

In der chemischen Industrie werden alkalische Proteasen zur Peptidsynthese eingesetzt (Gupta *et al.*, 2002).

Neben den genannten Anwendungsbereichen spielen Proteasen bei der Grundlagenforschung eine wichtige Rolle. Deren Eigenschaft der selektiven Spaltung von Peptidbindungen wird sich bei der Sequenzierung von Proteinen und der Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion zu Nutze gemacht (Rao *et al.*, 1998).

3 Material

3.1 Geräte

Abgasanalysator	Hartmann und Braun URAS 10E
Autoklav	Zirbus VST 50/70 Fedegari, 336 D79
Brutraum	Weiss Technik, 37 °C
Einmalküvetten	Brand, Plastibrand® 1,5 mL halbmikro
Eismaschine	Scotmann AF 10
Reaktionsgefäße	Böttger, 1,5 und 2,0 mL
Gefrierschrank	Privileg, -20 °C Revco Scientific Inc. ULT1786-5-V-U-A, -80 °C
Pipetten	Gilson, 2, 20, 200, 1000 µL
Hochdruckhomogenisator	Rannie, Mini-Lab 8.30 H
Keimzählgerät	WTW, BZG 28
Kühlraum	Viessmann, Kühlzelle KS 100S, 4 °C
Lyophilisationsgerät	Christ, Beta 1-8K, Typ 100802
Magnetrührer	IKA Labortechnik, IKAMAG RCT
pH-Meter	Metrohm, 691
Phasenkontrastmikroskop	Olympus BX 40
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, ultratip 1000 Greiner bio-one, ultratip 200
Photometer	Pharmacia LKB, Biochrom 4060 Shimadzu, UV-1202
Probennehmer	Gilson®, Fraction collector FC 203 B
Reinstwasseranlage	Seralpur, Pro 90 CN
Rotationsschüttler	Braun, Certomat R, 2,5 cm Amplitude HT Infors AG, Aquatron, 1,25 cm Amplitude
Rührkesselreaktor	MBR Bioreaktor, LAB 7 L MBR Bioreaktor, LAB 30 L
Sterilbank	Heraeus LaminAir HB 2448
Vakuum-Trockenschrank	Heraeus, VT 5042 EK
Vortex-Mischer	Scientific Industries, Vortex-genie 2™
Waagen	Mettler, AE 260 Deltarange, 0,1 mg - 1,5 g Kern, Serie 822-33, 1,5 g - 250 g Mettler, PM34-K Deltarange, > 250 g
Wasserbad	GFL, Typ 1013 IKA Labortechnik, IKA Ter 2
Zentrifuge	Julabo F10 Sigma 1-15, 24 x 5 g

Braun, Sigma 3K20, max. 320 ml Gesamtvolumen, mit Kühlung

Braun, Sigma 6K21, max. 3 l Gesamtvolumen, mit Kühlung

3.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurde bei den Reinsubstanzen die Qualität *p. A.* verwendet. Im Rahmen der Medientvorbereitung wurde Leitungswasser eingesetzt, während für die zur Analytik eingesetzten Lösungen demineralisiertes Wasser verwendet wurde.

Medien

Agar-Agar	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Ammoniumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Casein nach Hammarsten	Merck
Caseinpepton	Carl Roth
Diammoniumsulfat	Carl Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Eisensulfat Heptahydrat	Merck
Ethidiumbromid	Carl Roth
Glycerin	Caldic
Glucose Monohydrat	Carl Roth
Hefeextrakt	Biospringer, Charge: 339
Hefeextrakt	Ohly, Typ: KAT, Charge: EO100504
Kaliumdihydrogensulfat	VWR
Kartoffelstärke	TIP
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Riedel-de Haen
Maltose Monohydrat	Fluka
Mangansulfat Monohydrat	Carl Roth
Maisstärke	Sigma-Aldrich, Charge: 015K0144
Maisquellwasser	Sigma-Aldrich, Charge: 045K0113
Natriumcaseinat aus boviner Milch	Sigma-Aldrich, Charge: 025K0050

Natriumchlorid	VWR
Pluronic [®] PE-8100	BASF
Saccharose	Carl Roth
Sojamehl, Typ I, nicht geröstet	Sigma-Aldrich, Charge: 103K0093
Sojapepton	UD Chemie, Typ: CM, Charge: 700/203
Streptomycin	Gerbu

Korrekturmittel

Ammoniakwasser, technisch, 25 %	VWR
Natronlauge, technisch, 50 %	Carl Roth
<i>o</i> -Phosphorsäure, technisch, 87 %	VWR
Salzsäure, technisch, 32 %	Fisher Scientific
Schwefelsäure, technisch, 95 %	VWR
Kaliumhydroxid, <i>p. A.</i>	Carl Roth
Natriumhydroxid, <i>p. A.</i>	Carl Roth

Analytik

suc- <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Phe- <i>p</i> -Nitroanilid	Bachem
Acrylamid	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	Carl Roth
Bactident [®] Aminopeptidase	Merck
Bisacrylamid	Carl Roth
Brij [®] -35	Sigma diagnostics
Bromphenolblau	Fluka
Commassieblau	Merck
3,5-Dinitrosalicylsäure	Fluka
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Diphenylamin	Fluka
DNA-Leiter, 1 kb	Fermentas
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
Essigsäure (Eisessig)	VWR

Ethanol	VWR
Isopropanol	VWR
Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat	Merck
β -Mercaptoethanol	Carl Roth
Mercaptopropionsäure	Sigma-Aldrich
Methanol	VWR
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Merck
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Perchlorsäure, 60 %	Fluka
<i>o</i> -Phthaldialdehyd (OPA)	Fluka
Proteinmarker, prestained	Fermentas
Roti [®] -Nanoquant [™] , 5-fach Konzentrat	Carl Roth
Salzsäure, 32 %	VWR
Schwefelsäure, 95 %	Carl Roth
Tetrahydrofuran (THF)	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham
Tris-Base / Tris-HCl	Carl Roth
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)	Fluka

Standards für Kalibrierungen

Glucose Monohydrat	Carl Roth
Kalbsthymus-DNA	Fluka
Maltose Monohydrat	Fluka
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth
<i>L</i> -Threonin	Ajinomoto

Enzyme

Alkalische Protease	Novozymes, Alcalase [®] 2.4 L FG, E.C. 3.4.21.62
Lysozym	Merck, E.C. 3.2.1.17
α -Amylase	Novozymes, Termamyl [®] 120 L, E.C. 3.2.1.1

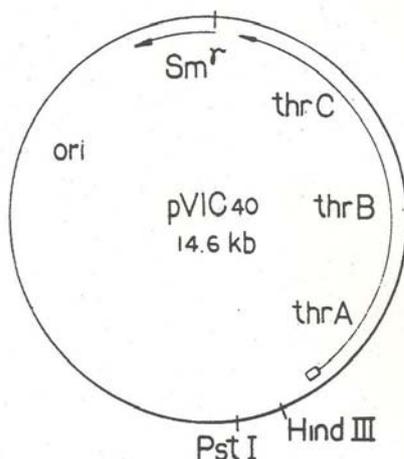
3.3 Bakterienstämme

3.3.1 *Klebsiella planticola*

Bei dem verwendeten Stamm handelt es sich um den *Klebsiella planticola* (*Raoultella planticola*) Stamm DSMZ 4617 (ATCC 15050), bezogen von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ, Braunschweig. Bei den Bakterien der Gattung *Klebsiella* handelt es sich um Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae. Sie sind nicht zur Sporenbildung befähigt, unbeweglich, unbegeißelt und können von einer Kapsel umgeben sein. Benannt wurden sie nach dem amerikanischen Bakteriologen Theodor Klebs.

3.3.2 *Escherichia coli* B-3996

Escherichia coli ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges und peritrich begeißeltes Bakterium, das im menschlichen und tierischen Darm vorkommt. Es gehört wie *Klebsiella planticola* zur Familie der Enterobacteriaceae. Benannt wurde es 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich.



Bei dem verwendeten Threoninproduzenten handelt es sich um den *Escherichia coli* K12 Abkömmling B-3996. Er ist hinterlegt in der Nationalen Russischen Sammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland). Er enthält das 14,6 kB große Plasmid pVIC40 (**Abbildung 3.1**). Als Selektionsmarker dient eine Streptomycinresistenz (Sm).

Abbildung 3.1: Plasmid pVIC40 (Debabov *et al.*, 1996)

Die Gene *thrA* (Aspartatkinase I), *thrB* (Homoserinkinase) und *thrC* (Threoninsynthase) bilden ein Operon und codieren für Enzyme des Threoninsyntheseweges. Der Stamm besitzt eine Resistenz gegenüber einer intrazellulären Threoninkonzentration von circa 5 g L⁻¹.

Außerdem verfügt er über die Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Genauere Informationen über den Stamm enthalten die US Patente US 5 175 107 (Debabov *et al.*, 1992) und US 5 538 873 (Debabov *et al.*, 1996).

3.3.3 *Bacillus licheniformis* P300

Bacillus licheniformis ist ein Gram-positives, begeißeltes, fakultativ anaerobes und zur Bildung von Endosporen fähiges Stäbchen. Der verwendete *Bacillus licheniformis* P300 Stamm produziert die Protease Subtilisin Carlsberg. Er besitzt kein Plasmid. Die Beweglichkeit zeigt sich im Mikroskopbild durch eine taumelnde Bewegung der Zellen.

3.4 Medien und Stammhaltung

3.4.1 Medien zur Kultivierung von *Klebsiella planticola*

Für die Kultivierungen wurden zwei unterschiedliche Medien ausgewählt. Zum einen diente das Terrific-Broth (TB-Medium) (**Tabelle 3.1**) zur Biomassengewinnung für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab. Zum anderen wurde ein halbsynthetisches Medium (bezeichnet als modifiziertes A1-160, **Tabelle 3.2**) mit Glucose und Maltose als Hauptkohlenstoff- und Energiequellen für die Wachstumsversuche genutzt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des TB-Mediums

Komponente	[g L ⁻¹]
Sojapepton	12,0
Hefeextrakt, ohly	24,0
Glycerin	4,0
KH ₂ PO ₄	2,3
K ₂ HPO ₄	11,5

Der Kaliumphosphatpuffer des TB-Mediums musste, um Präzipitatbildung vorzubeugen, separat autoklaviert werden. Ebenso wurde mit der Glucose- / Maltoselösung des halbsyntheti-

schen Mediums verfahren, um eine Reaktion dieser reduzierenden Zucker mit Aminosäuren, Peptiden und Proteinen des Hefeextraktes zu vermeiden (Maillard-Reaktion).

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des halbsynthetischen Mediums (modifiziertes A1-160)

Komponente	[g L ⁻¹]
Glucose	40,0
Hefeextrakt, ohly	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,40
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02
MnSO ₄ · H ₂ O	0,02
Maltose	10,0

Als Korrekturmittel wurden bei Verwendung des TB-Mediums 2 M Natronlauge und 10 %ige Phosphorsäure und bei Verwendung des halbsynthetischen Mediums 20 %ige Schwefelsäure und 25 %iges Ammoniakwasser eingesetzt.

3.4.2 Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996

Das während der Arbeiten mit diesem Stamm verwendete Medium zählt zu den halbsynthetischen Medien (**Tabelle 3.3**). Es enthält Saccharose als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle. Als anorganische Stickstoffquelle dient Ammoniumsulfat. Nach dem Autoklavieren wurde zur Erhöhung der segregativen Plasmidstabilität Streptomycin sterilfiltriert hinzugegeben.

Als Korrekturmittel wurde 20 %ige Schwefelsäure und 25 %iges Ammoniakwasser verwendet. Die Base wurde gleichzeitig als zusätzliche Stickstoffquelle genutzt. Das Ammoniakwasser war für dieses Medium als externe Stickstoffquelle essentiell. Es war darauf zu achten, dass das Ammoniakwasser nicht autoklaviert wird und die Schwefelsäure aufgrund ihrer korrosiven Wirkung während der Hitzesterilisation nicht mit Stahl in Kontakt kommen durfte.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Mediums A1-160 (Hermann & Rieping, 2003)

Komponente	[g L⁻¹]
Saccharose	40,0
Hefeextrakt, Biospringer	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,40
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02
MnSO ₄ · H ₂ O	0,02
Streptomycin	0,10

3.4.3 Medien zur Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300

Für die Kultivierungen wurden verschiedene Medien eingesetzt. Zum einen diente das HSG-Medium (**Tabelle 3.4**) zur Biomassengewinnung für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab. Zum anderen wurden unter Produktionsbedingungen zwei Medien (**Tabelle 3.5** und **Tabelle 3.6**) eingesetzt, die aus zahlreichen komplexen Einzelsubstraten bestanden. Aufgrund der Unlöslichkeit bzw. der geringen Löslichkeit einiger Komponenten besaßen beide Medien einen erheblichen Feststoffanteil (breiige Konsistenz).

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des HSG-Mediums

Komponente	[g L⁻¹]
Glycerin	14,9
Sojapepton	13,5
Hefeextrakt, ohly	7,0
NaCl	2,5
K ₂ HPO ₄	2,3
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ · H ₂ O	0,14

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Vorkulturmediums (KV-Medium)

Komponente	[g L⁻¹]
Kartoffelstärke	40,0
Casein nach Hammarsten	4,0
Sojamehl	2,0
Maisquellwasser	8,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,6

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Fermentationsmediums (KF-Medium)

Komponente	[g L⁻¹]
Maisstärke	90,0
Na-Caseinat	26,0
Sojamehl	19,0
Maisquellwasser	7,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5
Na ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,2
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,048
MnSO ₄ · H ₂ O	0,020

Herstellung des Vorkulturmediums

Zur Herstellung des Vorkulturmediums musste zunächst die Kartoffelstärke verkleistert und anschließend verflüssigt werden. Dazu wurde sie in einem Viertel der Gesamtmenge an benötigtem Wasser suspendiert, der pH-Wert durch Zugabe einer 2 M Kaliumhydroxidlösung auf 6,5 eingestellt, mit einer α -Amylase (Termamyl[®] 120 L, E.C. 3.2.1.10, Novozymes) versetzt und bei 90 °C in einem Wasserbad mit integriertem Magnetrührer bis zur vollständigen Hydrolyse unter ständigem Rühren inkubiert. Das Natriumcaseinat wurde in einem weiteren Viertel Wasser suspendiert, mit der Kaliumhydroxidlösung auf pH = 8,5 eingestellt und unter Rühren und Erwärmen auf 60 °C gelöst. Alle übrigen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge im restlichen Wasser gelöst und mit dem Stärkehydrolysat und der Caseinlösung vermischt. Nach der pH-Werteinstellung auf pH = 7,0 wurde das Medium für 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Herstellung des Hauptkulturmediums

Das Hauptkulturmedium schäumte aufgrund des hohen Proteinanteils während der thermischen Inaktivierung sehr stark. Daher wurden dem Fermenter vor der Sterilisation mehrere Tropfen Antischaummittel hinzugegeben.

Zur Hydrolyse der Maisstärke, die als wichtigste C-Quelle während der Kultivierung diente, wurden dieselben Parameter wie für die Kartoffelstärke gewählt. Durchgeführt wurde die Verkleisterung und Verflüssigung jedoch in einem 7 L Bioreaktor. Dazu wurde die für zwei Kultivierungen benötigte Menge an Stärke (720 g) in 4 L Wasser suspendiert und entsprechend behandelt. Das Caseinat und das Sojamehl wurden zusammen unter Rühren und Erwärmen auf 60 °C in einem Viertel des Gesamtvolumens Wasser gelöst. Alle übrigen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge im restlichen Wasser gelöst und mit Stärkehydrolysat sowie der Casein- und Sojamehllösung vermischt. Das Medium wurde im Fermenter für 60 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Aufgrund der hohen Keimbelastung des Maisquellwassers ist eine Haltezeit von einer Stunde gewählt worden.

Im Gegensatz zum industriellen Prozess wurde im Labormaßstab der pH-Wert über eine Regelung konstant gehalten. Als Korrekturmittel kamen 2 M Schwefelsäure und 2 M Natronlauge zum Einsatz.

3.4.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung der Mikroorganismen wurden Glycerinkulturen für eine Lagerung bei -80 °C hergestellt. Dazu wurden zu 870 µL Bakterienkultur 130 µL 88 %iges Glycerin gegeben. Die Proben wurden gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.5 Bioreaktoren

Die Kultivierungen wurden in einem 7 L und 30 L Rührkesselbioreaktor der Firma MBR (Wetzikon, Schweiz) durchgeführt. 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. Die geometrischen Abmessungen der

Rührkesselreaktoren sind der **Abbildung 3.2** sowie der dazugehörigen **Tabelle 3.7** zu entnehmen.

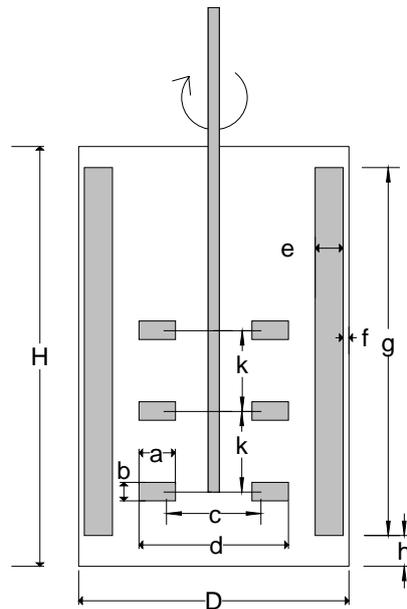


Abbildung 3.2: Standardisierte Abmessungen von Bioreaktoren

Tabelle 3.7: Abmessungen der verwendeten Bioreaktoren

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

Abbildung 3.3 zeigt schematisch den Aufbau der Bioreaktoren mit der Peripherieausrüstung. Der 7 L Rührkesselreaktor bestand aus einem doppelwandigen Stahlunterteil, welches Ansatzstutzen für die Messsonden enthielt und einem Glaszylinder als Oberteil. Der 30 L Bioreaktor bestand aus einem durchgehenden doppelwandigen Stahlgefäß. Die Deckel beider Bioreaktoren waren aus Edelstahl und enthielten Durchgänge für die Zuluftleitung, die Abluftkühlung sowie diverse Stutzen zum Anschluss von Messsonden bzw. zur Ankopplung von Vorlagegefäßen zur Dosierung von Säure, Lauge und Antischaummittel. Die Bioreaktoren enthielten seitlich vier Stromstörer und zwei (7 L) bzw. drei (30 L) 6-Blatt-Scheibenrührer. Die Rührerwelle war über eine Magnetkupplung mit dem Rührermotor verbunden. Die Temperierung der Reaktoren erfolgte über die Doppelmäntel durch das geregelte Einleiten von Kühlwasser oder Sattdampf. Die Begasung des Kulturmediums wurde über einen Begasungsring realisiert. Keimfreie Bedingungen wurden durch Sterilfilter in der Zu- und Abluftstrecke gewährleistet. Die Abluftstrecke des 30 L Reaktors enthielt zusätzlich ein Nadelventil für die Regelung des Reaktorinnendrucks. Über ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil, welches im Boden des Bioreaktors eingebaut war, konnten Proben manuell entnommen werden.

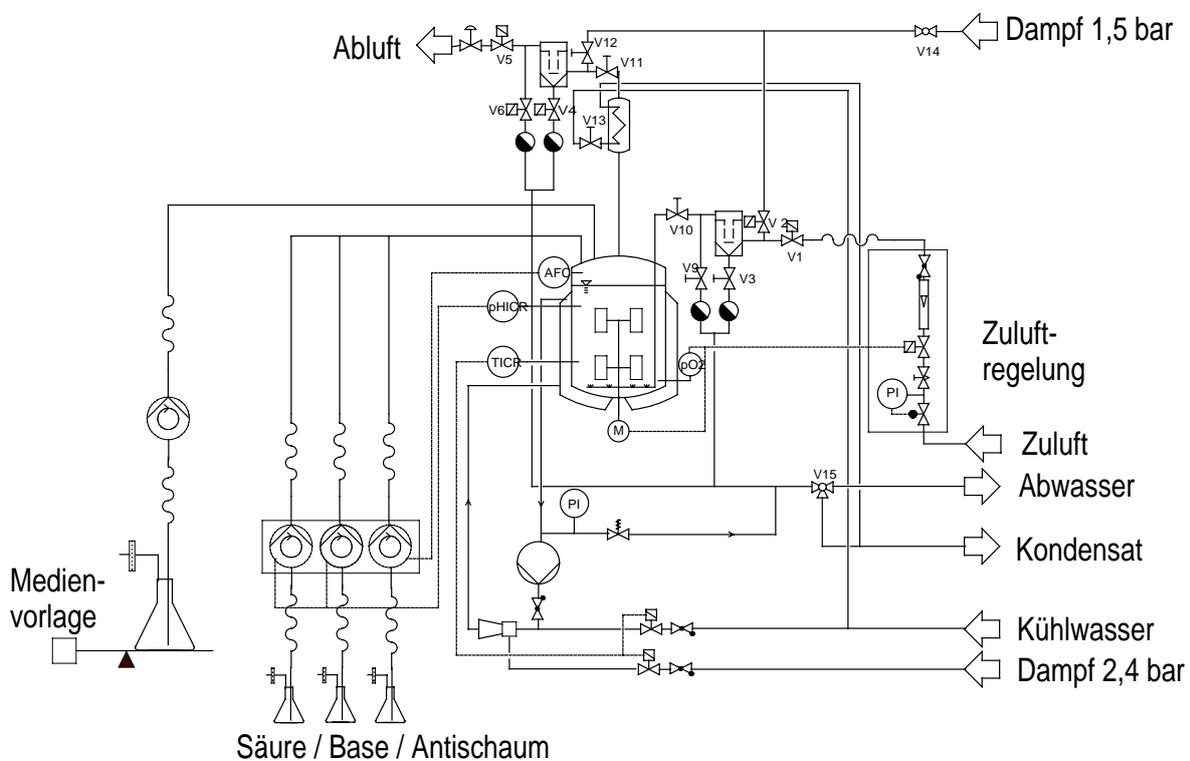


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der eingesetzten Rührkesselreaktoren mit Peripherieausrüstung

Die Bioreaktoren waren mit einer Reihe verschiedener Messsonden und -instrumente ausgestattet. Standardmäßig erfolgte die Messung des Reaktorinnendrucks über einen Druckaufnehmer und die Messung der Temperatur über ein Pt100-Widerstandsthermometer. Eine konduktometrisch arbeitende Schaumsonde diente zur Schaumkontrolle. Für die Überwachung des pH-Wertes diente eine hitzesterilisierbare pH-Einstabmesskette (Fa. Mettler Toledo), die vor der Sterilisation mit Pufferlösungen kalibriert und mit einem Überdruck von ca. 2 bar versehen wurde. Die relative Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) wurde mit Hilfe eines polarographischen O_2 -Sensors (Fa. Mettler Toledo) gemessen, der durch Begasung des Mediums im Reaktor mit Stickstoff und Luft unter Kultivierungsbedingungen kalibriert wurde. Die Kontrolle des Luftvolumenstroms erfolgte über eine Luftzufuhr-Regelungseinheit. Zusätzlich wurde bei einigen Fermentationen die zudosierte Laugemenge durch eine Waage dokumentiert.

Die Bestimmung der Sauerstoff- und der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft wurde entweder mittels des kombinierten Abgasanalysestystems URAS 10E der Firma Hartmann und Braun oder nur die Kohlendioxidkonzentration mit Hilfe des CO_2 -Transmitters der Firma Vaisala (Typ GMT221) gemessen.

Die Steuerung der Bioreaktoren erfolgte durch eine direkte, digitale Kontrolleinheit (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, pO_2 , Rührerdrehfrequenz, Reaktorinnendruck, Luftvolumenstrom und Zugabe von Antischaummittel.

Der VME-Bus-Rechner übernahm die übergeordnete Steuerung des Prozesses. Digitale Steuereinheit, Waagen, Abgasanalytik und Pumpen waren mit diesem Rechner verbunden, so dass alle Prozessparameter und Prozessdaten kontinuierlich erfasst, gespeichert und entsprechend visualisiert werden konnten. Die Eingabe der Sollwerte erfolgte ebenfalls über diesen Prozessrechner. Außerdem wurden die Säure-, Base- und Antischaumpumpen angesteuert und der pO_2 z. B. über die Rührerdrehfrequenz geregelt.

Die Visualisierung erfolgte auf einem VT340-Terminal mit zwei voneinander getrennten, umschaltbaren Benutzerebenen. Das Betriebssystem des Rechners war OS9, während die

Kontrolle und Steuerung des Prozesses vom Prozessleitsystem Caroline II (Fa. PCS, Schweiz) ausgeführt wurde.

Die Hitzesterilisation des mit Kulturmedium befüllten Bioreaktors wurde für 25 Minuten bzw. 60 Minuten (KF-Medium, *Bacillus licheniformis*) bei 121 °C automatisch durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte die Sterilisation der Zu- und Abluftstrecke. Nach dem Abkühlen wurde das gewünschte Startvolumen durch Zugabe von separat autoklaviertem sterilen Wasser eingestellt. Hitzempfindliche Mediumsbestandteile wurden durch Septen sterilfiltriert in den Bioreaktor gegeben. Über ein Septum im Deckel wurde das getrennt autoklavierte Korrekturmittelbesteck angeschlossen.

Nach Einstellung und Erreichen der Sollwerte wurde die Kultivierung durch Animpfen mit Inokulationskultur durch ein Septum gestartet.

4 Methoden

4.1 Kultivierungsparameter

Die gewählten Fermentationssollwerte lassen sich **Tabelle 4.1** entnehmen.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Fermentationsparameter

Parameter	Stamm		
	<i>Escherichia coli</i> B-3996	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> P300
Vorkulturmedium	A1-160	modifiziertes A1-160	LB- / KV-Medium
Kulturmedium	A1-160	modifiziertes A1-160	KF-Medium
Animpfvolumen	50 mL	50 mL	40 mL
Bioreaktor	7 L analog	7 L analog	7 L analog
Belüftung	1 vvm	1 vvm	2 vvm
pH	6,9	7,0	7,0
Temperatur	37 °C	37 °C	39 °C
pO ₂ -Sollwert	20 %	60 %	60 %
Arbeitsvolumen	5 L	5 L	4 L
Rührerdrehfrequenz	500 min ⁻¹ ≤ n ≤ 2000 min ⁻¹		

Als Inokulum für alle Kultivierungen wurden über Nacht inkubierte Schüttelkolbenkulturen verwendet. Vor dem Animpfen wurde die Vorkultur mikroskopisch auf eine Kontamination untersucht und die optische Dichte bestimmt. Außerdem wurden die Vorkulturen für die *Bacillus licheniformis* P300 Kultivierungen mit Hilfe eines Teststreifens (Bactident[®] Aminopeptidase, Merck) auf die Abwesenheit der *L*-Alanin-Aminopeptidase überprüft.

Die *L*-Alanin-Aminopeptidase ist ein in der Bakterienzellwand lokalisiertes Enzym, das in relevanter Aktivität praktisch nur bei Gram-negativen Bakterien gefunden wurde. Dieses Enzym spaltet die Aminosäure *L*-Alanin aus unterschiedlichen Substraten heraus. Bei den Teststäbchen wird das Substrat *L*-Alanin-4-nitroanilid bei Anwesenheit der *L*-Alanin-Aminopeptidase in 4-Nitroanilin und *L*-Alanin gespalten. Aufgrund der Gelbfärbung durch das 4-Nitroanilin wird die Anwesenheit der *L*-Alanin-Aminopeptidase nachgewiesen.

Um eine Sauerstofflimitierung während der Kultivierung zu vermeiden, wurde der pO_2 -Wert durch stufenweise Erhöhung der Rührerdrehfrequenz ($n_{\max} = 2000 \text{ min}^{-1}$) konstant gehalten.

Die Probennahme während der Kultivierungen im Bioreaktor erfolgte durch einen automatischen Probennehmer der Firma Gilson. In regelmäßigen Abständen wurde durch einen seitlichen Stutzen im Bioreaktor jeweils ein Volumen von 24 mL entnommen. Die ersten 12 mL wurden als Vorlauf verworfen. Die erhaltenen Proben wurden in einem Kühlblock auf 4 °C gekühlt und dann der Analytik zugeführt.

4.2 Zellernte

Wenn nicht anders angegeben, wurde die fest-flüssig Trennung nach beendeter Fermentation durch einen Zentrifugationsschritt bei 17.000g für 10 Minuten durchgeführt. Das gewonnene Zellpellet wurde bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3 Fermentationsanalytik

4.3.1 Übersicht

Dieses Kapitel stellt die während der Arbeiten benötigten Methoden vor. In **Tabelle 4.2** werden zur schnellen Orientierung die verschiedenen Analysen den drei untersuchten Systemen (*Klebsiella planticola*, *Escherichia coli* B-3996, *Bacillus licheniformis* P300) zugeordnet. Die tabellarisch aufgeführten Methoden werden anschließend in den folgenden Kapiteln im Einzelnen vorgestellt.

Tabelle 4.2: Übersicht über die durchgeführten Analysen

Analyse	Stamm		
	<i>Escherichia coli</i> B-3996	<i>Klebsiella</i> <i>planticola</i>	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> P300
Optische Dichte	+	+	+
Biotrockenmassekonzentration	+/-	+	-
Trockenmasse	-	-	+
Zellzahldichte	-	-	+
Seg. Plasmidstabilität	+	-	-
Glucose	+	+	+
Saccharose	+	-	-
Glycerin	-	+/-	-
Reduzierende Zucker	-	+	+
L-Threonin	+	-	-
α -Aminogruppen	+/-	-	-
Proteaseaktivität	-	-	+
Kohlenstoff/ Stickstoff	+	+	+
Proteinkonzentration	-	-	+
Protein, qualitativ	+/-	+/-	+/-
DNA, qualitativ	+/-	+/-	+/-
L-Amino-peptidase	-	-	+

+: durchgeführt; -: nicht durchgeführt; +/-: teilweise durchgeführt

Die Analytik umfasste neben Methoden zur direkten und indirekten Verfolgung des Wachstums auch Methoden zur Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen oder -aktivitäten. Außerdem ist für eine Charakterisierung der Kultivierungen eine Bilanzierung des Kohlenstoffs und des Stickstoffs durchgeführt worden. Zusätzlich wurden Methoden ein-

gesetzt, mit deren Hilfe ein qualitativer als auch quantitativer Nachweis von genomischer DNA und RNA sowie von Proteinen möglich war.

Die Probennahme erfolgte gewöhnlich stündlich, am Anfang der Fermentation verlängerte sich das Intervall und am Ende verkürzte es sich meist.

Bei den Kultivierungen mit *Bacillus licheniformis* P300 wurde am Ende der Kultivierung ein Nachweis der L-Alanin-Aminopeptidase durchgeführt (Bactident[®] Aminopeptidase, Merck). Damit sollte eine Kontamination durch Gram-negative Organismen ausgeschlossen werden.

4.3.2 Bestimmung der optischen Dichte

Für die Bestimmung der optischen Dichte wurde ein Einstrahlphotometer (UV-1202, Shimadzu) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm verwendet. Die Messung erfolgte gegen Leitungswasser als Referenz. Verdünnungen wurden ab einer optischen Dichte größer 0,8 mit Leitungswasser vorgenommen. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.3.3 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration diente neben der Bestimmung der optischen Dichte zur Verfolgung der Zelldichte. In getrocknete und gewogene 2 mL Reaktionsgefäße wurden 1,8 mL Bakteriensuspension pipettiert und gewogen. Die fest-flüssig Trennung erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 14.000 rpm). Der Überstand wurde für weitere Analysen bei -20 °C gelagert und das Zellpellet mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur Gewichtskonstanz bei 60 °C im Vakuumtrockenschrank getrocknet und anschließend erneut gewogen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. **Abbildung 4.1** und **Abbildung 4.2** zeigen die Korrelation der optischen Dichte mit der Zelltrockenmasse für die beiden Enterobacteriaceae. Für die Bestimmung der Korrelation wurde im Fall des *E. coli*-Stammes die optische Dichte gegen A1-160-Medium gemessen, sodass die Gerade durch den Nullpunkt geht.

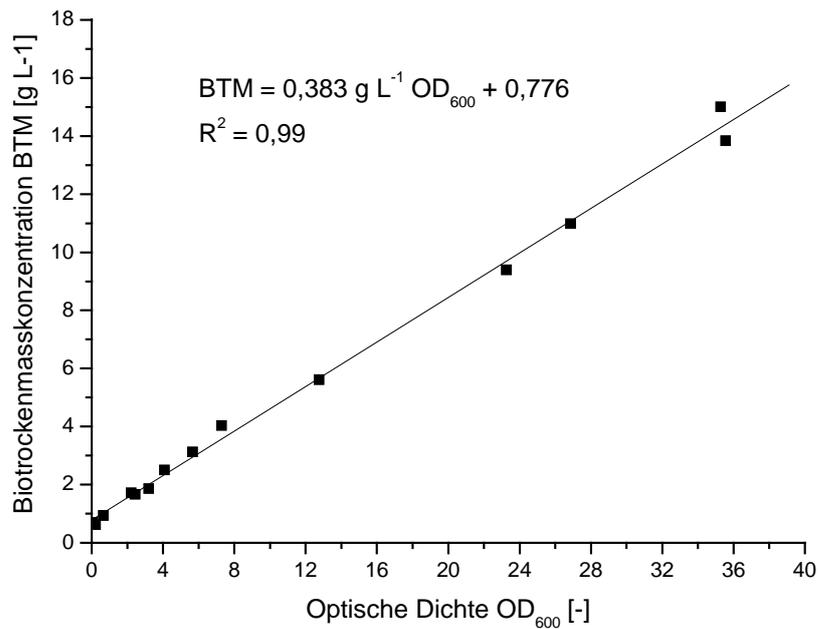


Abbildung 4.1: Korrelation der Biotrockenmassekonzentration mit der optischen Dichte (*Klebsiella planticola*, modifiziertes A1-160)

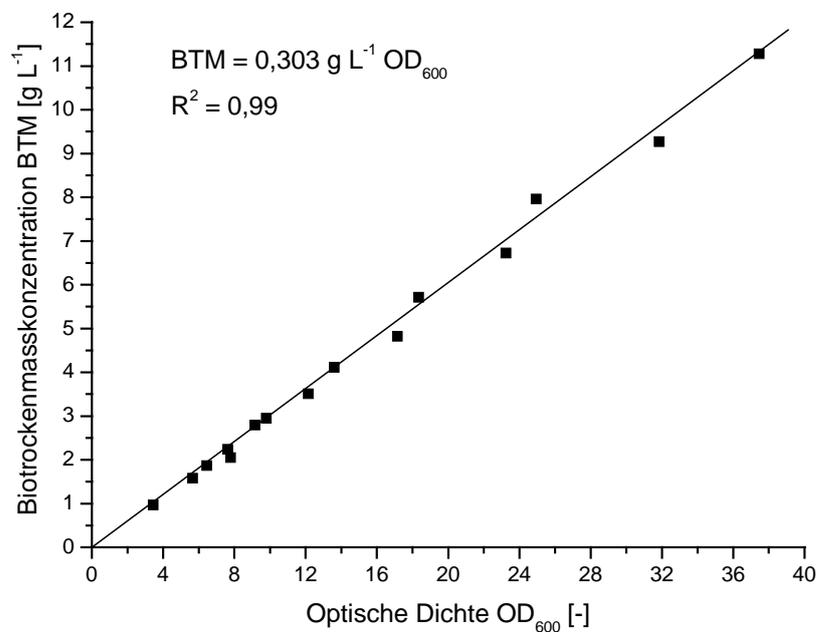


Abbildung 4.2: Korrelation der Biotrockenmassekonzentration mit der optischen Dichte (*E. coli* B-3996, A1-160)

4.3.4 Bestimmung der Zellzahldichte

Die Bestimmung der Zellzahldichte erfolgte mit Hilfe einer Thomakammer. Dazu wurde ein Tropfen gegebenenfalls verdünnter Bakteriensuspension auf die Kammer gegeben und mindestens fünf Felder ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit dem Kammer- ($4 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$) und Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.3.5 Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität

Die Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität wurde durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen und antibiotikafreien TB-Agarplatten bestimmt. Es wurden jeweils zwei Platten von drei Verdünnungen ausplattiert. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass die zu erwartende Keimzahl 1, 10 und 100 betrug. Die Verdünnung erfolgte in Zehnerschritten mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung. Das ausplattierte Volumen betrug 100 μL .

4.3.6 Enzymatische Glucose- und Saccharosebestimmung

Die Bestimmung der Saccharose- und Glucosekonzentration erfolgte mit Enzymtests der Firma Scil Diagnostics. Genaue Informationen zur Probenvorbereitung, Durchführung, Berechnung etc. sind den Herstellerangaben des jeweiligen Tests zu entnehmen.

4.3.7 Bestimmung der Glycerinkonzentration

Mit der Bestimmung der Glycerinkonzentration wurde der Verlauf der Hauptkohlenstoffquelle während der Fermentation auf TB-Medium verfolgt. Diese erfolgte mittels HPLC.

Die Trennung der löslichen Mediumskomponenten fand auf einer Kationenaustauschersäule (Nucleogel ION 300 OA Säule Art. Nr. 719 501) statt. Die Steuerung des Chromatographieablaufes, die Datenaufnahme und die Auswertung erfolgte automatisch mit dem Programm ChromStar der Firma SCPA. Als Elutionsmittel diente 2,5 mM Schwefelsäure. Dieses wurde

mittels einer Pumpe (IRICA PUMP Σ 871, IRICA Instruments INC., Kyoto, Japan) mit einem Volumenstrom von $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ durch das System gefördert. Die Probeninjektion ($20 \text{ }\mu\text{L}$) erfolgte durch einen Autosampler (Marathon, Spark Holland). Bei der Detektion kam ein RI-Detektor (ERC-7515 A, ERMA CR. INC., Tokio, Japan) zum Einsatz. Zur Temperierung der Säule auf $70 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde ein Säulenofen (ERC Gecko 2000, ERMA CR. INC., Tokio, Japan) verwendet.

Vor der Probenaufgabe musste die Säule und die Referenz- sowie die Messkammer des RI-Detektors ausreichend mit Eluent gespült und die Säule äquilibriert werden. Um einen Druckanstieg durch Verstopfen des Säulenmaterials zu vermeiden, mussten die Proben partikelfrei in die Probeentnahmegefäße gegeben werden. Zusätzlich wurde der Eluent filtriert ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) und entgast (Degasser ERC-3612, ERMA CR. INC., Tokio, Japan).

4.3.8 DNS-Methode zur Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Zuckern

Zur Bestimmung des Anteils reduzierender Zucker kommt die Methode nach Miller (Miller, 1959) zum Einsatz. Erstmals wurde die Dinitrosalicylsäure 1921 von Sumner für den Nachweis von reduzierenden Zuckern in Urin eingesetzt (Sumner & Graham, 1921).

Der Nachweis erfolgt über die photometrische Bestimmung der 3-Amino-5-nitrosalicylsäure bei ihrem Absorptionsmaximum von 540 nm . Diese entsteht durch die im alkalischen Milieu stattfindende Reduktion der Dinitrosalicylsäure bei vorheriger Oxidation der freien Aldehydgruppe der reduzierenden Zucker zur Carboxylgruppe.

Durch Bailey erfolgte eine Überarbeitung der Zusammensetzung des bisher eingesetzten DNS-Reagenzes (Bailey, 1988). Es wurde aufgrund der gesundheitsschädlichen Wirkung des Phenols auf dieses verzichtet. Das Reagenz enthält neben der Dinitrosalicylsäure noch Natronlauge und Kaliumnatriumtartrat (Rochelle-Salz). Die Natronlauge ist notwendig, um das alkalische Milieu für die Reduktion bereitzustellen und das Rochellesalz schützt das Reagenz vor Oxidation durch gelösten Sauerstoff. Die Zusammensetzung der DNS-Stopplösung zeigt **Tabelle 4.3**.

Tabelle 4.3: Herstellung des DNS-Stoppreagenzes zur Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Zuckern

Substanz	Menge in [g] oder [mL]
3,5-Dinitrosalicylsäure	1,0 g
dem. Wasser	40 mL
2 N NaOH	20 mL
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	30,0 g
dem. Wasser	ad 100 mL

Die DNS-Methode nach Miller findet häufig in der enzymatischen Aktivitätsbestimmung Anwendung. Ihr Vorteil liegt in der schnellen und einfachen Durchführung. Ein großer Nachteil ist die fehlende Stöchiometrie der Reaktion. Verschiedene Zucker führen zu unterschiedlichen Farbintensitäten, deshalb ist für jeden Zucker eine separate Kalibrierung notwendig. Ein weiterer zu beachtender Punkt ist, dass mit dieser Methode alle reduzierenden Substanzen nachgewiesen werden.

Vor der eigentlichen Probenanalyse erfolgte die Kalibrierung der DNS-Methode. Dazu wurde eine Glucose- und Maltosestammlösung (beide 2 g L^{-1}) angesetzt. Verschiedene Verdünnungen dieser Stammlösungen wurden nach **Tabelle 4.4** bearbeitet. Ein Referenzwert musste mitlaufen, bei dem anstelle der Probe Wasser verwendet wurde. **Abbildung 4.3** zeigt die Ergebnisse der Kalibrierung.

Tabelle 4.4: Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der reduzierenden Zucker

	Leerwert	Probe
Probe	-	220 μL
Wasser	220 μL	-
DNS-Stoppreagenz	100 μL	100 μL
Im Wasserbad bei 100 °C 5 Minuten erhitzen		
Abkühlen auf Raumtemperatur		
Wasser	1 mL	1 mL
Absorption bei 540 nm gegen dem. Wasser messen		

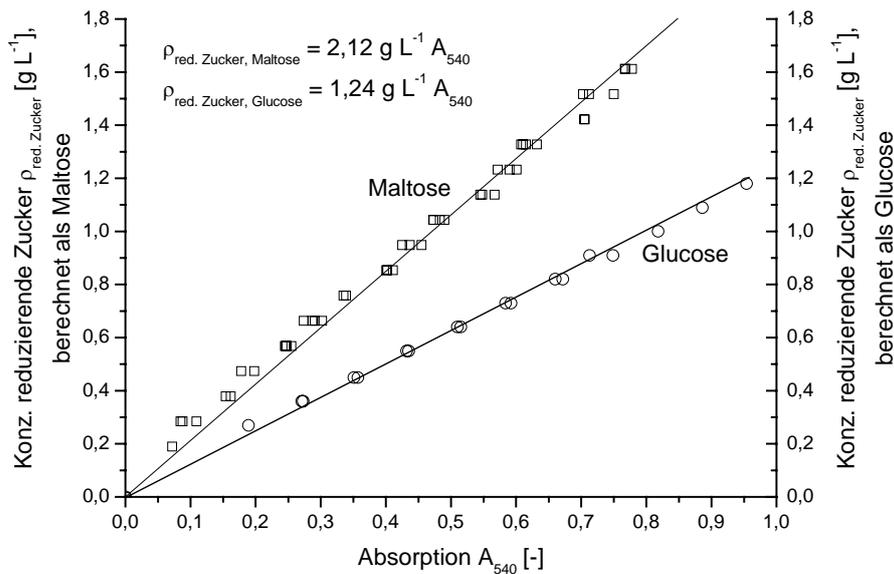


Abbildung 4.3: Kalibrierung der Methode zur Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Zuckern durch Analyse verschiedener Konzentrationen einer Glucose- und Maltosestammlösung

4.3.9 *L*-Threonin-Nachweis durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung des *L*-Threonins erfolgte nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd durch anschließende Trennung auf einer HPLC-Säule und Nachweis mittels Fluoreszenzdetektor (Büntemeyer, 2000).

Zum Nachweis und auch zur chromatographischen Trennung von Aminosäuren war eine Derivatisierung erforderlich. Die Zusammensetzung des Derivatisierungsreagenzes zeigt **Tabelle 4.5**. Phthalaldehyd (*o*-Phthalaldehyd, OPA) reagiert nur mit primären Aminen (**Abbildung 4.4**). Zusammen mit einem Thiol (z. B. 3-Mercaptopropionsäure) reagiert es mit der Aminosäure zu einem fluoreszierenden 1-Alkylthio-2-alkyl-substituierten Isoindol. Die Thiole sind für die Stabilität und die Hydrophobizität der Derivate verantwortlich. Die entstehenden Derivate erlauben eine Identifizierung der Aminosäure. Sekundäre Amine können mit OPA nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion erfolgt im alkalischen Milieu bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten. Die Derivate können sowohl durch UV-Absorption als

auch durch Fluoreszenzemission detektiert werden. Das Reagenz selbst fluoresziert nicht und stört somit nicht im Chromatogramm. Die Detektion im UV-Bereich kann jedoch durch UV-absorbierende Kontaminanten gestört sein.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung des Reagenzes zur Vorsäulenderivatisierung für die Bestimmung der *L*-Threoninkonzentration

Substanz	Menge
Phthaldialdehyd	67,4 mg
Methanol	1250 μ L
0,2 M K_2HPO_4 pH = 9,5	12,5 mL
Brij [®] -35	40 μ L
Mercaptopropionsäure	125 μ L

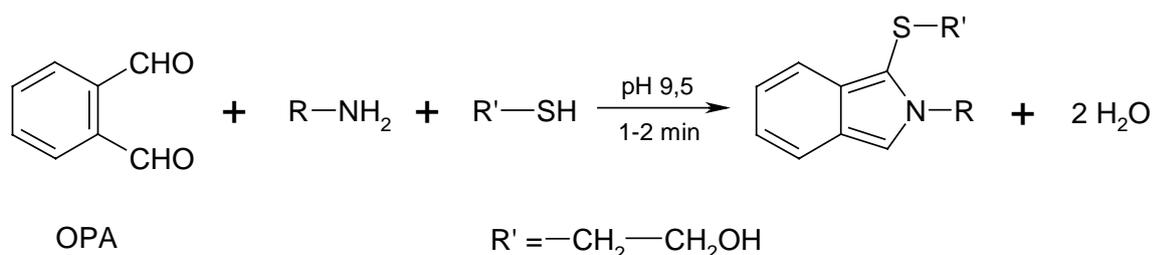


Abbildung 4.4: Darstellung der Derivatisierungsreaktion zwischen *o*-Phthaldialdehyd und primären Aminen

Durch die Derivatisierung werden die chromatographischen Eigenschaften der Aminosäuren deutlich verändert. Die polaren Aminosäuren werden durch die Kopplung mit einem aromatischen Rest wesentlich hydrophober und lassen sich so durch Chromatographien an Reversed-Phase-Materialien trennen. Die unterschiedliche Stabilität der einzelnen Aminosäurederivate setzt eine genau definierte und möglichst kurze Zeitspanne von der Derivatisierung bis zur Detektion voraus.

Die Trennung fand auf einer mit einem Reversed-Phase Material (Kromasil 100 C-18, $d_p = 5\mu\text{m}$, $L = 14\text{ cm}$, Eka Nobel) gefüllten Säule statt. Die Steuerung des Chromatographieablaufes, die Datenaufnahme und die Auswertung erfolgte automatisch mit dem Programm ChromStar der Firma SCPA. Alternativ war es möglich, die Chromatogramme manuell zu bearbeiten. Als Elutionsmittel dienten 99 % 85 mM NaAc-Puffer mit 1 % THF pH = 7,5 (Puffer A) und 85 % Methanol mit 15 % 85 mM NaAc-Puffer pH = 5,2 (Puffer B). Diese wurden

mittels zwei Pumpen (HPLC Pump BT3020, Biotronik) durch das System gefördert. In **Tabelle 4.6** sind die Äquilibrierungs-, Elutions- und Waschbedingungen aufgeführt. Die Probeninjektion erfolgte von einem Probensteller (Marathon, Spark Holland). Zur Detektion kam ein Fluoreszenzdetektor (RF-551, Shimadzu) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 455$ nm zum Einsatz.

Tabelle 4.6: Darstellung der Äquilibrierungs-, Elutions- und Waschbedingungen zur Bestimmung der *L*-Threoninkonzentration durch Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd und anschließender Trennung auf einer HPLC-Säule

Zeit nach Proben- aufgabe t [min]	Volumenstrom [mL min ⁻¹]	Prozentualer Anteil Puffer A [%]	Prozentualer Anteil Puffer B [%]
0,00	1	100	0
13,00	1	100	0
13,01	2	100	0
15,00	2	75	25
16,00	2	58	42
22,90	2	58	42
23,00	2	42	58
26,01	2	30	70
28,00	2	30	70
28,01	2	0	100
33,00	2	0	100

Vor der Derivatisierung und der Aufgabe der Probe auf die Säule mussten die Proteine mit 10 % Perchlorsäure gefällt werden. Dazu wurden Probe und Säure im Verhältnis 1:1 vermischt und die Fällungsprodukte bei 14.000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert.

Eine Verdünnung der Proben war erforderlich, da durch die Behandlung mit Perchlorsäure der pH-Wert in den sauren Bereich sank, eine Umsetzung mit OPA fand aber nur im alkalischen Milieu statt. Es war deshalb notwendig, mit einem pH-Teststreifen den pH-Wert der Probe zu kontrollieren. Von der verdünnten Probe wurden anschließend 200 μL zu 800 μL OPA-Reagenz (**Tabelle 4.5**) gegeben und kurz gevortext. Die Derivatisierungszeit betrug 5 Minuten. Dann erfolgte die Aufgabe von 20 μL Probe auf die Säule.

Vor der Probenaufnahme war es wichtig, die Säule ausreichend mit Puffer B zu waschen und mit Puffer A zu äquilibrieren. Die Eluenten wurden vor Erreichen des Systems kontinuierlich filtriert und entgast (Degasser ERC-3612, ERMA CR. INC., Tokio, Japan).

Vor der eigentlichen Probenanalyse erfolgte die Überprüfung der Linearität der Methode. Dazu wurde eine 0,1 M *L*-Threoninstammlösung angesetzt. Ein Teil dieser Lösung wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Wie **Tabelle 4.7** zeigt, wurden drei Verdünnungen der Stammlösung angesetzt und jeweils dreimal auf die Säule gegeben. Es ergab sich in dem untersuchten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Threoninkonzentration und der Peakfläche (**Abbildung 4.5**). Die Fermentationsproben wurden später soweit verdünnt, dass sich die Peakfläche innerhalb der Kalibrierung befand. Vor dem ersten Lauf wurde zweimal ein Standard auf die Säule gegeben. Die Berechnung der Konzentration in der Probe erfolgte durch Beziehung auf den Standard.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Linearität der Methode zur Bestimmung der *L*-Threoninkonzentration durch Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd und anschließender Trennung auf einer HPLC-Säule

Verdünnungsfaktor f_v [-]	Retentionszeit t [min]	Peakfläche Φ [V s ⁻¹]	Molarität [mM]
400	10,92	5886	0,25
400	10,85	5789	0,25
400	10,90	5825	0,25
2000	11,25	1176	0,05
2000	11,22	1148	0,05
2000	11,07	1134	0,05
4000	11,17	574	0,025
4000	10,92	591	0,025
4000	11,05	595	0,025

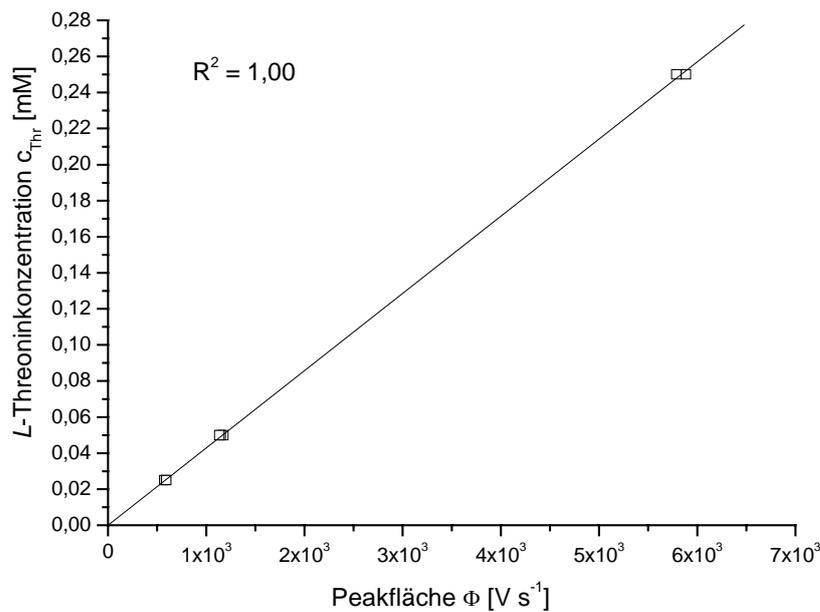
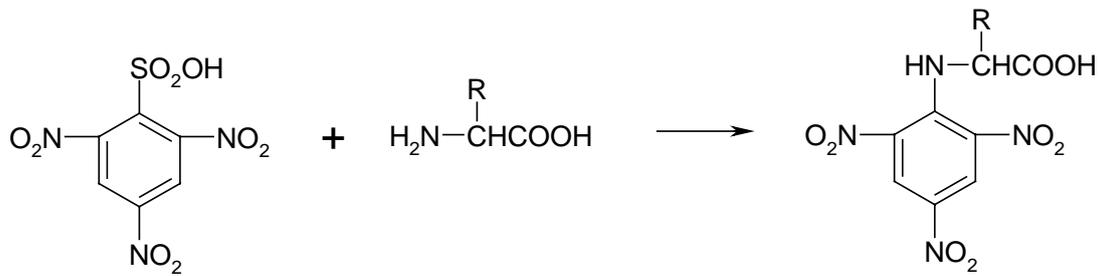


Abbildung 4.5: Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Linearität der Methode zur Bestimmung der *L*-Threoninkonzentration durch mehrfache Analyse verschiedener Konzentrationen einer *L*-Threoninstammlösung

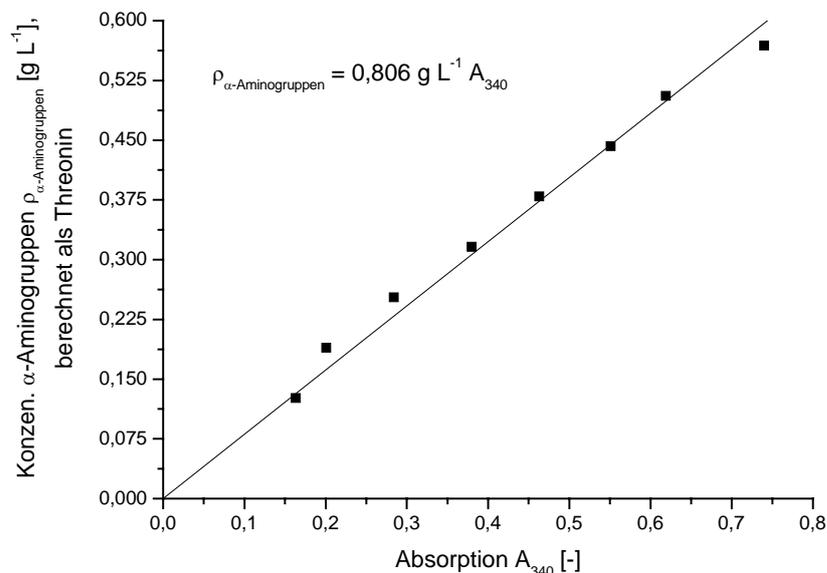
4.3.10 Bestimmung der α -Aminogruppenkonzentration

Neben der chromatographischen Bestimmung der *L*-Threoninkonzentration wurde die α -Aminogruppenkonzentration zusätzlich nach der Methode von Adler-Nissen (Adler-Nissen, 1979) bestimmt.

Das Prinzip des Assays (**Abbildung 4.6**) beruht auf der Reaktion von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) mit α -Aminogruppen im alkalischen Milieu unter Ausbildung von gelbgefärbten Trinitrophenylderivaten, die photometrisch bei 340 nm vermessen werden können (Izco *et al.*, 2000). Da bei der Reaktion außerdem schweflige Säure (H_2SO_3) entsteht, werden die anfallenden Protonen durch die Verwendung eines Phosphatpuffers abgefangen. Gestoppt wird die Reaktion durch Absenkung des pH-Wertes nach Zugabe von Salzsäure auf Werte zwischen 3,7 und 3,9. Werte unter 3,5 führen zu einer Trübung der Probe und müssen deshalb vermieden werden. Die Reaktion findet in einem abgedunkelten Wasserbad statt, da TNBS unter Lichtanregung auch mit Hydroxidionen reagiert.

2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure α -Aminogruppe**Abbildung 4.6:** Reaktion von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure mit α -Aminogruppen

Zu 200 μL der Probe wurden 200 μL 2 %-ige SDS-Lösung gegeben. Diese Verdünnung ist dann für 15 Minuten bei 75 $^{\circ}\text{C}$ temperiert worden. Zu 40 μL dieser Lösung wurden anschließend 320 μL 0,21 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer ($\text{pH} = 8,2$) und 320 μL 0,1 %-ige TNBS-Lösung gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation in einem abgedunkelten Wasserbad bei 50 $^{\circ}\text{C}$ ist die Reaktion durch Zugabe von 640 μL 0,1 N HCl gestoppt worden. Die Absorption der Probe wurde, nachdem sie 30 Minuten auf Raumtemperatur abkühlen konnte, bei 340 nm gegen einen Referenzwert, der statt Probe 1 %-ige SDS-Lösung enthielt, gemessen. Zur Bestimmung der α -Aminogruppenkonzentration wurde eine Standardreihe mit *L*-Threonin auf die gleiche Weise vermessen (**Abbildung 4.7**).

**Abbildung 4.7:** Kalibrierung der Methode zur Bestimmung der Konzentration an α -Aminogruppen durch Analyse verschiedener Konzentrationen einer *L*-Threoninstamm-lösung

4.3.11 Bestimmung der Proteaseaktivität

Die Proteaseaktivität im Kulturüberstand wurde anhand der Hydrolyse des Peptidsubstrates AAPF-pNA (suc-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Pro-*L*-Phe-*p*-Nitroanilid) bestimmt. Subtilisin spaltet AAPF-pNA in AAPF und *p*-Nitroanilin. Die Freisetzung des *p*-Nitroanilins aus dem Peptidsubstrat verursacht eine Zunahme der Absorption bei 410 nm, die über einen Zeitraum von 5 Minuten verfolgt wird.

Die Enzymaktivität ist eine kinetische Größe und daher immer abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Bedingungen bei der Reaktion gemessen wurde. Daher wird eine Protease-Einheit definiert als die Enzymmenge, die bei 25 °C und einem pH-Wert von 8,6 pro Minute 1 µmol *p*-Nitroanilin freisetzt.

Gleichbleibende Bedingungen während der enzymatischen Katalyse wurden durch die Verwendung eines 0,1 M Tris/HCl Puffers (pH = 8,6) und der Temperierung der Küvette auf 25 °C gewährleistet. Zur Herstellung des Puffers wurden 6,05 g Tris in 300 mL Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 8,6 eingestellt und anschließend mit Wasser auf ein Volumen von 500 mL aufgefüllt. Für die 110 mM Substratlösung wurden 70 mg AAPF-pNA in 1 mL DMSO gelöst. Diese Lösung war im Dunkeln mindestens eine Woche haltbar.

Der 0,1 M Tris-HCl Puffer wurde in einem Wasserbad auf 25 °C vorgewärmt. Der Test wurde für jede Probe dreimal durchgeführt und jeweils gegen einen Referenzwert mit Wasser anstatt Probe gemessen. **Tabelle 4.8** zeigt die Durchführung des Testes. Es wurde mit Halbmikroküvetten gearbeitet.

Tabelle 4.8: Durchführung der Proteaseaktivitätsbestimmung

	Leerwert	Probe
Substratlösung	10 µL	10 µL
0,1 M Tris-HCl pH = 8,6	1000 µL	1000 µL
Probe	-	10 µL
Wasser	10 µL	-
Mischen und Absorptionsmessung starten		

Durch Zugabe der Probe zur Substratlösung wurde die Reaktion gestartet, daher sollte der Reaktionsansatz unverzüglich gemischt und das Kinetikprogramm des Photometers gestartet werden. Die Messzeit sollte 10 Minuten betragen, mindestens jedoch zehn Messungen im linearen Bereich beinhalten.

Die Berechnung der Proteaseaktivität erfolgte nach folgender Gleichung:

$$a \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{\frac{dA}{dt} \cdot V_{\text{Küv}} \cdot f_v}{\varepsilon_{410} \cdot V_E \cdot d} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right] \quad \text{(Gleichung 4.1)}$$

- dA/dt : Absorptionsänderungsgeschwindigkeit in min^{-1}
 $V_{\text{Küv}}$: Volumen der Lösung in der Küvette (1,02 mL)
 f_v : Verdünnungsfaktor der Enzymlösung
 ε_{410} : Absorptionskoeffizient bei 410 nm ($8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 8,48 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$)
 d : Lichtweg durch die Küvette (1 cm)
 V_E : Volumen der zugegebenen Enzymlösung (0,01 mL)

4.3.12 Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes

Für die Bestimmung der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff wurde der Analysator Vario EL von Elementar verwendet. Die zu analysierende Substanz wurde durch oxidative Verbrennung aufgeschlossen. Der quantitative Substanzaufschluss beruht auf dem Prinzip der explosionsartigen Verbrennung in mit Sauerstoff hoch angereicherter Heliumatmosphäre in einem mit Kupferoxid gefüllten Verbrennungsrohr bei einer Temperatur von ca. 950 °C - 1000 °C.

Die Bestimmung erfolgte in den Laboratorien der Experimentellen Ökologie und Ökosystembiologie der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

4.3.13 Proteinbestimmung mit dem modifizierten Bradford-Test

Im Mittelpunkt des von M. M. Bradford 1976 veröffentlichten Protein-Assays stehen blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden (Bradford, 1976). In Gegenwart von Proteinen und im stark sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillantblau von rot nach blau.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Proteinassay handelt es sich um eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durch Zor und Seliger (Zor & Seliger, 1996). Die proteingebundene, blaue Form des Coomassie-Brillantblau ist als unprotonierte Form am stabilsten und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 590 nm, während die ungebundene, rote Form als doppelt protoniertes Molekül in der stark sauren Umgebung am stabilsten ist und bei 465 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Der ursprüngliche Bradford-Test (Messung der Absorption nur bei 590 nm) lieferte eine Standardkurve, die keine exakte Linearität aufwies. Die Linearität ergibt sich jedoch, wenn die Probe bei 590 nm und bei 450 nm vermessen und die Proteinkonzentration gegen den Quotienten A_{590}/A_{450} aufgetragen wird.

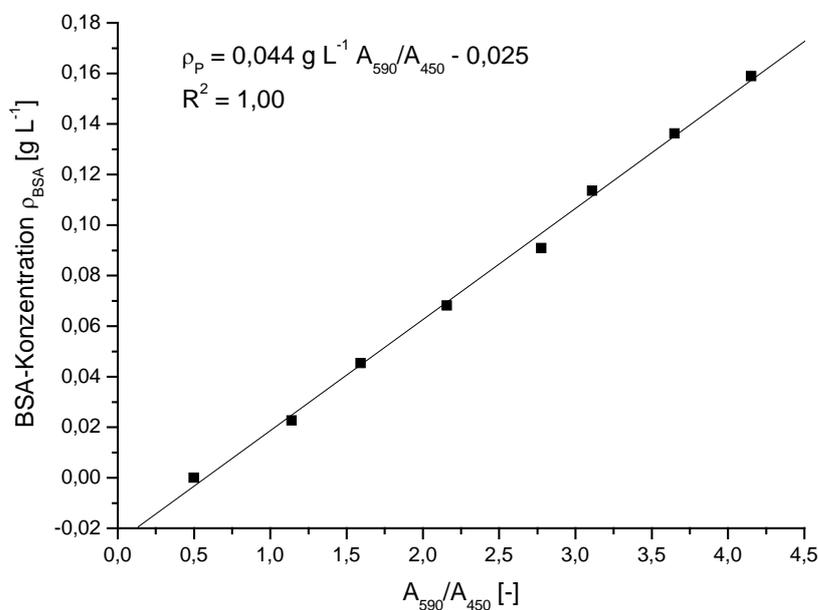


Abbildung 4.8: Kalibrierung der Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration durch Analyse verschiedener Konzentrationen einer Rinderserumalbuminstammlösung

Die Arbeitslösung wurde durch Verdünnung des Konzentrats mit Wasser hergestellt. Zur Kalibrierung der Methode wurde eine Stammlösung mit Rinderserumalbumin angesetzt und entsprechend verdünnt. Für den Nullwert der Kalibriergeraden wurden 200 μL Wasser zu 800 μL Arbeitslösung pipettiert (**Abbildung 4.8**). Ansonsten wurden 200 μL verdünnter Stammlösung bzw. Probe zu 800 μL Arbeitsreagenz gegeben, gut gemischt und gegen Wasser zunächst bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590 \text{ nm}$ und dann bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ gemessen. Die Nachweisgrenze dieses Tests lag bei 20 mg Protein pro Liter.

4.3.14 Qualitativer Proteinnachweis mittels Disk-SDS-PAGE

Der qualitative Proteinnachweis wurde mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (Disk-SDS-PAGE) durchgeführt. **Tabelle 4.9** zeigt die Zusammensetzung des Trenngels und **Tabelle 4.10** die des Sammelgels.

Tabelle 4.9: Zusammensetzung des Trenngels zum qualitativen Proteinnachweis mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese

Komponente	[μL]
Wasser	1500,0
1 M Tris pH = 8,8	2800,0
Bis/Acrylamid (0,8 % / 30 %)	3000,0
5 % SDS	150,0
10 % Ammoniumpersulfat	37,5
TEMED	2,5

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Sammelgels zum qualitativen Proteinnachweis mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Komponente	[μL]
Wasser	775,0
0,25 M Tris pH = 6,8	1250,0
Bis/Acrylamid (0,8 % / 30 %)	425,0
5 % SDS	500,
10 % Ammoniumpersulfat	25,0
TEMED	2,5

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem Lämmli-Puffer (**Tabelle 4.11**) verdünnt und 5 Minuten bei 96 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 20 μ L in die Taschen des Gels gegeben. Nicht mit Proben gefüllte Taschen mussten mit einem Gemisch aus Wasser und Lämmli Puffer (1:1) gefüllt werden. In die erste Proben-tasche wurde der Proteinmarker direkt pipettiert. **Tabelle 4.12** zeigt die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers. Der Lauf wurde mit 14 mA gestartet und bei Übertritt der Probe in das Trenngel auf 20 mA erhöht. Erreichte die blaue Lauffront das untere Ende des Trenngels, wurde der Lauf beendet.

Nach Trennung des Sammelgels vom Trenngel, wurde dieses für mehrere Stunden in eine Coomassie-Blau Lösung (0,2 g in 100 mL Wasser) gelegt. Die Entfärbung erfolgte in einem Gemisch aus 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure und 65 % (v/v) Wasser.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung des zweifach konzentrierten Lämmli Puffers zum qualitativen Proteinnachweis mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Komponente	
Tris-HCl	250 mM
SDS	8 %
Glycerin	40 %
Bromphenolblau	0,004 %
β -Mercaptoethanol	20 %

Tabelle 4.12: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers zum qualitativen Proteinnachweis mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Komponente	
Tris-HCl	25 mM
Glycerin	192 mM
SDS	0,1 %

4.3.15 Qualitativer Nukleinsäurenachweis

Mit dieser Methode sollte sowohl in ausgewählten Fermentationsüberständen als auch in den gewonnenen Zelllysaten genomische DNA und RNA qualitativ nachgewiesen werden. Dazu wurden die Nukleinsäuren zunächst gefällt, in Puffer resuspendiert und mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Auftragung auf ein Agarosegel.

Zunächst wurden 200 μ L Fermentationsüberstand bzw. Lysat mit 20 μ L 3 M Natriumacetat und 650 μ L kaltem Ethanol vermischt. Dieser Ansatz ist dann für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff inkubiert und anschließend 6 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert worden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1000 μ L 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und erneutem Verwerfen des Überstandes ist das Pellet unter dem Abzug getrocknet worden. Dann wurde das Pellet in 1 mL TE-Puffer aufgenommen.

Die weitere Aufreinigung erfolgte mit einem Qiagen-tip 20 Kit. Zunächst musste die Säule durch Zugabe von 1 mL QBT-Puffer äquilibriert werden. Dann wurde 1 mL der Probe auf die Säule aufgegeben. Anschließend wurde die Säule viermal mit 1 mL QC-Puffer gewaschen und mit 0,8 mL QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen und mit 560 μ L Isopropanol versetzt und dann 30 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 μ L 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abzug des Alkohols wurde das Pellet in 20 μ L TE-Puffer (**Tabelle 4.13**) aufgenommen.

6 μ L der Probe wurden mit 2 μ L Ladepuffer (**Tabelle 4.14**) in die Geltaschen eines 1 %igen Agarosegels (0,3 g Agarose in 30 mL 0,75-fach TAE-Puffer (**Tabelle 4.15**) pipettiert. Mit

10 μL eines Größenstandards (1 kb DNA-Leiter) ist ebenso verfahren worden. Die elektrophoretische Auftrennung wurde durch Anlegen einer Spannung von 50 V durchgeführt und das fertige Gel in einem Ethidiumbromidbad für 30 Minuten gefärbt.

Tabelle 4.13: Zusammensetzung des TE-Puffers

Komponente	
Tris-HCl pH = 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Tabelle 4.14: Zusammensetzung des Ladepuffers

Komponente	
EDTA	100
Bromphenolblau	0,25 %
Saccharose	40 %

Tabelle 4.15: Zusammensetzung des TAE-Puffers, 50fach Konzentrat

Komponente	
Tris-Base pH = 7,5	2 M
Essigsäure	2 M
EDTA	50 mM

4.4 Lyseverfahren

Im Folgenden müssen immer zwei Lysevorgänge unterschieden werden. Zunächst wurden mit dem jeweiligen Bakterium Lysen im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt. Dadurch konnten effizient verschiedene Verfahren aber auch Einflussgrößen auf die Verfahren untersucht und bewertet werden. Auf Basis der Auswertung dieser Versuche sind dann einzelne Verfahren ausgewählt worden, um mit diesen größere Mengen Lysat herzustellen. Diese Lysate wurden dann einer genaueren Analytik unterzogen und für Wachstumsversuche herangezogen.

4.4.1 Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab

Tabelle 4.16 zeigt das für den jeweiligen Stamm verwendete Medium zur Biomassengewinnung für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab.

Tabelle 4.16: Eingesetztes Medium zur Biomassengewinnung im Rührkesselreaktor

Stamm	Medium	Art des Mediums
<i>Escherichia coli</i> B-3996	A1-160	halbsynthetisches Medium
<i>Klebsiella planticola</i>	Terrific-Broth	halbsynthetisches Medium
<i>Bacillus licheniformis</i> P300	HSG-Medium	halbsynthetisches Medium

Das nach der Ernte bei -20 °C gelagerte Zellpellet wurde in Leitungswasser bei Raumtemperatur vollständig resuspendiert, sodass Biofeuchtmasskonzentrationen von circa 150 g L⁻¹ (Biotrockenmasskonzentration zwischen 24 g L⁻¹ und 30 g L⁻¹) erhalten wurden. Während des Einfrier- und Auftauprozesses kam es bereits zu einer partiellen Lyse der Zellen. Die Lyseversuche fanden in 300 mL und 1000 mL Schüttelkolben mit und ohne Strombrecher statt. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die Gefäße mit Aluminiumkappen verschlossen. Die Füllmenge betrug 150 mL bis 200 mL. Zur Temperierungen bis 60 °C fand ein mit einem Schüttler ausgestattetem Wasserbad der Infors AG Verwendung, für die chemischen Hydrolysen ein Wasserbad der Firma GFL. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 2 M Natronlauge bzw. 2 M Salzsäure. Im Falle eines mechanischen Zellaufschlusses, wurde der pH-Wert erst nach diesem Schritt korrigiert. Die Reaktionen in den Schüttelkolben liefen nicht pH-statisiert ab. Die Lyse ist über die Bestimmung der Feststoffkonzentration und der Proteinkonzentration verfolgt worden. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen, meistens jedoch Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Der Lysegrad L ist wie folgt definiert:

$$L = 1 - \frac{\rho_x}{\rho_{x0}} \quad \text{(Gleichung 4.2)}$$

ρ_x : Feststoffkonzentration zum Zeitpunkt t

ρ_{x0} : Feststoffkonzentration zum Zeitpunkt t = 0

Im Rahmen der Auswertung findet sich zu jedem durchgeführten Lyseversuch auch die graphische Darstellung des zeitlichen Lyseverlaufs und der Proteinkonzentration. Die dort dargestellten Messpunkte sind durch Geraden miteinander verbunden worden. Bei kurz aufeinander folgenden Messpunkten ergeben diese Geraden noch in etwa die Lyseentwicklung zwischen den Messpunkten wieder. Werden die Zeitabstände zwischen den Punkten größer, so geben die Geraden in diesem Bereich keinesfalls den realen Lyseverlauf wieder. Hier reduziert sich ihre Funktion zur simplen Verbindungslinie, die zusammengehörige Messpunkte eines Lyseversuchs besser erkennen lässt.

4.4.2 Lysatherstellung für Kultivierungen

An dieser Stelle werden nur Unterschiede zu den unter **Kapitel 4.4.1** gemachten Angaben bezüglich der Lyse aufgezeigt. Wenn nicht anders erwähnt, gelten die bereits gemachten Angaben.

Es wurde jeweils das gesamte bei -20 °C gelagerte Zellpellet einer Fermentation 1 Liter - 2 Liter Leitungswasser bei Raumtemperatur resuspendiert und für die anschließende Lyse eingesetzt. Die Lyseversuche fanden in vier 1000 mL Schüttelkolben ohne Strombrecher statt. Die Füllmenge betrug 550 mL - 700 mL.

Die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile nach beendeter Lyse erfolgte durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 17.000g. Das so erhaltene klare Lysat wurde dann entweder in flüssiger Form bei 4 °C gelagert, bei -20 °C eingefroren oder nach der Gefriertrocknung als Pulver luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur gelagert.

4.5 Lysatanalytik

Die während der Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab gewonnenen Lysate wurden ausschließlich auf ihren Protein- und Feststoffgehalt untersucht. Die in diesem Kapitel gemachten Aussagen zeigen daher weitgehend die Methoden zur Charakterisierung der geklärten Lysate für die Wachstumsversuche auf. Folgende analytischen Stationen wurden passiert:

- ❖ Proteinkonzentration : modifizierter Bradford-Test
- ❖ Feststoffkonzentration : Wägung
- ❖ Acetatkonzentration : HPLC
- ❖ Kohlenstoffgehalt : Elementaranalyse
- ❖ Stickstoffgehalt : Elementaranalyse
- ❖ Aminosäurespektrum : RP-HPLC
- ❖ DNA-Gehalt : Farbreaktion mit Dische Reagenz
- ❖ Proteingrößenverteilung : Disk SDS-PAGE

Da es sich bei den drei zuerst genannten Konzentrationen sowie bei den Ergebnissen der Aminosäureanalytik um volumenabhängige Größen handelt, wurde das Volumen des Lysats, nach der im Rahmen der Klärung durchgeführten fest-flüssig Trennung, bestimmt.

4.5.1 Proteinbestimmung mit dem modifizierten Bradford-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des modifiziertem Bradford Tests wie in **Kapitel 4.3.13** beschrieben.

4.5.2 Bestimmung der Feststoffkonzentration

Die Bestimmung der Feststoffkonzentration erfolgte analog zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration gravimetrisch bei 60 °C im Vakuumtrockenschrank wie in **Kapitel 4.3.3** beschrieben.

4.5.3 Bestimmung der Acetatkonzentration

Die Bestimmung der Acetatkonzentration erfolgte analog zur Bestimmung der Glycerinkonzentration mittels Trennung auf einer Kationenaustauschersäule wie in **Kapitel 4.3.7** beschrieben.

4.5.4 Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes

Für die Bestimmung der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff wurde der Analysator Vario EL von Elementar verwendet wie in **Kapitel 4.3.12** beschrieben.

4.5.5 Bestimmung des Aminosäurespektrums

Die Bestimmung erfolgte in den Laboratorien der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld nach der in **Kapitel 4.3.9** beschriebenen Methode.

4.5.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Saure Hydrolyse setzt aus DNA Desoxyribose frei, die durch die sogenannte Dische-Reaktion mit Diphenylamin nachgewiesen werden kann (Dische, 1955). Aus Desoxyribose entsteht unter Säureeinwirkung unter Elimination von Wasser und weiteren Umlagerungen ω -Hydroxylävalinaldehyd. Dieses Aldehyd reagiert mit Diphenylamin zu einer Mischung aus festen Komplexen, von denen einer unter sauren Bedingungen eine typisch blaue Färbung zeigt. Deren im sichtbaren Bereich charakteristische Absorption lässt sich photometrisch bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ bestimmen.

Das Dische Reagenz wurde durch Lösen von 1 g Diphenylamin in 2,5 mL konzentrierter Schwefelsäure und Auffüllen mit Eisessig auf 100 mL hergestellt. Diese Lösung war im Dunkeln eine Woche haltbar.

Die Kalibrierung der Methode erfolgte mit Kalbsthymus-DNA (**Abbildung 4.9**). Dazu wurden 10 mg in 10 mL 1 M Schwefelsäure gelöst und anschließend 10 Minuten bei 100 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat ist anschließend über einen Faltenfilter gegeben worden. Durch Verdünnung mit 1 M Schwefelsäure wurden verschiedene Konzentrationen Thymus-DNA hergestellt. Diese sind zusammen mit der unverdünnten Stammlösung jeweils mit 1 mL Dische Reagenz versetzt und für 15 Minuten auf 100 °C erhitzt worden. Nach 25-minütiger Ab-

kühlphase wurde die Absorption bei $\lambda = 600$ nm gegen einen Referenzwert mit 1 M Schwefelsäure gemessen.

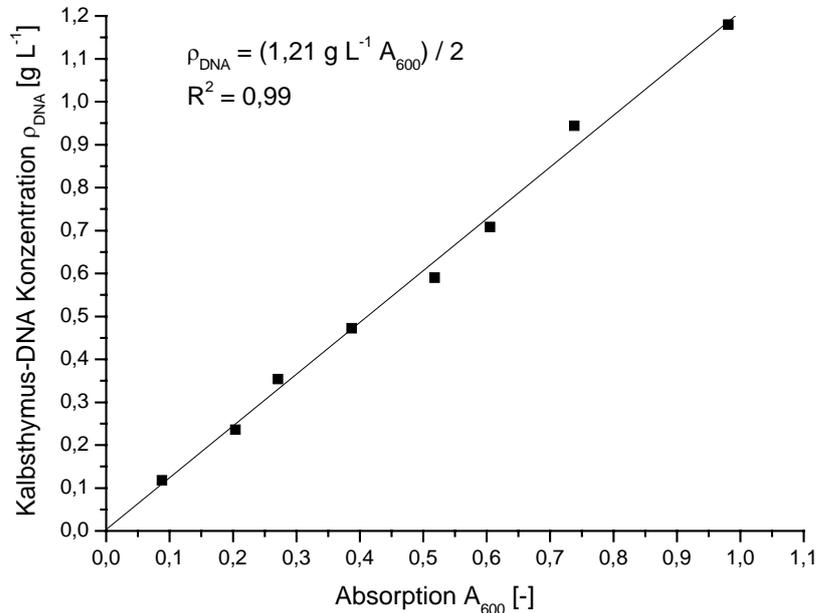


Abbildung 4.9: Kalibrierung der Methode zur Bestimmung der DNA-Konzentration durch Analyse verschiedener Konzentrationen einer Kalbsthymus-DNA-Stammlösung

Zur Vermessung von Proben wurden ungefähr 25 mg Trockenstoff in 5 mL 1 M Schwefelsäure hydrolysiert, über einen Faltenfilter gegeben und nach Reaktion mit Dische Reagenz vermessen.

4.5.7 Qualitativer Proteinnachweis mittels Disk-SDS-PAGE

Der qualitative Proteinnachweis erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE wie in **Kapitel 4.3.14** beschrieben.

5 Ergebnisse und Diskussion - *Klebsiella planticola*

5.1 Fermentationen zur Biomassegewinnung auf TB-Medium

Das Ziel dieser Fermentationen lag in der Gewinnung von *Klebsiella planticola*-Biomasse für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab. Dazu wurden mehrere Kultivierungen auf TB-Medium in einem Rührkesselreaktor durchgeführt. Es handelt sich dabei um die Fermentationen mit den Abkürzungen F75, F76 und F78. Die Zahl gibt dabei die laufende Nummer der durchgeführten Fermentation an und ermöglicht eine zweifelsfreie Zuordnung der Kultivierung.

Die optische Dichte der verwendeten Vorkulturen lag zwischen $OD_{600} = 17,3 - 19,6$. Aus **Abbildung 5.1** geht der Verlauf der optischen Dichte ausgewählter Fermentationen im Rührkesselreaktor hervor. Bei diesen lag die maximal erreichte OD_{600} zwischen 34 und 39. Damit war diese höher als bei den Vorkulturen. Die Gründe hierfür liegen vermutlich in einer frühzeitigen Sauerstofflimitierung in den Schüttelkolben und der fehlenden pH-Statisierung.

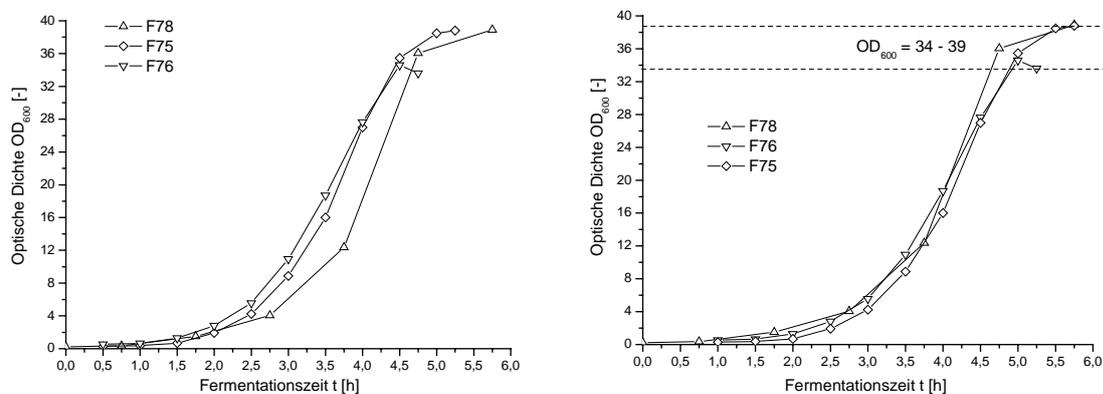


Abbildung 5.1: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf TB-Medium, links: Verlauf der optischen Dichte; rechts: Adaptionphasenkorrigierte OD_{600} -Verläufe

Anhand des Verlaufes der optischen Dichte in der halblogarithmischen Auftragung (**Abbildung 5.2**) ließen sich sehr kurze Adaptionphasen von 0,5 Stunden erkennen. Außerdem konnten zwei exponentielle Wachstumsphasen unterschieden werden. Die erste wies eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von 1,4 bis 1,5 h^{-1} auf. Das entsprach einer Verdopplungszeit t_d von 0,46 bis 0,50 Stunden. In der zweiten lag die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bei 0,8 bis 1,0 h^{-1} .

schwindigkeit um $1,0 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 0,69 \text{ h}$). Diese Wachstumsphasen korrelierten mit den Veränderungen der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft.

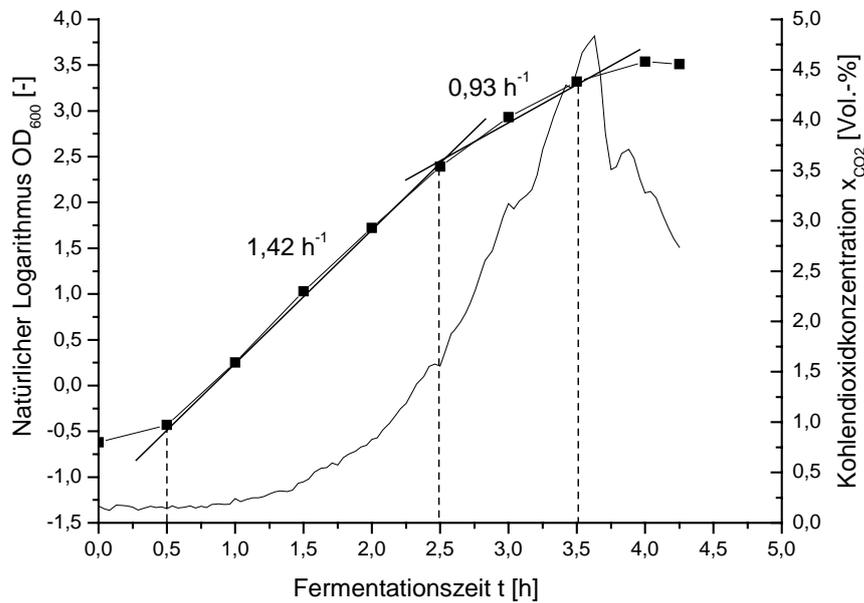


Abbildung 5.2: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf TB-Medium (F76)

Abbildung 5.3 zeigt exemplarisch den Verlauf einiger Betriebsvariablen der Fermentation F76. Es zeigte sich, dass nach Verbrauch des Glycerins zwei weitere kurze Wachstumsphasen auftraten. Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung des Mediums ließen sich keine eindeutigen Aussagen über die Vorgänge in den einzelnen Wachstumsphasen machen.

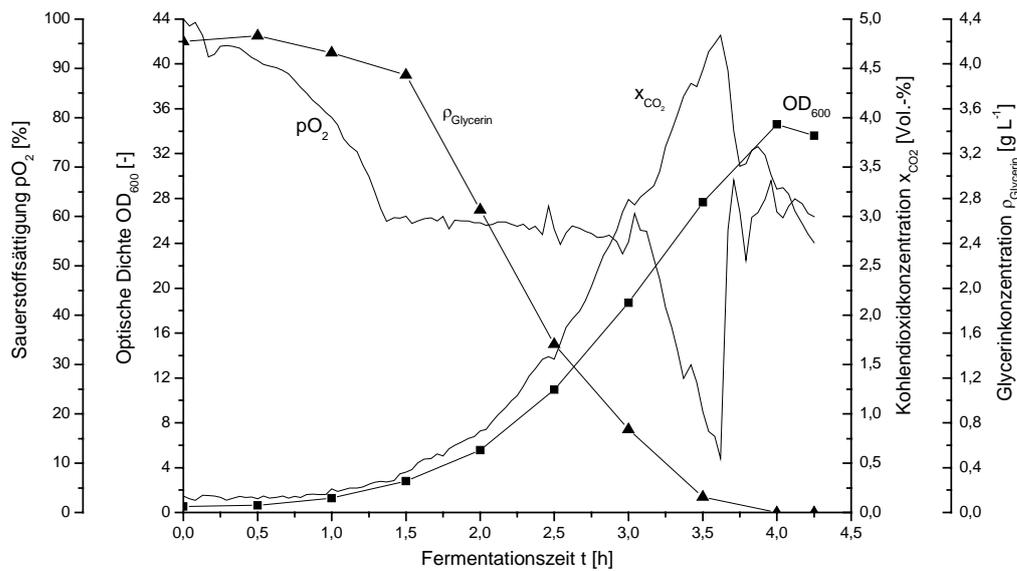


Abbildung 5.3: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf TB-Medium (F76)

Der Verlauf der Zelldichte wurde mit Hilfe des logistischen Wachstumsmodells modelliert (Stephan *et al.*, 2003). **Gleichung 5.1** beschreibt die Veränderung der Zelldichte im Verlauf der Zeit. Die unbekanntenen Größen τ (charakteristische Zeitkonstante des Wachstums) und ϕ_0 (relative Zelldichte zu Beginn der Kultivierung) ließen sich mit Hilfe des Levenberg-Marquardt-Algorithmus (Origin[®]) numerisch bestimmen, so dass die Funktion möglichst gut dem realen Verlauf angepasst werden konnte.

$$OD = \frac{\phi_0}{\phi_0 + (1 - \phi_0) \exp\left(-\frac{t}{(1 - \phi_0)\tau}\right)} \cdot OD_{\max} \quad \text{(Gleichung 5.1)}$$

Tabelle 5.1 gibt die durch das Modell bestimmten Parameter wieder. Zusätzlich sind die experimentell erreichten maximalen Zelldichten ($OD_{\max, \text{real}}$) denen des Modells (OD_{\max}) gegenübergestellt.

Tabelle 5.1: Gegenüberstellung der ermittelten Größen des logistischen Wachstumsmodells bei der Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf TB-Medium

Fermentation	φ_0 [-]	$OD_{\max, \text{real}}$ [-]	OD_{\max} [-]	τ [h]
F75	0,00184	38,8	41,1	0,505
F76	0,00434	33,6	38,5	0,554
F78	0,00002	38,9	40,0	0,374

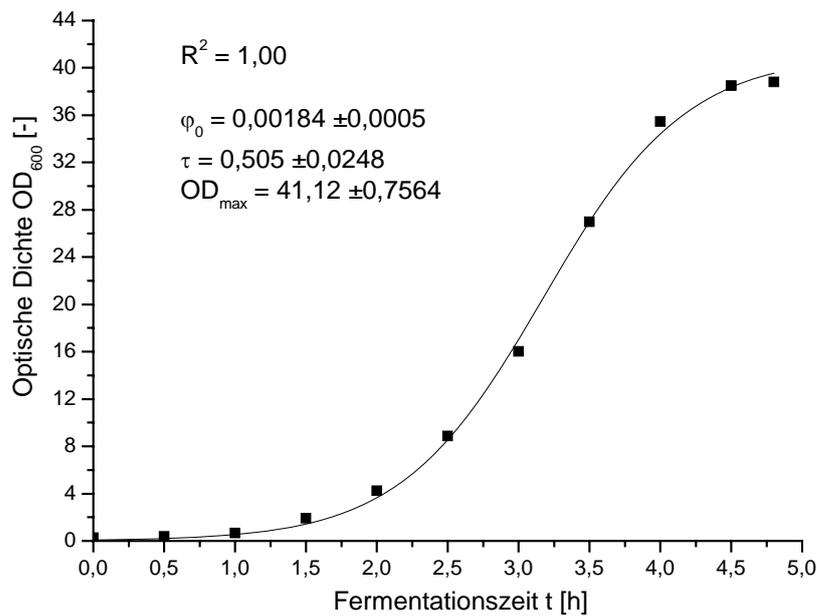


Abbildung 5.4: Modellierung der Wachstumskurve mit Hilfe des logistischen Wachstumsmodells der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf TB-Medium (F75)

Obwohl das benutzte Modell die schon erwähnten Polyauxieeffekte nicht berücksichtigen kann, ermöglichte es eine gute Anpassung des Kurvenverlaufes (**Abbildung 5.4**) an die realen Bedingungen. Es ergab sich eine sigmoide Kurve, die der maximalen Zelldichte entgegenstrebt.

5.2 Lyseversuche

Ein Hauptziel der Lyseversuche lag darin, eine effiziente Methode für die Lyse der *Klebsiella planticola*-Zellen zu finden. Die Auswahl der eingesetzten Aufschlussverfahren konzentrierte sich in Hinblick auf den Durchsatz großer Stoffströme ausschließlich auf solche Methoden, die für den großtechnischen Maßstab geeignet sind. Darüber hinaus wurden bei der Auswahl der Verfahren ökonomische Gesichtspunkte nicht außer Acht gelassen. Es wurden ausschließlich solche Methoden in Erwägung gezogen, bei denen der Einsatz an stofflichen und energetischen Ressourcen auf ein Minimum reduziert werden konnte. Dadurch sollte die wirtschaftliche Anwendung der Biomasserückführung nicht schon im Vorhinein ausgeschlossen werden. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt war die Qualität des Lysats. Zu harsche Behandlungen sowie der Einsatz von toxischen Substanzen kamen nicht in Betracht.

5.2.1 Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes für die *Klebsiella planticola*-Zellen bei Verwendung des Hochdruckhomogenisators

Dieser Versuch diente zur Abstimmung der Parameter Aufschlussdruck und Anzahl der Passagen durch den Hochdruckhomogenisator. Laut Jahnke (Jahnke, 2000) existiert für jeden Organismus eine untere Druckgrenze, die erst überschritten werden muss, um einen effizienten Aufschluss zu erzielen.

Wichtigster Einflussfaktor auf das Aufschlussergebnis ist, neben der Geometrie des Homogenisierventils, der Arbeitsdruck (Hetherington *et al.*, 1971).

Der Aufschluss wurde indirekt über den auf die Feststoffkonzentration bezogenen Lysegrad verfolgt. Es wurde mit Biofeuchtmasskonzentrationen von 150 g L^{-1} (Biotrockenmasskonzentration $28,6 \text{ g L}^{-1}$) gearbeitet. **Abbildung 5.5** zeigt die auftretenden Veränderungen des Lysegrades in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagen und dem Aufschlussdruck durch den Hochdruckhomogenisator. Der Lysegrad nahm durch in Lösung gehen von Zellbestandteilen über den gesamten Verlauf zu. Wie zu erkennen ist, führten während der ersten Passage höhere Drücke zu höheren Lysegraden (11,2 % bei 200 bar gegenüber 51,2 % bei 800 bar).

Jedoch glichen sich die Ergebnisse im Druckbereich von 600 bar bis 800 bar innerhalb der ersten drei Passagen an. Unter 600 bar zeigte sich ein geringerer Lysegrad. Ein Arbeitsdruck von 200 bar führte nach fünf Passagen lediglich zu einem Aufschluss von 29,3 %.

Generell traten die größten Veränderungen innerhalb der ersten drei Passagen auf. Nach dem dritten Durchlauf kam es in allen untersuchten Fällen nur noch zu geringen Veränderungen. Während des Aufschlusses nahm die Viskosität aufgrund freigesetzter Nukleinsäuren deutlich zu. Zusätzlich konnte eine Aufhellung der Zellsuspension beobachtet werden.

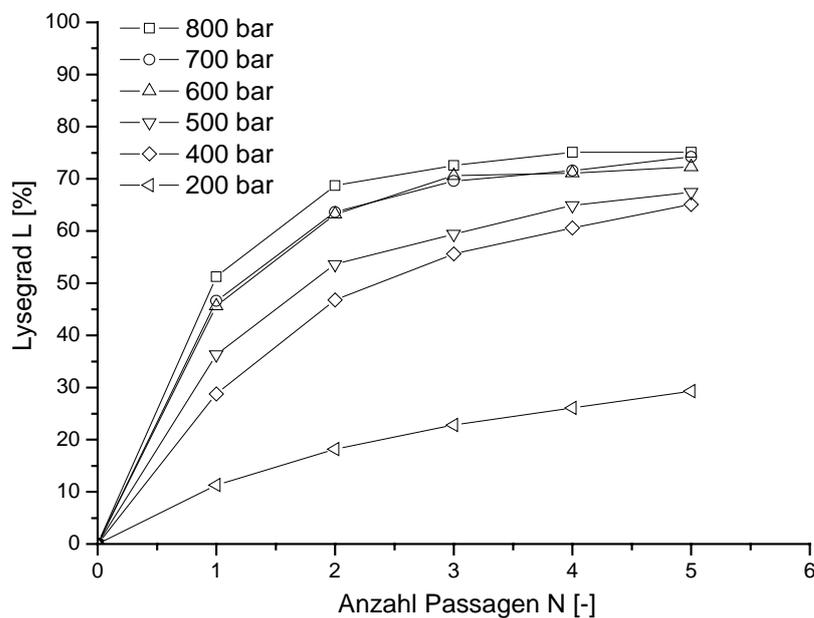


Abbildung 5.5: Hochdruckaufschluss von *Klebsiella planticola* mit unterschiedlichen Aufschlussdrücken (Biotrockenmassekonzentration $28,6 \text{ g L}^{-1}$)

Im Homogenisierventil wird die in der Hochdruckpumpe aufgewendete Energie zur Erzeugung neuer Grenzflächen zwischen disperser und kontinuierlicher Phase verwendet. Der überwiegende Teil der aufgewendeten Energie dissipiert jedoch und erhöht somit die Temperatur der Suspension (Jahnke, 2000). Diese Temperaturerhöhung ist bei temperaturempfindlichen Produkten sowohl bei der Wahl der Eintrittstemperatur als auch zur Auslegung der Kühlsysteme zu beachten. Ein Vorteil niedriger Drücke ist die geringere Energiedissipation. Nach Schütte (Schütte & Kula, 1990) beträgt die Erwärmung $2,5 \text{ °C}$ pro 10 MPa. Das heißt, dass bei einem Druck von 600 bar die Temperatur der Zellsuspension um 15 °C je Passage zunehmen müsste. Unter Vernachlässigung des Wärmeverlustes sollte sich die Suspension

nach drei Passagen um 45 °C erwärmen. Dies konnte durch Temperaturmessung bestätigt werden. Bei einer Ausgangstemperatur des Homogenisierguts von 15 °C, musste die Temperatur, in Hinblick auf die anschließende Behandlung mit einer alkalischen Protease, die ein Temperaturoptimum von 55 °C aufwies, nur um 5 °C gesenkt werden. Die Erwärmung der Zellsuspension war somit von Vorteil und erwünscht.

Für kommende mechanische Aufschlüsse wurde ein Arbeitsdruck von 600 bar und eine Passagenanzahl von drei gewählt.

5.2.2 Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH

Autolyse ist die Fähigkeit von Zellen sich unter bestimmten Umständen durch endogene Enzyme selbst zu lysieren (Middelberg, 1995).

In dem hier untersuchten Fall wurde eine Kombination aus mechanischem Aufschluss (drei Passagen bei 600 bar) und Autolyse gewählt. Durch den vorangestellten mechanischen Aufschluss sollten die autolytisch wirkenden Enzyme der Zelle freigesetzt und damit die Autolyse, die als ein sehr langsamer Prozess beschrieben wird (Kelly, 1986), beschleunigt werden. Dabei sollten neben den Proteinen auch langkettige Kohlenhydrate, Lipide und Nukleinsäuren einem enzymatischen Abbau zu kürzeren Einheiten unterliegen. Es wurden fünf Schüttelkolben in einem pH-Bereich von 7,0 bis 9,0 untersucht. Das Temperaturprogramm wurde so gewählt, dass die Temperatur, ausgehend von 25 °C, jede Stunde um 5 °C erhöht wurde. Die maximale Temperatur ist auf 45 °C festgelegt worden, da davon ausgegangen wurde, dass höhere Temperaturen zu einer abnehmenden enzymatischen Aktivität führen und die Gefahr der Denaturierung der Proteine steigt. Durch das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturbereiche sollten die jeweiligen Temperaturoptima vieler an der Autolyse beteiligter Enzyme erreicht werden.

Die Ergebnisse dieser Autolyse sind **Abbildung 5.6** zu entnehmen. Die Biotrockenmassekonzentration vor dem mechanischen Aufschluss betrug 33,7 g L⁻¹. Durch den Zellaufschluss nahm der Lysegrad erwartungsgemäß bis auf 70 % zu (t = 0 h). In einem Temperaturbereich von 25 °C bis 35 °C traten in allen Schüttelkolben kaum Veränderungen beim Lysegrad auf.

Jedoch sank er ab einer Temperatur von 40 °C auf ungefähr 40 % - 50 %, d. h. die Feststoffkonzentration stieg erneut an. Der abnehmende Lysegrad ließ sich mit der Präzipitation der Proteine erklären. Ab einer Temperatur von 40 °C nahm die Proteinkonzentration stark ab. Die zelleigene Enzymausstattung vermochte die Zellinhaltsstoffe unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht ausreichend abzubauen, um ein Ausfallen zu verhindern. Der Lysegrad lag nach fünf Stunden in einem Bereich zwischen 40 % und 50 %. Eine eindeutige Abhängigkeit zwischen Ausgangs-pH-Wert und Lysegrad konnte nicht festgestellt werden.

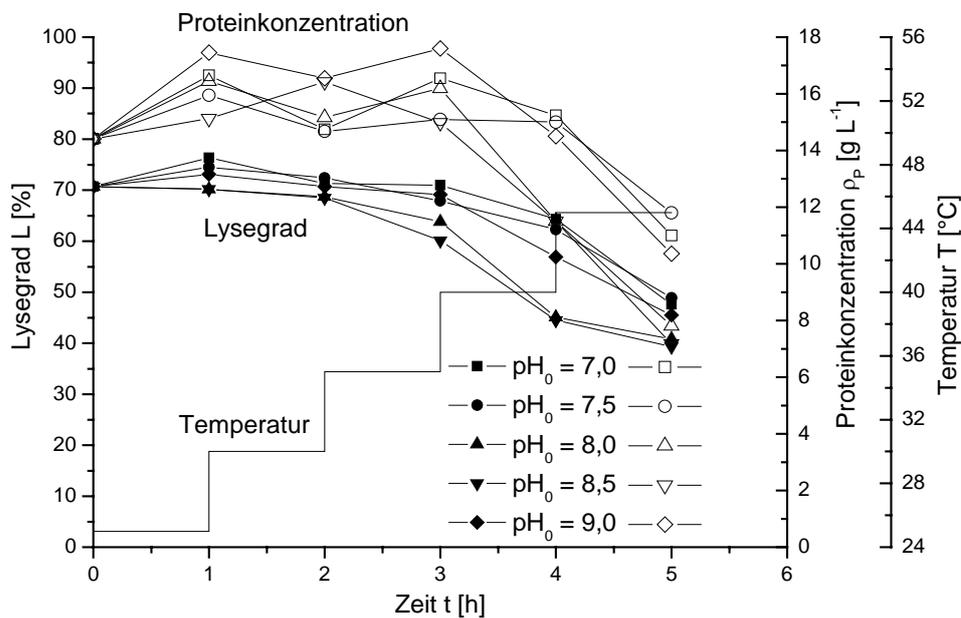


Abbildung 5.6: Hochdruckaufschluss von *Klebsiella planticola* mit anschließender Autolyse bei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten (Biotrockenmassekonzentration $33,7\ g\ L^{-1}$)

Die Ermittlung der optimalen Lysebedingungen erfordert durch die Vielzahl der beteiligten Enzyme und die Fülle möglicher Enzymwirkungen eine intensive Auseinandersetzung mit den Autolysevariablen. Nach Schütte (Schütte & Kula, 1990) müssen die Autolyseparameter Temperatur und Länge der Inkubation, pH-Wert, Molarität des Puffers und Stoffwechselzustand der Zellen empirisch für jeden Organismus ermittelt werden, um optimale Bedingungen für die Lyse zu erhalten. Generelle Aussagen lassen sich nicht machen, und eine Extrapolation auf neue Systeme ist daher schwierig (Hughes *et al.*, 1971).

Aufgrund dessen wurden keine weiteren Untersuchungen auf dem Gebiet der Autolyse von *Klebsiella planticola*-Zellen unternommen. Auf Literaturwerte konnte nicht zurückgegriffen werden.

5.2.3 Enzymatische Lyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation der Enzymkonzentration

Bei diesem Versuch wurde bei einem pH von 8,5 gearbeitet. Die Zugabe der alkalischen Protease (Subtilisin Carlsberg, Alkalase) erfolgte nach dem mechanischen Hochdruckaufschluss und einer einstündigen Autolysephase bei 37 °C. Vor der Zugabe wurde der pH-Wert erneut korrigiert. Die Biotrockenmassekonzentration betrug zu Beginn 31,7 g L⁻¹.

Es ließ sich feststellen, dass die Lyse in Bezug auf die Proteinkonzentration und die am Endpunkt erreichten Lysegrade in den Schüttelkolben ähnlich verlief (**Abbildung 5.7**). Die Menge an Enzym war in allen Ansätzen ausreichend, um die vorhandenen Proteine abzubauen. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 55 °C kam es innerhalb der ersten Stunde der Alkalasebehandlung zur Präzipitation von Proteinen und möglicherweise anderen Zellbestandteilen. Dies war an den abnehmenden Lysegraden bei gleichzeitig abnehmenden Proteinkonzentrationen in diesem Zeitintervall zu erkennen. Und zwar je mehr, desto geringer die eingesetzte Konzentration an Alkalase war. Im weiteren Verlauf der Lyse wurden jedoch sowohl die gelösten und als auch die ausgefallenen Proteine abgebaut, wodurch der Lysegrad wieder bis auf seinen Endwert stieg.

Die anfängliche Proteinkonzentration reduzierte sich in allen Fällen um 95 %. Eine höhere Enzymkonzentration führte lediglich zu einer schnelleren Reduzierung der Proteinkonzentration und zu einem früheren Erreichen des maximalen Lysegrades. Es stellten sich Lysegrade zwischen 72 % und 77 % ein.

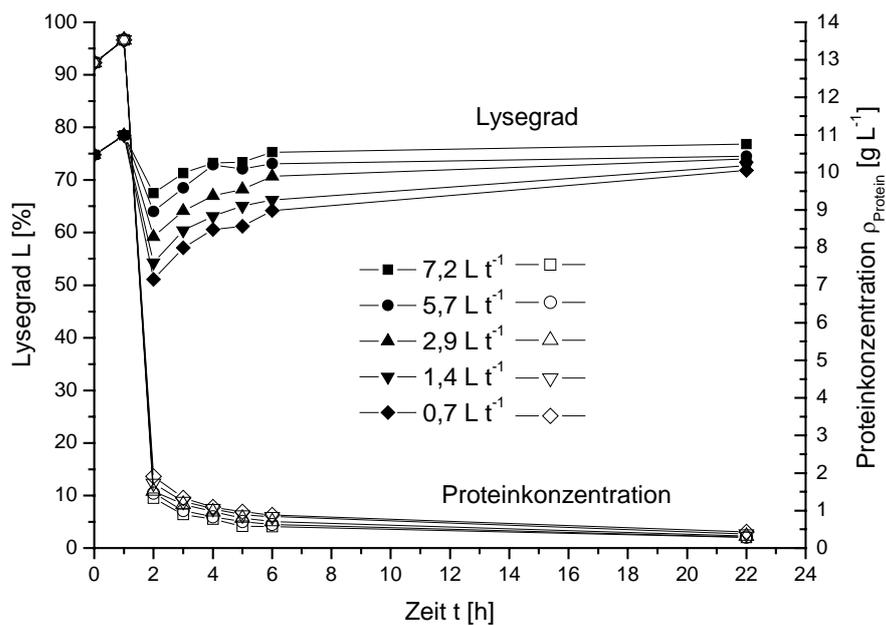


Abbildung 5.7: Hochdruckaufschluss von *Klebsiella planticola* mit anschließender enzymatischer Lyse unter Variation der Enzymkonzentration (Biotrockenmassekonzentration 31,7 g L⁻¹)

Durch die milden Reaktionsbedingungen während der Lyse werden Coenzyme und Wachstumsfaktoren wie Vitamine, die als Vorstufe für die Bildung bestimmter Coenzyme benötigt werden, höchstwahrscheinlich erhalten. Diese Coenzyme sind häufig Derivate von Vitaminen (z. B. Pyridoxalphosphat aus Pyridoxin; Thiamindiphosphat aus Thiamin; FMN und FAD aus Riboflavin).

Dieser Versuch zeigte, dass eine Enzymkonzentration von 1 L t_{BTM}⁻¹ ausreicht, um die Proteinkonzentration effektiv zu senken und dadurch ein in Bezug auf die Proteine hitzestabiles Lysat herzustellen.

5.2.4 Alkalische und saure Hydrolyse ganzer Zellen

In Gegenwart von starken Säuren und Laugen lassen sich zahlreiche chemische Bindungsarten hydrolytisch spalten. Neben den nicht kovalenten Bindungen, die z. B. durch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen hervorgerufen werden, spielen die kovalenten Bindungen die größte Rolle. Wichtige Bindungstypen sind die Peptidbindungen zwischen den Aminosäu-

ren der Proteine, die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden der DNA und RNA und die Esterbindungen innerhalb der Phospholipide der Membranen. Jede dieser Bindungen lässt sich entweder säure- oder alkalihydrolytisch spalten.

Innerhalb dieses Versuches wurden die Schüttelkolben mit der resuspendierten Biomasse für sechs Stunden in siedendes Wasser (100 °C) gestellt. Eine stündliche Probennahme sollte den Verlauf des Aufschlusses aufzeigen. Schon während der Zugabe der Natronlauge kam es durch die Verseifung der Phospholipide der Zellmembran (Belter *et al.*, 1988) zur Freisetzung des Cytoplasmalinhaltes und damit zur Lyse der Zellen, was durch eine plötzliche Viskositätszunahme und Klärung der Suspension zu beobachten war. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe der Salzsäure zu einem massiven Ausfall von makromolekularen Zellbestandteilen, was sich durch eine starke Flockenbildung bemerkbar machte. Die Präzipitation von Makromolekülen bei sauren pH-Werten ist ein bekanntes Phänomen (Harrison, 1991).

Abbildung 5.8 zeigt die Ergebnisse der alkalischen und sauren Hydrolyse ganzer Zellen. Sechs Hydrolyseansätze fanden unter alkalischen ($\text{pH}_0 = 12,5 / 12,0 / 11,5 / 11,0 / 10,5 / 10,0$, Feststoffkonzentration $32,3 \text{ g L}^{-1}$) und sechs Ansätze unter sauren Bedingungen ($\text{pH}_0 = 2,0 / 2,5 / 3,0 / 3,5 / 4,0 / 4,5$, Biotrockenmassekonzentration $33,7 \text{ g L}^{-1}$) statt.

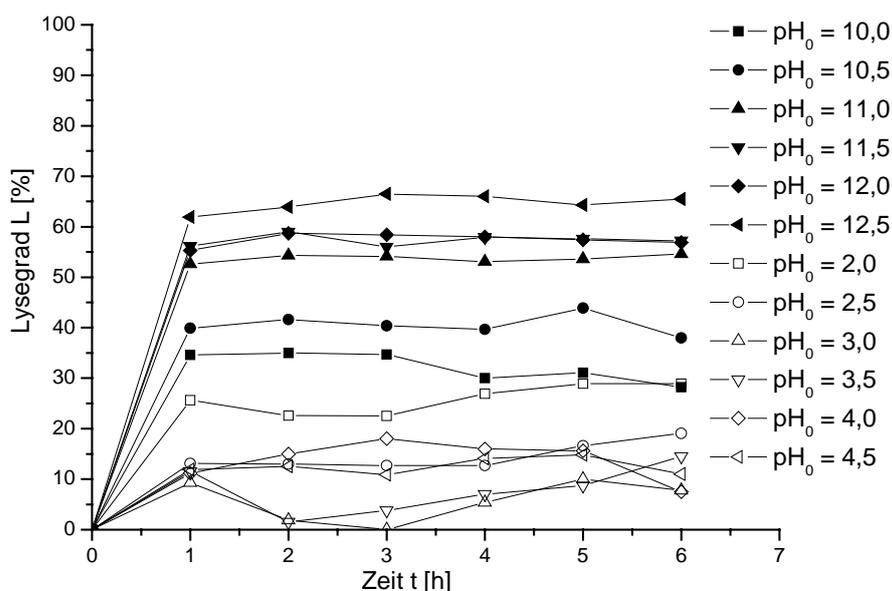


Abbildung 5.8: Alkalische und saure Hydrolyse von *Klebsiella planticola* unter Variation des Ausgangs-pH (Biotrockenmassekonzentration $33,7 \text{ g L}^{-1}$)

Die größten Veränderungen traten innerhalb der ersten Stunde auf. Die alkalische Hydrolyse verlief schneller und führte zu höheren Lysegraden als die saure Hydrolyse. Es ließ sich beobachten, dass im sauren Bereich niedrigere pH-Werte und im alkalischen Bereich höhere pH-Werte zu höheren Lysegraden führten. Der Lysegrad unter alkalischen Bedingungen betrug bis zu 65 %, während im sauren Bereich maximal 30 % erreicht werden konnten. Unter den gewählten Bedingungen war die saure Hydrolyse ineffektiv. Während der alkalischen Hydrolyse kam es zu einer zunehmenden Klärung der Zellsuspension.

Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration konnte gezeigt werden, dass durch die alkalische Hydrolyse bereits nach einer Stunde Proteine mit einer Konzentration von 11 g L^{-1} und damit in der gleichen Größenordnung wie durch einen mechanischen Aufschluss freigesetzt worden sind. Jedoch kam es im weiteren Verlauf der Hydrolyse zu keiner Reduzierung der Proteinkonzentration. Die Bestimmung in den Ansätzen der sauren Hydrolyse zeigte eine sehr niedrige Proteinkonzentration von unter 1 g L^{-1} , was auf die Präzipitation der Eiweiße hindeutete. Der fehlende Abbau der Proteine ließ sich in beiden Fällen mit den zu milden Reaktionsbedingungen erklären.

Nach beendeter Lyse kam es beim Abkühlen der Schüttelkolben dazu, dass die Ansätze im alkalischen Bereich eine gallertartige Konsistenz aufwiesen. Je höher der pH-Wert, desto stärker war dieses Phänomen ausgeprägt. Dies ließ auf die Anwesenheit von hochpolymeren organischen Verbindungen schließen, die durch die alkalische Hydrolyse nicht ausreichend depolymerisiert werden konnten. Bei den Substanzen handelte es sich vermutlich um genomische DNA. Bei hohen Temperaturen trennen sich die Stränge der DNA in ihre Einzelstränge, da die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basenpaaren gelöst werden. Zur Einzelstrangbildung kommt es auch durch Säure- oder Laugezugabe, die eine Ionisation der Basen zur Folge hat. Bei diesem Schmelzvorgang ändern sich die physikalischen Eigenschaften der DNA (u. a. die Viskosität). Die RNA wird durch das alkalische Milieu im Gegensatz zur DNA fragmentiert. Ursache dafür ist die reaktive 2'-OH-Gruppe der Ribose. Durch baseninduzierte Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe erfolgt der nukleophile Angriff des 2'-O auf das benachbarte Phosphat-Atom, wodurch das Phosphat-Rückgrat aufgebrochen wird (Nelson & Cox, 2001). Die Phosphodiesterbindungen der DNA werden dagegen nur im sauren pH-Bereich hydrolysiert. Vorhandene Plasmid-DNA wird im alkalischen Milieu kaum in ihrer Struktur beeinflusst, da sie, wenn sie in der supercoiled Form vorliegt, dicht verknäuelst und sich Hydroxidionen nicht anlagern können.

Abschließend betrachtet konnte die chemische Hydrolyse in Hinblick auf den Lysegrad in der hier durchgeführten Form mit dem Hochdruckaufschluss mit anschließender Proteasebehandlung nicht mithalten. Der Lysegrad lag mit ungefähr 65 % um 10 % niedriger, die Lysegeschwindigkeit jedoch deutlich höher. Bereits nach einer Stunde war die Lyse weitgehend abgeschlossen, und es traten im folgenden Zeitraum nur noch minimale Veränderungen auf.

5.2.5 Alkalische und saure Hydrolyse nach Hochdruckaufschluss

Mit diesem Versuch sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich die Geschwindigkeit bei der alkalischen Hydrolyse durch einen vorgeschalteten mechanischen Aufschluss erhöhen ließ. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob sich dadurch bei der sauren Hydrolyse höhere Lysegrade einstellten.

Dazu wurde die Zellsuspension mechanisch aufgeschlossen (drei Passagen bei 600 bar) und anschließend mit 2 M Natronlauge oder 2 M HCl versetzt und in siedendes Wasser gegeben. Die Ausgangs-pH-Werte betragen wie gehabt unter alkalischen Bedingungen $\text{pH}_0 = 12,5 / 12,0 / 11,5 / 11,0 / 10,5 / 10,0$ (Biotrockenmassekonzentration $32,1 \text{ g L}^{-1}$) und unter sauren Bedingungen $\text{pH}_0 = 2,0 / 2,5 / 3,0 / 3,5 / 4,0 / 4,5$ (Biotrockenmassekonzentration $33,5 \text{ g L}^{-1}$). Die Ergebnisse der alkalischen Hydrolyse (**Abbildung 5.9**) zeigten, dass sich der Lysegrad auf maximal 89 % verbesserte. Nach nur einer Stunde war bereits in allen Ansätzen ein Lysegrad von mindestens 80 % erreicht. Bereits nach wenigen Minuten konnte eine fast vollständige Klärung der Ansätze beobachtet werden. In den folgenden Stunden ergaben sich nur noch minimale Veränderungen des Lysegrades, sodass die Inkubationszeit für spätere Lysen auf eine Stunde gesenkt werden kann. Der vorherige Aufschluss erlaubt es darüber hinaus, die alkalische Lyse mit nur geringen Einbußen in Bezug auf den Lysegrad schon bei einem pH-Wert von 11,0 durchzuführen. Eine Reduzierung der Proteinkonzentration konnte auch in diesem Fall nicht beobachtet werden.

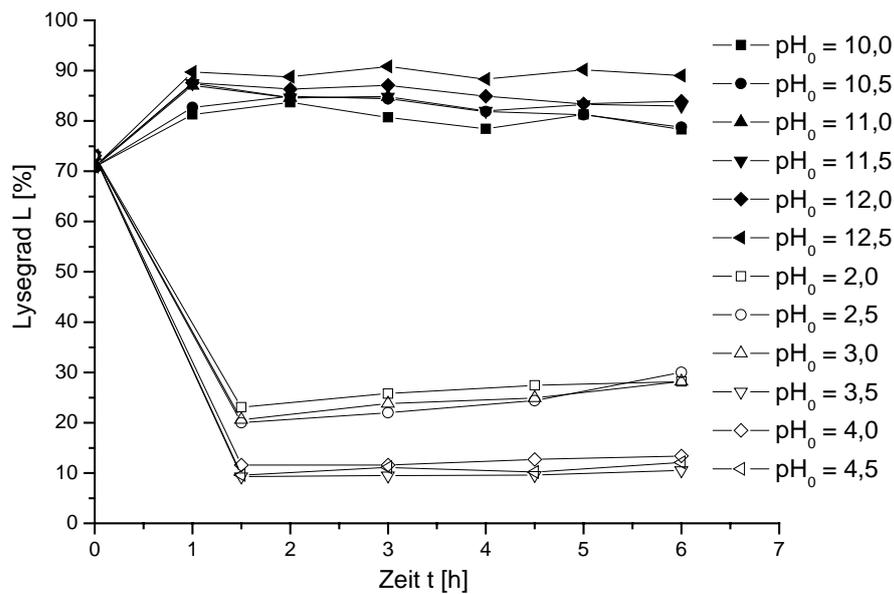


Abbildung 5.9: Hochdruckaufschluss von *Klebsiella planticola* mit anschließender alkalischer und saurer Hydrolyse unter Variation des Ausgangs-pH-Wertes (Biotrockenmassekonzentration $32,1 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $33,5 \text{ g L}^{-1}$)

Wie **Abbildung 5.9** zeigt, führte die saure Hydrolyse nach dem Hochdruckaufschluss zu einem Lysegrad von wiederum maximal 30 %. Schon während der Einstellung des pH-Wertes kam es zu dem bereits unter **Kapitel 5.2.4** beobachteten massiven Ausfall von Zellbestandteilen. Dieser Ausfall konnte innerhalb des untersuchten Zeitraumes durch die chemische Hydrolyse nicht ausgeglichen werden. Hier zeigte sich, dass niedrigere Ausgangs-pH-Werte zu höheren Lysegraden führten.

Es lässt sich abschließend feststellen, dass die alkalische Hydrolyse mit vorgeschaltetem Hochdruckaufschluss in Hinblick auf den Lysegrad und die Lysegeschwindigkeit gegenüber dem mechanischen Aufschluss mit anschließender Alkalasebehandlung im Falle von *Klebsiella planticola* effektiver war. Die erzielten Lysegrade lagen mit über 85 % höher als die durch Enzymbehandlung erhaltenen (72 % - 77 %). Die saure Hydrolyse hingegen zeigte sich auch in dieser Variante sowohl in Bezug auf den Lysegrad als auch auf die Lysegeschwindigkeit als ineffektives Verfahren zum Aufschluss der Zellen.

5.2.6 Zusammenfassende Betrachtung der Lyseversuche

Abbildung 5.10 gibt noch einmal in grafischer Übersicht die verschiedenen Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab wieder. Die maximal erreichten Lysegrade sind übersichtshalber mit in das Schema aufgenommen worden. Durch Präzipitatbildung konnte sich der Lysegrad innerhalb eines Aufschlussgangs auch wieder reduzieren.

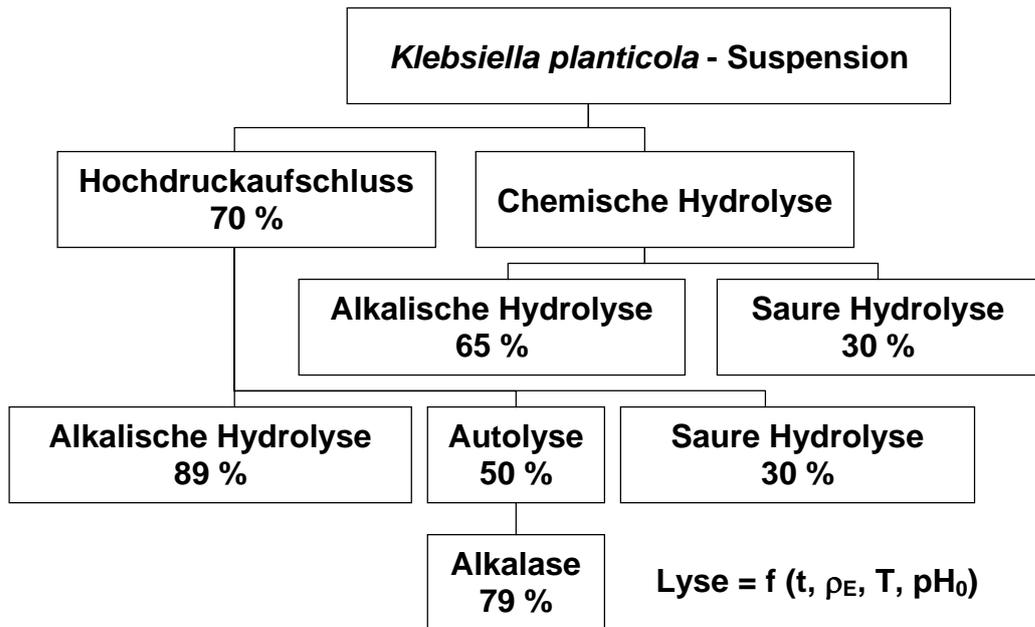


Abbildung 5.10: Schüttelkolbenversuche mit *Klebsiella planticola* mit Angabe der maximal erreichten Lysegrade. Die Biomasse für die Lyseversuche wurde durch Fermentationen auf dem halbsynthetischen modifizierten Medium A1-160 im Rührkesselreaktor gewonnen.

Die Abstimmung der Aufschlussparameter für den Hochdruckaufschluss führten zu einem optimalen Arbeitsdruck von 600 bar und einer Passagenanzahl von drei. So konnte bereits ein Lysegrad von 70 % erreicht werden.

Die höchsten Lysegrade und -geschwindigkeiten konnten mit der alkalischen Hydrolyse nach einem mechanischen Hochdruckaufschluss erzielt werden. Bereits nach einer Stunde konnten Lysegrade von knapp 90 % (pH 12,5, 100 °C) erzielt werden. Die Behandlung des Homogenisats mit einer alkalischen Protease führte bei Inkubation über Nacht zu Lysegraden von 77 %. Durch Einbeziehung der Proteinkonzentration in die Beurteilung der Lyseergebnisse, lag die enzymatische Lyse klar im Vorteil. Durch den proteolytischen Abbau sank die Konzentration an Proteinen um 95 %. Bei der alkalischen Hydrolyse konnte keine Reduzierung

der Proteinkonzentration erreicht werden (siehe **Kapitel 5.2.4**). Es zeigte sich, dass bei der Hitzesterilisation ein Großteil der Proteine durch Denaturierung ausfiel. Die Restproteine und Peptide der enzymatisch behandelten Lysate hingegen blieben in Lösung. Die Behandlung des *Klebsiella planticola*-Lysates mit der Protease führte, wie später gezeigt wird, zu einem Aminosäuregehalt der Extrakt trockenmasse von 31 % - 41 %. Einen weiteren Vorteil stellten die milden Lysebedingungen dar. Durch sie konnten wichtige Wachstumsfaktoren wie Vorstufen für Coenzyme und auch die Coenzyme selbst erhalten bleiben.

Für die Wachstumsversuche wurde daher für die Herstellung mittels Hochdruckhomogenisation und anschließender Proteasebehandlung gewählt.

5.3 Fermentationen von *Klebsiella planticola* auf einem halbsynthetischen Medium

Ziel dieser Fermentationen war es, das vorliegende System bestehend aus dem *Klebsiella planticola*-Stamm und dem halbsynthetischen Medium zu charakterisieren. Dabei sollten Daten gewonnen werden, die später als Vergleichsgrundlage bei Kultivierungen mit Lysat dienen.

Es folgt zunächst die Auswertung einer charakteristischen Fermentation von *Klebsiella planticola* auf einem halbsynthetischen Medium mit Glucose und Maltose als Kohlenstoffquelle und Hefeextrakt als komplexem Bestandteil in einem Rührkesselreaktor. Es handelt sich um die Fermentation mit der Nummer 84; sie wird im Folgenden mit F84 abgekürzt.

Nach einer kurzen Adaption- und Beschleunigungsphase trat die Bakterienkultur in eine erste Phase mit exponentiellem Wachstum ein. Dies war am linearen Kurvenverlauf in der halb-logarithmischen Auftragung der optischen Dichte (**Abbildung 5.11**) zu erkennen. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit betrug in diesem Zeitraum $\mu = 0,92 \text{ h}^{-1}$.

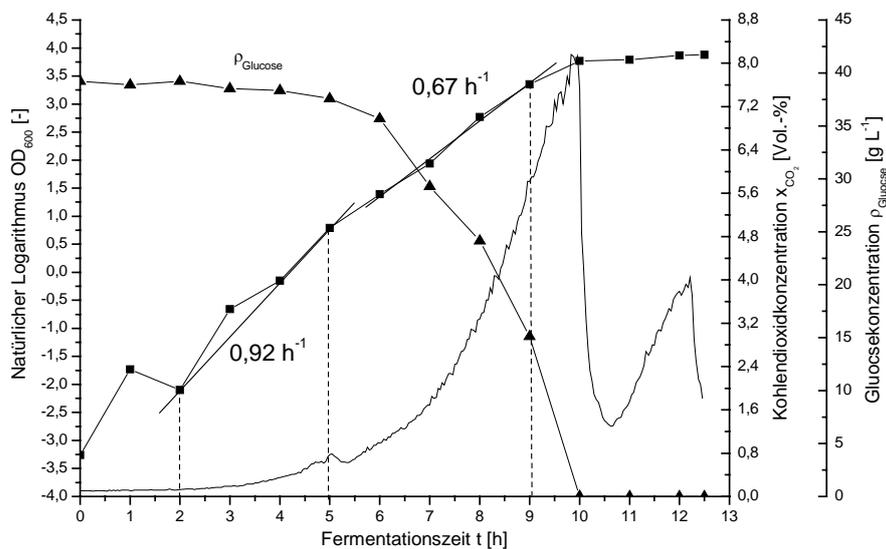


Abbildung 5.11: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium (F84)

Das Ende dieser Phase nach fünf Stunden ließ sich durch das Abknicken der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft und dem Anstieg der Sauerstoffsättigung gut erkennen (**Abbildung 5.12**). In dieser ersten Wachstumsphase kam es zur Verstoffwechslung der Aminosäuren des Hefeextraktes. Sowohl die Glucosekonzentration als auch die Konzentration der reduzierenden Zucker veränderten sich in diesem ersten Abschnitt kaum. Durch Bestimmung des Aminosäurespektrums zu diesem Zeitpunkt der Fermentation konnte der vollständige Abbau der Aminosäuren nachgewiesen werden.

Die CO₂-Kurve zeigt im weiteren Kultivierungsverlauf zwei ausgeprägte Anstiege mit darauffolgendem Abfall. Durch das Vorliegen von zwei C-Quellen, Glucose und Maltose, kam es zu diesen zwei Wachstumsphasen.

Diese Diauxie, die nach 5,5 Stunden auftrat, ließ sich auch anhand der optischen Dichte gut verfolgen (**Abbildung 5.12**). In der Phase mit dem stärksten Anstieg der Kohlendioxidkonzentration wurde die Glucose vollständig abgebaut. Dies geht aus der Bestimmung der Glucosekonzentration hervor. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit betrug 0,67 h⁻¹. Der Verbrauch der Kohlenstoffquelle führte nach etwa 9,5 Stunden zu einem starken Abfall des CO₂-Signals und zu einer neuerlichen 45-minütigen Adaptionsphase. In dieser stieg die optische Dichte nur geringfügig an.

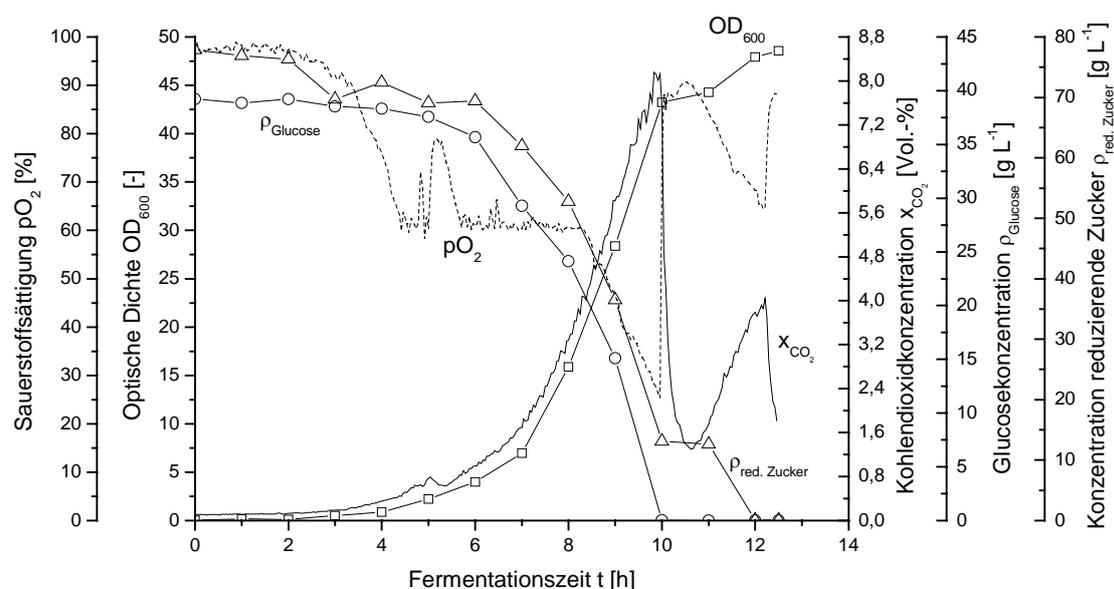


Abbildung 5.12: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium (F84)

Innerhalb dieses Zeitraumes wurden die für den Maltosetransport und -stoffwechsel benötigten Proteine synthetisiert. Maltose gelangt über das Porin LamB durch die äußere Membran in das Periplasma (Greller, 2001). Dort wird sie durch ein spezifisches Maltosebindeprotein eines ABC-Transporters (ATP binding cassette) gebunden und über die Cytoplasmamembran gebracht (Austermuhle *et al.*, 2004). Der Glucosetransport über die innere Membran erfolgt hingegen durch das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase System (Meadow *et al.* 1990; Meadow *et al.* 2005).

Der erneute Anstieg des CO₂-Signals nach 10,5 Stunden zeigt die Verstoffwechslung der Maltose an. Es war auch ein Anstieg der optischen Dichte zu beobachten. Dieser war jedoch weitaus geringer als in der vorherigen Phase. Mit Hilfe der DNS-Methode wurde die Summe aller reduzierender Verbindungen im Medium nachgewiesen. Nach 9,5 Stunden war die Glucose zwar verstoffwechselt und damit ein Großteil der reduzierenden Substanzen, jedoch lagen letztere noch in einer Konzentration von 12 g L⁻¹ (berechnet als Maltose) vor (**Abbildung 5.12**). Dabei handelte es sich hauptsächlich um Maltose.

Durch den Verbrauch der letzten Nährstoffquelle (Konzentration an reduzierenden Substanzen $\rho_{\text{red. Zucker}} = 0 \text{ g L}^{-1}$) trat die Kultur nach 12 Stunden in die stationäre Phase ein. Die Bestimmung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit in der Maltoseabbauphase konnte aufgrund der geringen Datendichte nicht erfolgen. Durch die Analyse der letzten Probe der Fermentation auf ihre Aminosäurezusammensetzung konnte gezeigt werden, dass keine nennenswerten Konzentrationen an diesen vorlagen. Ebenso zeigte ein diskontinuierliches SDS-Gel keine Proteinbanden im zellfreien Fermentationsüberstand.

Die oben dargestellte Fermentation wurde nun mehrfach unter gleichen Bedingungen im Rührkesselreaktor wiederholt. Gekennzeichnet werden die Kultivierungen durch die Abkürzungen F85, F86 und F90.

Die optische Dichte der über Nacht inkubierten Vorkulturen betrug $OD_{600} = 2,0 - 3,4$. Im Vergleich zu den Vorkulturen auf TB-Medium (**Kapitel 5.1**) wiesen die Vorkulturen auf dem halbsynthetischen Medium optische Dichten mit bis zu zehnfach niedrigeren Werten auf. Ein Grund dafür könnte eine frühzeitige Stickstofflimitierung durch die fehlende pH-Statisierung mit Ammoniakwasser sein.

Wie aus **Abbildung 5.13** ersichtlich, zeigte die optische Dichte eine Übereinstimmung sowohl in den Verläufen als auch in den maximal erreichten OD_{600} -Werten ($OD_{600} = 44 - 49$). Ein Vergleich mit den auf TB-Medium erzielten maximalen optischen Dichten lässt erkennen, dass auf dem halbsynthetischen Medium die OD -Werte um zehn Einheiten höher lagen. Jedoch lagen die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten ($1,4 \text{ h}^{-1} - 1,5 \text{ h}^{-1}$ und $0,9 \text{ h}^{-1} - 1,1 \text{ h}^{-1}$) auf TB-Medium deutlich höher, was neben den sehr viel kürzeren Adaptionsphasen (0,5 Stunden) zu Fermentationszeiten von maximal 5,5 Stunden beitrug.

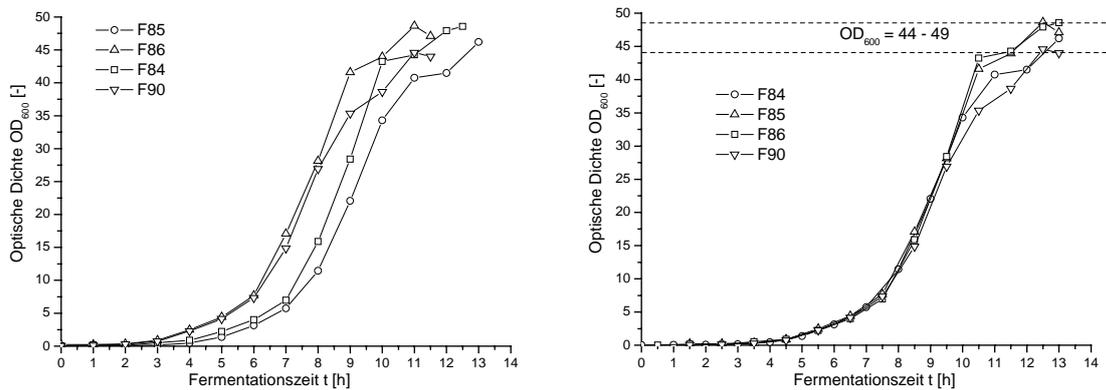


Abbildung 5.13: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium: links: Verlauf der optischen Dichte; rechts: Adaptionsphasenkorrigierte OD_{600} -Verläufe

Tabelle 5.2 zeigt die bestimmten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten für die Phasen des Aminosäuren- und Glucoseabbaus.

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der ermittelten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten bei der Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium im Rührkesselreaktor

Fermentation	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ [h^{-1}]	
	Aminosäurenabbau	Glucoseabbau
F84	0,92	0,67
F85	1,14	0,66
F86	0,97	0,68
F90	0,94	0,62

Abbildung 5.14 stellt die Veränderungen der Kohlendioxidkonzentrationen dar. Deutlich zu erkennen sind die jeweiligen anfänglichen Schwankungen, die auf die Verstoffwechslung der Aminosäuren des Hefeextraktes zurückzuführen waren. Außerdem zeigten alle Kultivierungen zwei ausgeprägte Peaks, die jeweils für den Verbrauch der beiden Kohlenstoffquellen Glucose und Maltose standen. Die größten Übereinstimmungen zeigten F84 und F85.

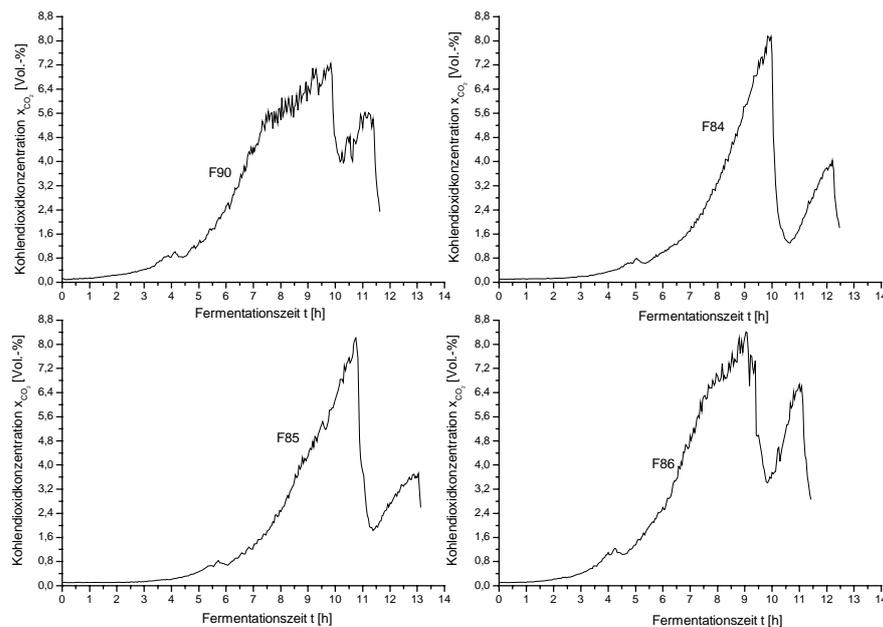


Abbildung 5.14: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium

Die beiden Fermentationen F86 und F90 wiesen einen veränderten Verlauf im Endbereich der Glucoseverstoffwechslung auf. Dort kam es nach ungefähr 7,5 Stunden zu einem verlangsamten Anstieg der CO₂-Konzentration und in der Phase des Maltoseabbaus zu deutlich höheren CO₂-Ausstößen. Die verlangsamte Kohlendioxidbildung nach 7,5 Stunden deutete auf eine beginnende Limitierung oder die Bildung von wachstumshemmenden Stoffwechselprodukten innerhalb der Phase des Glucoseabbaus hin. **Abbildung 5.15** zeigt, dass nach dem Abknicken der CO₂-Kurven auch die exponentielle Wachstumsphase verlassen wurde.

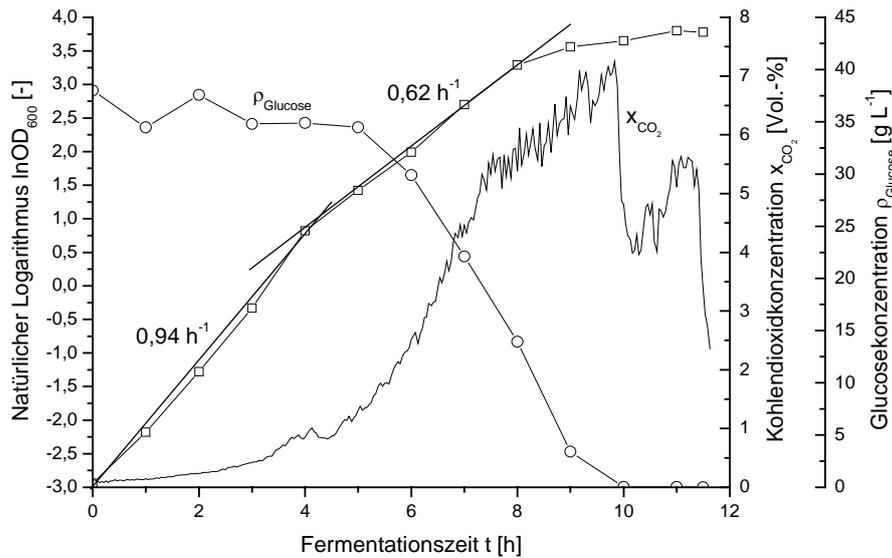


Abbildung 5.15: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium (F90)

Abbildung 5.16 zeigt mit der Acetatkonzentration eine weitere analytisch bestimmte Größe. Der Acetatgehalt stieg zusammen mit der optischen Dichte an. Auch nach Verbrauch der Glucose in der Phase des Maltoseabbaus kam es zu einem weiteren Anstieg des Acetats im Medium.

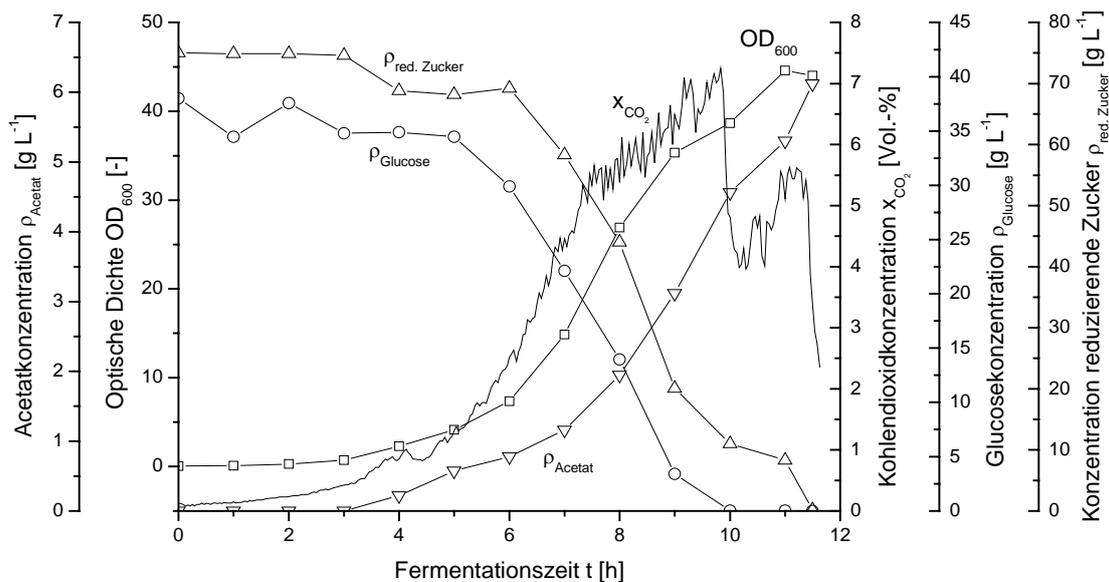


Abbildung 5.16: Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium (F90).

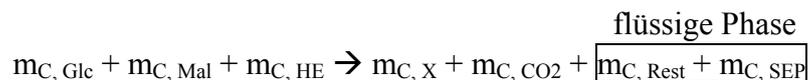
Die verringerte spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in der Mitte der Phase des Glucoseabbaus nach etwa 7,5 Stunden (**Abbildung 5.15**), die sich auch im Abknicken des CO₂-Signals zu diesem Zeitpunkt widerspiegelte, ließ sich mit der Acetatkonzentration von etwa 1,4 g L⁻¹ erklären. Im Gegensatz zu den Fermentationen mit Lysat, bei denen das gebildete Acetat in einer letzten Wachstumsphase reduziert wurde (**Kapitel 5.6**), konnte bei den Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium kein solcher Abbau beobachtet werden.

Die Acetatbildung hatte ihren Ursprung in der verwendeten Kohlenstoffquelle. Durch hohe Wachstumsgeschwindigkeiten und einen Substratüberschuss wurde bei *Escherichia coli* auch unter strikt aeroben Bedingungen die Bildung von Acetat beobachtet (Kleman & Strohl, 1994). Die Aufnahme der Glucose erfolgt schneller als ihre Umsetzung in Biomasse und Energie, was im Stoffwechsel zur Bildung von Acetat führt. Als limitierende Stoffwechselwege können im Fall von *Escherichia coli* der Zitronensäurezyklus (Han *et al.*, 1992) und die Atmungskette genannt werden (Majewski & Domach, 1992). Durch die nahe Verwandtschaft von *Klebsiella planticola* mit *Escherichia coli* scheinen die Gründe der Acetatbildung auch in diesem Fall in einer hohen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit und einem Substratüberschuss zu liegen.

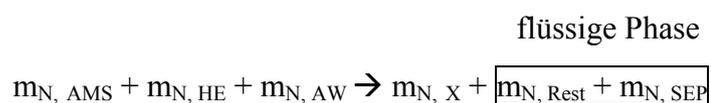
5.4 Bilanzierungen für die Fermentationen von *Klebsiella planticola* auf einem halbsynthetischen Medium

Das Ziel der Bilanzierung lag darin, die Verteilung des Kohlenstoffs und Stickstoffs zu Beginn der Fermentation und zum Zeitpunkt der Zellernte festzustellen. Dadurch sollte eine Vergleichsmöglichkeit für die späteren Fermentationen mit Lysat geschaffen werden.

Der Kohlenstoffbilanzierung lag die Annahme zu Grunde, dass sich der zu Beginn der Kultivierung vorliegende Kohlenstoff anteilig aus dem der Glucose, dem der Maltose und dem des Hefeextraktes zusammensetzte. Am Kultivierungsende befand sich der Kohlenstoff entweder in der Biomasse oder er war dem Fermenter über die Abluft in Form von Kohlendioxid entwichen. Außerdem lag in der flüssigen Phase ein Teil des Kohlenstoffes entweder als unverwertbarer Rest (Restanteil Medium) oder als Stoffwechselendprodukt (z. B. Acetat) vor. Nachfolgende Gleichung verdeutlicht die gemachte Aussage:



Der zum Startzeitpunkt vorliegende Stickstoff setzte sich anteilig aus dem des Ammoniumsulfats und dem des Hefeextraktes zusammen. Zusätzlich zu diesen Stickstoffquellen trat eine weitere in Erscheinung. Der pH-Wert wurde vor und während der Kultivierung mit 25 %igem Ammoniakwasser geregelt. Dieser Umstand erschwerte die Bilanzierung des Stickstoffs. Am Ende der Kultivierung verteilte sich der Stickstoff auf die gebildete Biomasse, auf Stoffwechselendprodukte und auf nicht verwertete stickstoffhaltige Verbindungen (Restanteil Medium). Die zuletzt genannten Gruppen bildeten zusammen die flüssige Phase. Innerhalb des Restanteils im Medium befand sich auch das hinzudosierte Ammoniakwasser. Es ergab sich für die Bilanzierung folgender Ausdruck:



Die Differenzierung innerhalb der flüssigen Phase am Ende der Kultivierung konnte sowohl für den Kohlenstoff als auch für den Stickstoff nur teilweise durchgeführt werden.

Für die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffmasse in der Kultivierungssuspension wurden je zwei Proben direkt vor dem Animpfen sowie zum Zeitpunkt der Zellernte entnom-

men und durch Zentrifugation geklärt. Bei den Proben nach der Kultivierung wurde sowohl im Pellet (Biomasse sowie evtl. Fällungsprodukte) als auch im Überstand (Restanteil Medium, Stoffwechselprodukte) der C- bzw. N-Gehalt bestimmt. Bei den Proben vor dem Animpfen wurde nur der Überstand der Analyse zugeführt, da die Masse des Pellets (wenn vorhanden) verschwindend gering war und so für eine Elementaranalyse nicht ausreichte. Die Überstände wurden für die Analyse gefriergetrocknet. Die Trocknung der Zellpellets erfolgte hingegen bei 60 °C im Vakuumtrockenschrank.

Die Bilanzierung erfolgt nun für fünf auf dem halbsynthetischen Medium durchgeführten Fermentationen.

Startbedingungen (t = 0 h) für die Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem halbsynthetischen modifizierten A1-160-Medium in einem Rührkesselreaktor

Rechnerisch ergaben sich bei einem Arbeitsvolumen von 5 L für den **Kohlenstoff** folgende Startbedingungen:

Einwaage Glucose	: 200,0 g	Einwaage Maltose	: 50,0 g
Anteil Kohlenstoff	: 40,0 %	Anteil Kohlenstoff	: 42,1 %
Masse Kohlenstoff	: 80,0 g	Masse Kohlenstoff	: 21,1 g

Einwaage Hefeextrakt:	10,0 g
Anteil Kohlenstoff	: 45,0 %
Masse Kohlenstoff	: 4,5 g

Theoretisch befanden sich damit vor dem Animpfen 105,6 g Kohlenstoff im Fermenter. Dieser Wert wurde analytisch überprüft. **Tabelle 5.3** zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 5.3: Theoretische und analytisch ermittelte Kohlenstoffmenge (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	F84	F85	F86	F90	F93
Kohlenstoff, analytisch	95,3 g (90,2 %)	102,4 g (96,7 %)	91,7 g (86,8 %)	97,4 g (92,2 %)	99,7 g (94,4 %)
Kohlenstoff, rechnerisch	105,6 g (100 %)				
Differenz (analytisch - rechnerisch)	-10,3 g (-9,8 %)	-3,2 g (-3,3 %)	-13,9 g (-13,2 %)	-8,2 g (-7,8 %)	-5,9 g (-5,6 %)

Es zeigte sich, dass bei allen Proben analytisch weniger Kohlenstoff nachweisbar war, als rechnerisch vorliegen müsste. Dies ließ sich damit erklären, dass während der Hitzesterilisation ein Teil der kohlenstoffhaltigen Verbindungen des Hefeextraktes ausfiel. Ein Hinweis auf die Richtigkeit der Annahme zeigt **Tabelle 5.4**. Aus ihr wird ersichtlich, dass der theoretische Trockenstoff von 301 g (Summe aller eingewogenen Bestandteile für 5 L Medium) in vier von fünf Fällen nicht erreicht wurde. Andererseits zeigten die Differenzen zwischen den Werten die Genauigkeit der Analysenmethode. Messfehler ließen sich trotz sorgfältiger Analyse nicht vollständig ausschließen.

Tabelle 5.4: Ergebnisse der Trockenstoffbestimmung vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	F84	F85	F86	F90	F93
Trockenstoff, rechnerisch	301 g				
Trockenstoff, analytisch	285 g	300 g	280 g	305 g	295 g

Nach der Betrachtung des Kohlenstoffs soll nun ein Blick auf den Stickstoff geworfen werden. Die Auswertung erfolgte analog zu der des Kohlenstoffs. Rechnerisch ergaben sich bei einem Arbeitsvolumen von 5 L für den **Stickstoff** folgende Startbedingungen:

Einwaage Ammoniumsulfat	: 30,0 g	Einwaage Hefeextrakt:	10,0 g
Anteil Stickstoff	: 21,2 %	Anteil Stickstoff	: 12,5 %
Masse Stickstoff	: 6,3 g	Masse Stickstoff	: 1,3 g

Theoretisch befanden sich damit vor dem Animpfen 7,6 g Stickstoff im Fermenter. Dieser Wert wurde analytisch wie bereits für den Kohlenstoff überprüft. **Tabelle 5.5** zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 5.5: Theoretische und analytisch ermittelte Stickstoffmenge (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	F84	F85	F86	F90	F93
Stickstoff, analytisch	9,9 g (134 %)	9,5 g (128 %)	10,7 g (145 %)	10,2 g (138 %)	9,2 g (124 %)
Stickstoff, rechnerisch	7,6 g (100 %)				
Differenz (analytisch - rechnerisch)	2,5 g (34 %)	2,1 g (28 %)	3,3 g (45 %)	2,8 g (38 %)	1,8 g (24 %)

Es zeigte sich, dass bei allen Proben analytisch mehr Stickstoff (bis zu 45 %) nachweisbar war, als rechnerisch vorliegen müsste. Dies ließ sich mit der Einstellung des pH-Wertes (Korrekturmittel: 25 %iges Ammoniakwasser) vor dem Animpfen auf seinen Anfangswert von pH = 7,0 erklären. Durch Wägung konnte die zugegebene Ammoniakwassermasse ermittelt werden. Die Auswertung ergab, dass ein Großteil des zusätzlich im Medium nachgewiesenen Stickstoffs aus dem Ammoniakwasser kam. Die Quantifizierung der Zugabemenge der Lauge über die Laufzeit der Schlauchpumpe war nicht möglich. Durch den hohen Dampfdruck des Ammoniakwassers verdampfte ein Großteil der Lauge im Schlauch und so führte nicht jede Umdrehung der Pumpe zur Dosierung des gleichen Volumens.

Bedingungen für die Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem halb-synthetischen modifizierten A1-160-Medium in einem Rührkesselreaktor zum Zeitpunkt der Zellernte ($t = t_{\max}$)

Am Ende der Kultivierungen wurden der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt in den beiden nach der Zentrifugation erhaltenen Fraktionen (flüssig und fest) bestimmt. Außerdem wurde über das CO₂-Signal die Menge an Kohlenstoff berechnet, die während der Kultivierung über die Abluft entwichen war.

Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der *Klebsiella planticola*-Biomasse ergab im Mittelwert 10,3 % N und 40,9 % C.

Tabelle 5.6 zeigt die Ergebnisse. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (**Tabelle 5.3**) jeder Fermentation.

Tabelle 5.6: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium und einem Arbeitsvolumen von 5 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse aus **Tabelle 5.3**

Fermentation	F84	F85	F86	F90	F93
Kohlenstoff, flüssige Phase	10,0 g (10,5 %)	29,0 g (28,3 %)	17,9 g (19,6 %)	13,5 g (13,9 %)	9,2 g (9,3 %)
Biomasse	40,6 g (42,6 %)	40,0 g (39,0 %)	41,2 g (44,9 %)	39,0 g (40,1 %)	40,6 g (40,7 %)
Kohlendioxid Abluft	32,8 g (34,4 %)	36,0 g (35,2 %)	35,4 g (38,6 %)	45,9 g (47,1 %)	38,2 g (38,3 %)
Summe C, analytisch	83,4 g (87,5 %)	105,0 g (102,5 %)	94,5 g (103,1 %)	98,4 g (101,0 %)	88,0 g (88,3 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-11,9 g (-12,5 %)	2,6 g (2,5 %)	2,9 g (3,1 %)	1,0 g (1,0 %)	-11,7 g (-11,7 %)

Es zeigte sich, dass der Anteil des Kohlenstoffs, der in der Biomasse gebunden ist, mit etwa 40 % bei allen Kultivierungen konstant ausfiel. Schwankungen ergaben sich bei den Anteilen in der Abluft und bei den Anteilen in der flüssigen Fraktion. Bei den Fermentationen F84 und F93 ergab die Summierung des Kohlenstoffs am Ende der Kultivierung mit -12,5 % und

-11,8 % die größten Abweichungen. Hier konnte am Ende durch die Summierung weniger Kohlenstoff wiedergefunden werden, als zu Beginn vorgelegt wurde. Mögliche Fehlerursachen waren die Elementaranalyse und die Erfassung der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft. Die Kultivierungen F85, F86 und F90 zeigten nach Summierung der Kohlenstoffmassen eine sehr geringe Abweichung vom anfänglich vorgelegten Kohlenstoff.

Im Fall von Fermentation F90 betrug die Acetatkonzentration (**Abbildung 5.16**) zum Zeitpunkt der Zellernte $6,1 \text{ g L}^{-1}$ ($30,6 \text{ g}$ in 5 L). Das entsprach einer Kohlenstoffmasse von $12,2 \text{ g}$. Wie aus **Tabelle 5.6** zu entnehmen ist, betrug der Kohlenstoffanteil im Medium $13,9 \%$ ($13,5 \text{ g}$). Das heißt, dass fast der gesamte Kohlenstoff im Medium aus dem Acetat stammte. Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass auch bei den anderen in **Kapitel 5.3** vorgestellten Fermentationen ein Großteil des Kohlenstoffs im Medium am Ende der Fermentation in Form des Stoffwechselproduktes Acetat vorlag. Ein weiterer Grund, der diese Aussage untermauert, ist, dass am Ende der Fermentationen im zellfreien Überstand weder Glucose, reduzierende Substanzen, Proteine noch Aminosäuren in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der Bilanzierung des Stickstoffs zeigen **Tabelle 5.7**. Die in Klammern gesetzten Werte geben die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen nach der pH-Werteinstellung (**Tabelle 5.5**) jeder Fermentation wieder.

Tabelle 5.7: Verteilung des Stickstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium und einem Arbeitsvolumen von 5 L . Die in Klammern gesetzten Werte geben die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen nach der pH-Werteinstellung aus **Tabelle 5.5** wieder

Fermentation	F84	F85	F86	F90	F93
Stickstoff, flüssige Phase	14,6 g	13,8 g	14,5 g	12,1 g	13,1 g
Biomasse	9,9 g	9,8 g	10,1 g	9,3 g	11,6 g
Summe N, analytisch	24,5 g (9,9 g)	23,5 g (9,5 g)	24,5 g (10,7 g)	21,4 (10,2)	24,6 g (9,2 g)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	14,6 g	14,0 g	13,8 g	11,2 g	15,4 g

Zunächst fiel auf, dass der Stickstoffgehalt am Ende aller Kultivierungen deutlich höher lag als deren Ausgangswert nach der pH-Wert Einstellung. Es konnte durch Wägung der zugegebenen Laugemenge nachgewiesen werden, dass dies auf die pH-Regelung zurückzuführen war. Außerdem ging aus den Ergebnissen hervor, dass die Zuführung einer externen Stickstoffquelle (in Form des Ammoniakwassers) für die Biomassenbildung essentiell war. Durch das Ammoniumsulfat und den Hefeextrakt wurden dem Medium nur 7,6 g Stickstoff zugeführt. Für die Biomassenbildung wurden aber mindestens 9,3 g benötigt.

Fazit

Durch die Bilanzierungen konnte der Weg des Kohlenstoffs und Stickstoffs während der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium nachgezeichnet werden.

Abbildung 5.17 zeigt in der graphischen Darstellung die Verteilung des Kohlenstoffs zu Beginn und zum Zeitpunkt der Zellernte. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte aus den fünf ausgewerteten Fermentationen. Der zu Beginn vorgelegte Kohlenstoff (97,3 g) entstammte mit 82,3 % zum größten Teil der Hauptkohlenstoffquelle Glucose (80 g). Auf die Maltose entfielen 20,6 % (20 g) und auf den Hefeextrakt 4,6 % (4,5 g). Am Ende der Fermentation fand sich der Kohlenstoff zu 41,5 % (40,3 g) in der Biomasse, zu 38,7 % (37,7 g) in der Abluft und zu 16,3 % (15,9 g) im Medium.

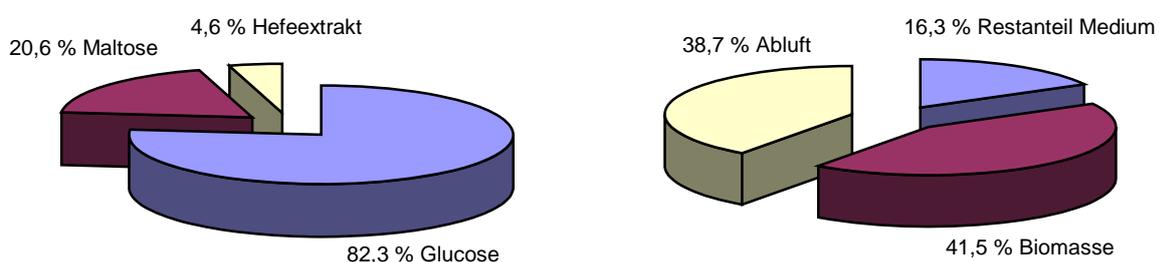


Abbildung 5.17: Verteilung des Kohlenstoffs zu Beginn und zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium

Die Bilanzierung des Stickstoffs zeigte, dass die Zuführung einer externen Stickstoffquelle in Form des Ammoniakwassers für die Biomassenbildung essentiell war. Sogleich erschwerte der Einsatz des Ammoniakwassers die Bilanzierung.

5.5 Lysatanalytik

Die in diesem Kapitel gemachten Aussagen zeigen die Ergebnisse der Charakterisierung der Lysate für die Wachstumsversuche. Gewonnen wurden die Lysate durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss (drei Passagen bei 600 bar) und anschließende Proteasebehandlung (**Kapitel 5.2.3**).

Tabelle 5.8 und **Tabelle 5.9** geben die Ergebnisse der Analysen wieder. In der ersten Spalte „Zyklus“ ist angegeben, für welchen Zyklus das Lysat eingesetzt wurde. Die Spalte „Fermentation“ gibt die Nummer der Kultivierung mit dem entsprechenden Lysat aus Spalte 1 an. Das Volumen der Lysate sowie der Lysegrad, der durch die Lyse erzielt werden konnte, finden sich in der dritten und vierten Spalte.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der Lysatcharakterisierung (Teil 1). Die Lysate wurden aus *Klebsiella planticola*-Biomasse durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss und anschließende Proteasebehandlung gewonnen

Zyklus	Fermentation	Lysatvolumen V_{Lysat} [L]	Lysegrad L [%]	Feststoff- konzentration ρ [g L ⁻¹]	DNA-Gehalt des Feststoffanteils x_{DNA} [%TS]
1. Zyklus	F87	2,5	79,4	18,9	2,22
2. Zyklus	F91	2,5	91,2	23,2	3,38
3. Zyklus	F95	2,7	90,5	26,0	2,79
4. Zyklus	F97	2,7	89,4	28,9	2,78
5. Zyklus	F98	2,7	87,7	28,6	2,66
6. Zyklus	F99	2,7	88,9	29,3	2,80
7. Zyklus	F100	2,6	85,3	27,3	2,78
8. Zyklus	F101	2,8	89,8	30,4	2,82
9. Zyklus	F102	2,9	87,7	30,8	2,57

Sojapepton, UD Chemie	-	-	9,5	2,06
Caseinpepton, Carl Roth	-	-	10,0	nicht nachweisbar
Hefeextrakt, Biospringer	-	-	10,0	0,84
Hefeextrakt, Ohly	-	-	9,9	0,77

Die Feststoffkonzentrationen lagen zwischen 18,9 - 35,1 g L⁻¹ und die Lysatvolumina zwischen 2,5 - 2,9 L. Die unterschiedlichen Feststoffkonzentrationen ergaben sich aus den verschiedenen Mengen an eingesetzter Biofeuchtmasse und den ihnen anhaftenden Restmedienbestandteilen.

Tabelle 5.9: Ergebnisse der Lysatcharakterisierung (Teil 2). Die Lysate wurden aus *Klebsiella planticola*-Biomasse durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss und anschließende Proteasebehandlung gewonnen

Zyklus	Kohlenstoffgehalt des Feststoffanteils x_C [%TS]	Stickstoffgehalt des Feststoffanteils x_N [%TS]	Protein-konzentration ρ_P [g L ⁻¹]	Acetat-konzentration ρ_{Acetat} [g L ⁻¹]
1. Zyklus	36,4	10,3	0,36 (1,9 %TS)	1,53 (8,1 %TS)
2. Zyklus	37,3	9,3	0,41 (1,8 %TS)	2,27 (9,8 %TS)
3. Zyklus	39,7	10,3	0,88 (3,4 %TS)	1,33 (5,1 %TS)
4. Zyklus	37,2	9,6	0,63 (2,2 %TS)	1,90 (6,6 %TS)
5. Zyklus	39,7	10,1	0,61 (2,1 %TS)	1,41(4,9 %TS)
6. Zyklus	39,2	9,9	0,70 (2,4 %TS)	1,68 (5,7 %TS)
7. Zyklus	41,2	10,0	0,71 (2,6 %TS)	1,57 (5,8 %TS)
8. Zyklus	41,4	10,8	0,68 (2,2 %TS)	1,66 (5,5 %TS)
9. Zyklus	40,0	9,7	0,61 (2,0 %TS)	1,30 (4,2 %TS)

SP, UD Chemie	41,5	10,2	0,03 (0,32 %TS)	n. n.
CP, Carl Roth	39,0	12,1	n. n.	n. n.
HX, Biospringer	41,1	12,3	0,01 (0,10 %TS)	n. n.
HX, Ohly	40,3	12,5	0,01 (0,10 %TS)	n. n.

SP: Sojapepton; CP: Caseinpepton; HX: Hefeextrakt; %TS: Prozentualer Anteil am Trockenstoff; n. n.: nicht nachweisbar

Der DNA-Gehalt der Lysate lag zwischen 2,2 - 3,4 %TS. Der durchschnittliche DNA-Gehalt einer Bakterienzelle wird mit 3 - 4 %TS angegeben (Storhas, 2003; Schlegel, 1992). Daraus folgt, dass mindestens die Hälfte der genomischen DNA der Zellen in Lösung gegangen war und sich im Lysat wiederfand. Wie zu erwarten enthielt Caseinpepton keine nachweisbare

DNA, da es aus proteolytisch verdaulichem Milchprotein gewonnen wurde. Die untersuchten Hefeextrakte zeigten mit Gehalten um 0,8 %TS einen deutlich niedrigeren Wert. Hier muss während des Herstellungsprozesses eine Abtrennung der DNA oder ein weitgehender Abbau erreicht worden sein.

Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der *Klebsiella planticola*-Lysate lag zwischen 36,4 - 41,4 %TS bzw. zwischen 9,3 - 10,8 %TS. Im Vergleich zu den aufgeführten konventionellen komplexen Substraten lagen der Kohlenstoffgehalt damit im gleichen Bereich und der Stickstoffgehalt niedriger. Zur Erinnerung: Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der *Klebsiella planticola*-Biomasse ergab im Mittelwert 40,9 %TS bzw. 10,3 %TS.

Die Proteinkonzentration lag trotz des Einsatzes einer Proteaselösung im Vergleich zu den konventionellen Substraten höher. Ein Teil der bestimmten Proteinkonzentration wurde durch die Miterfassung der Alkalase, die eine Molmasse von 27,3 kDa besitzt (Novozymes, 2004), verursacht. Der Bradford Test konnte erst Proteine mit einer Molmasse von über 3 kDa nachweisen, so dass kleinere Proteine, Oligo- und Dipeptide nicht erfasst wurden. Der Lysegrad der Proteine in den herkömmlichen Extrakten musste daher höher sein. Ein Proteingel bestätigte diese Aussage. In den Hefeextrakten, dem Sojapepton und dem Caseinpepton zeigten sich im Bereich größer 3 kDa keine Proteinbanden.

Die Acetatkonzentration der Lysate lag zwischen 1,4 g L⁻¹ und 2,3 g L⁻¹. Zwei Quellen sind zu nennen. Zum einen wurden die Zellen nach der Zellernte nicht gewaschen, somit konnte mit dem anhaftenden Restmedium auch das Acetat in die Lyseansätze gelangen. Zum anderen wurde durch den Zellaufschluss der Cytoplasmahalt einschließlich des Acetats freigesetzt.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalytik der Lysate sind in **Abbildung 5.18** bis **Abbildung 5.20** dargestellt. Da es sich bei der Aminosäure *L*-Prolin um ein sekundäres Amin handelt, kann es mit der gewählten Methode der Vorsäulenderivatisierung nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion der Aminosäure *L*-Cystein mit *o*-Phthaldialdehyd führt hingegen zu sehr schwach fluoreszierenden Derivaten, die quantitativ nicht detektierbar sind (Büntemeyer, 2000).

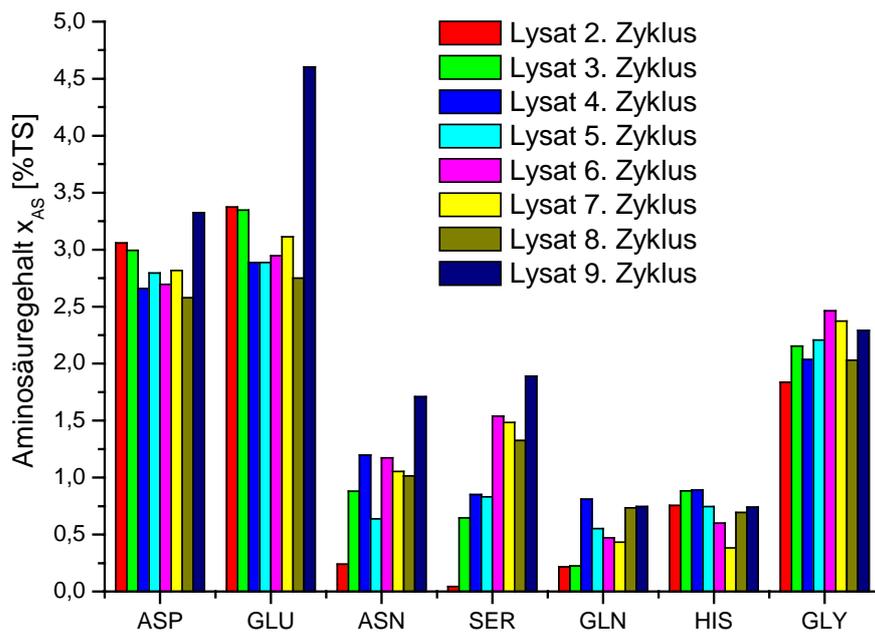


Abbildung 5.18: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Klebsiella planticola*-Lysate für die 2. bis 9. zyklische Rückführung. Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Asp: Asparaginsäure; Glu: Glutaminsäure; Asn: Asparagin; Ser: Serin; Gln: Glutamin; His: Histidin; Gly: Glycin

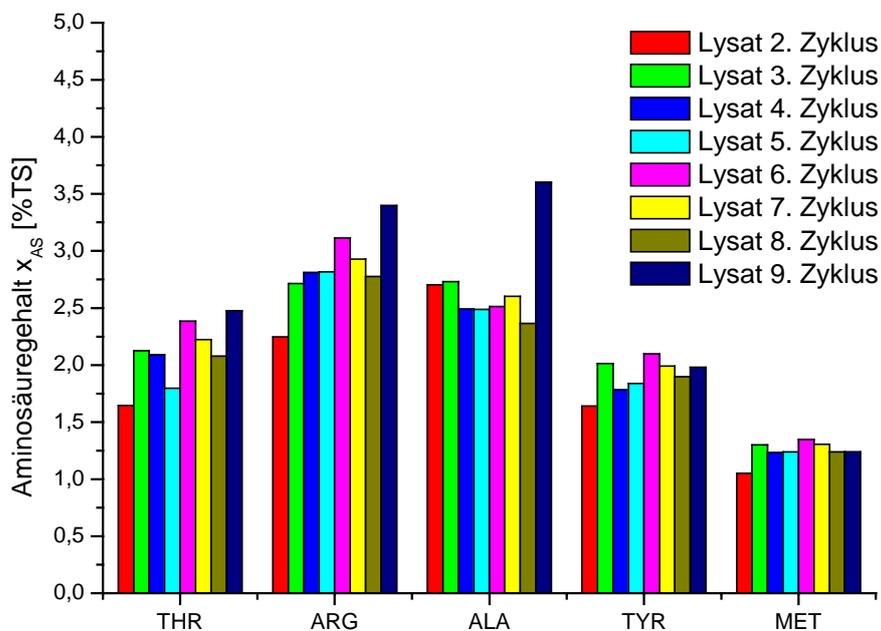


Abbildung 5.19: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Klebsiella planticola*-Lysate für die 2. bis 9. zyklische Rückführung. Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Thr: Threonin; Arg: Arginin; Ala: Alanin; Tyr: Tyrosin; Met: Methionin

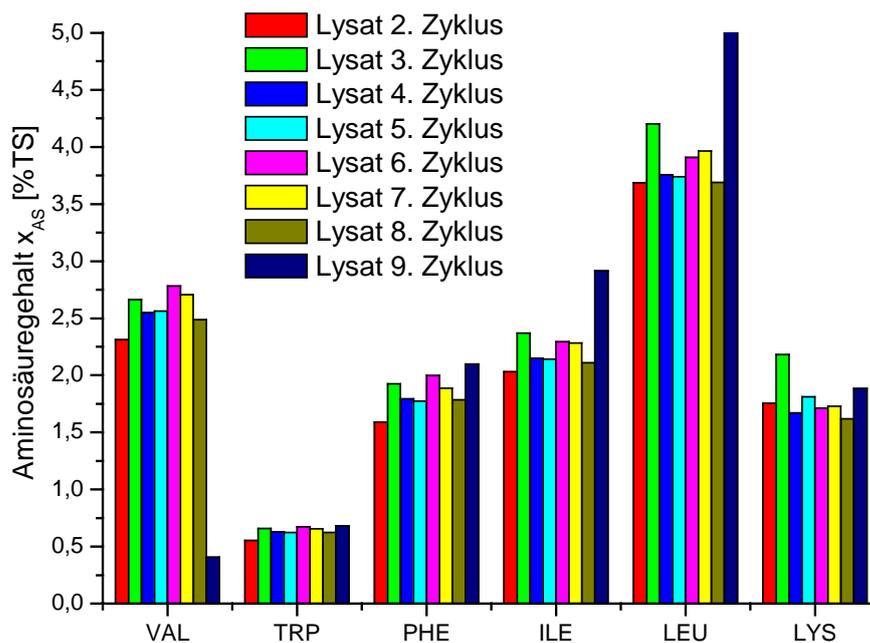


Abbildung 5.20: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Klebsiella planticola*-Lysate für die 2. bis 9. zyklische Rückführung. Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Val: Valin; Trp: Tryptophan; Phe: Phenylalanin; Ile: Isoleucin; Leu: Leucin; Lys: Lysin

Aus **Tabelle 10.1** lassen sich im Anhang ergänzend zur grafischen Darstellung die Gehalte der Aminosäuren entnehmen. Die Summierung der Aminosäuregehalte ergab, dass zwischen 31 - 41 % des Trockenstoffs aus Aminosäuren bestand. Der durchschnittliche Stickstoffgehalt von Aminosäuren wird mit 16 % angegeben (Matissek *et al.*, 1992). Somit lässt sich aus dem Aminosäuregehalt der Lysate der Anteil des Aminosäurestickstoffs berechnen. Dieser liegt bei 5,0 - 6,6 %TS. Bei einem Gesamtstickstoffgehalt der Lysate zwischen 9,3 - 10,8 %TS fallen also bis zu 71 % des Stickstoffs auf die Aminosäuren. Des Weiteren lässt sich der Bestimmung der Aminosäurespektren entnehmen, dass drei Aminosäuren in den Lysaten mit einer Konzentration von über 3 %TS auftraten. Dies waren die Asparagin- und Glutaminsäure und das Leucin. Darüber hinaus wiesen alle Lysate eine ähnliche Verteilung der Aminosäuren auf. Das charakteristische Aminosäurespektrum hat seinen Ursprung in der Lysatherstellung. Durch den Hochdruckaufschluss werden die Proteine der Zelle freigesetzt und anschließend durch die Protease zu kleineren Fragmenten bis hin zu den Aminosäuren selbst abgebaut. Es entsteht ein spezifisches Spaltungsmuster der Proteine der *Klebsiella planticola*-Biomasse, welches sich im Chromatogramm als charakteristisches Aminosäurespektrum zeigt.

Abbildung 5.21 und **Abbildung 5.22** zeigen den Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der Lysate, dargestellt als arithmetischer Mittelwert der acht untersuchten Lysate, mit denen der konventionellen Extrakte.

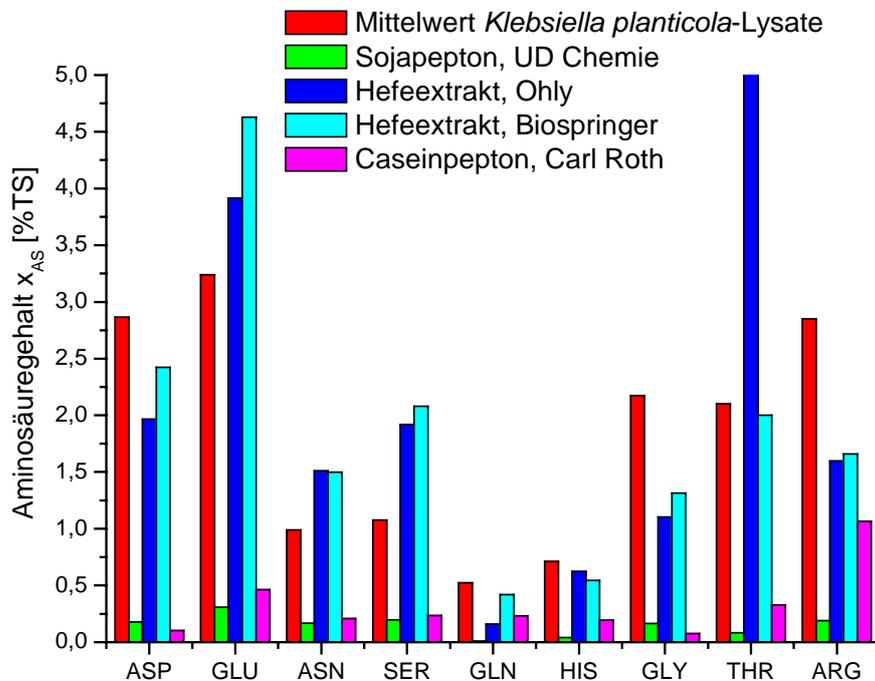


Abbildung 5.21: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Klebsiella planticola*-Lysate und der konventionellen Extrakte. Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Asp: Asparaginsäure; Glu: Glutaminsäure; Asn: Asparagin; Ser: Serin; Gln: Glutamin; His: Histidin; Gly: Glycin; Thr: Threonin; Arg: Arginin

Beide Hefeextrakte wiesen ein sehr ähnliches Aminosäurespektrum auf, beide wurden aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen. Der Gesamtgehalt lag zwischen 34 - 35 %TS der Extrakttrockenmasse und damit im gleichen Rahmen wie die der Lysate. Das Sojapepton enthielt mit 3,3 %TS Aminosäuren im Trockenstoff am wenigsten Aminosäuren. Das Caseinpepton lag mit 10,4 %TS im Mittelfeld. Die Ergebnisse der Aminosäureanalytik lassen sich zusätzlich **Tabelle 10.2** im Anhang entnehmen. Es fiel auf, dass das Caseinpepton keine Proteine über 3 kDa und sehr wenig Aminosäuren enthielt. Der Stickstoffgehalt lag aber bei 12,1 %TS. Deshalb war davon auszugehen, dass ein Großteil des Stickstoffs in Form von Peptiden und kleineren Proteinen mit einer Molmasse unter 3 kDa vorlag.

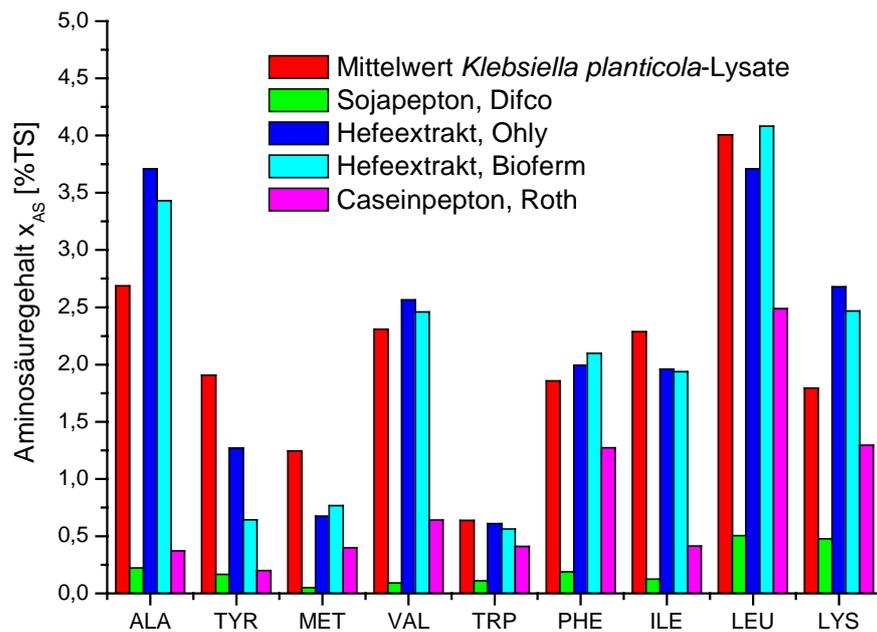


Abbildung 5.22: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Klebsiella planticola*-Lysate und der konventionellen Extrakte. Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Ala: Alanin; Tyr: Tyrosin; Met: Methionin; Val: Valin; Trp: Tryptophan; Phe: Phenylalanin; Ile: Isoleucin; Leu: Leucin; Lys: Lysin

Für die unter **Kapitel 5.3** vorgestellten Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium wurde der Hefeextrakt von Ohly als komplexe Nährstoffquelle verwendet. Der Vergleich des Aminosäurespektrums dieses konventionellen Extraktes mit dem der Lysate zeigt, dass einige Aminosäuren in den *Klebsiella planticola*-Lysaten in höheren Konzentrationen vorkommen als im Hefeextrakt, bei anderen ist es umgekehrt. Die *Klebsiella planticola*-Lysate besaßen eine höhere Konzentration an Asparaginsäure, Glutamin, Histidin, Glycin, Arginin, Tyrosin, Methionin, Tryptophan, Isoleucin und Leucin. Der Hefeextrakt enthielt mehr Glutaminsäure, Asparagin, Serin, Threonin, Alanin, Valin, Phenylalanin und Lysin. Bei manchen Aminosäuren war der Unterschied nur sehr gering wie im Fall von Histidin, Tryptophan und Phenylalanin. Im bakteriellen Lysat überwogen die Aminosäuren Glycin, Arginin, Tyrosin und Methionin während im Hefeextrakt die Aminosäuren Serin, Threonin, Alanin und Lysin mengenmäßig stärker vertreten waren. Zum einen liegt der Grund für diese Unterschiede in dem verwendeten Ausgangsmaterial für den jeweiligen Extrakt. Auf der einen Seite steht der zu den Prokaryonten gehörende Stamm *Klebsiella planticola* und auf der anderen Seite die eukaryontische Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Unterschiedliche Proteinzusammensetzungen der

Biomasse führen zu unterschiedlichen Aminosäurespektren. Zum anderen spielt das Herstellungsverfahren eine entscheidende Rolle, da dies darüber entscheidet, in welchem Maße die Proteine und andere Zellbestandteile freigesetzt werden und welche Spaltungsmuster durch die verschiedenen Enzymwirkungen entstehen. Die verwendete Alkalase (E.C. 3.4.21.62) gehört zur Gruppe der Serin-Endopeptidasen. Sie besitzt eine breite Spezifität und hydrolysiert Peptidbindungen neben nahezu allen Aminosäureresten (Kellermann, 1998b).

Durch die acht Parameter umfassende Lysatanalytik konnte belegt werden, dass eine gleichbleibende Lysatqualität gewährleistet ist. Die unabhängig hergestellten *Klebsiella planticola*-Lysate wiesen in sämtlichen Größen eine hohe Übereinstimmung auf. Eine wenig schwankende Qualität komplexer Substrate spielt in Hinblick auf eine gleichbleibende Produktqualität eine große Rolle in der Fermentationstechnik (Storhas, 2003).

5.6 Fermentationen mit Lysat

Das Ziel dieser *Klebsiella planticola*-Fermentationen lag in der Untersuchung der Wachstumseigenschaften der Lysate als Ersatz für den Hefeextrakt. Außerdem sollten eventuelle Auswirkungen der mehrfachen Lysierung und zyklischen Rückführung der Biomasse beurteilt werden. Die Kultivierungsbedingungen waren mit denen in **Kapitel 5.3** identisch.

Bei der Rückführung der Biomasse wurde jeweils die gesamte erzeugte Biomasse einer Fermentation der Lyse zugeführt und der gesamte durch die Lyse in Lösung gebrachte Anteil als Ersatz für den Hefeextrakt im nächsten Fermentationsschritt eingesetzt. Die in das Medium eingebrachte Kohlenstoff- und Stickstoffmasse wurde dadurch im 1. Zyklus im Vergleich zum Originalmedium deutlich erhöht. **Tabelle 5.10** zeigt die zu Beginn der Kultivierungen vorliegenden Kohlenstoffmengen. Diese setzten sich aus den Kohlenstoffanteilen der Glucose, der Maltose und der eingesetzten Lysate bzw. bei der ersten Fermentation aus der des Hefeextrakts (0. Zyklus) zusammen. Die anfänglich im Originalmedium vorgelegte Kohlenstoffmasse stieg von 91,7 g (0. Zyklus) bis auf 142,1 g (9. Zyklus) bei den Fermentationen mit Lysat. Ein weiterer Grund für die Zunahme des Kohlenstoffgehaltes zum Startzeitpunkt war ab dem 2. Zyklus, dass bei Verwendung von Lysat eine erhöhte Biomassebildung auftrat. So stand für die Lyse mehr Biomasse zur Verfügung.

Tabelle 5.10. Darstellung der anfänglichen Kohlenstoffmasse bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 5 L. Die erste Fermentation fand unter Einsatz von Hefeextrakt statt (0. Zyklus)

Gelöste Kohlenstoffmasse m_C bei $t = 0 \text{ h}$ [g]	
0. Zyklus	91,7
1. Zyklus	115,7
2. Zyklus	112,0
3. Zyklus	130,8
4. Zyklus	131,0
5. Zyklus	136,7
6. Zyklus	139,0
7. Zyklus	143,5
8. Zyklus	140,9
9. Zyklus	142,1

Abbildung 5.23 zeigt die Entwicklung der optischen Dichte OD_{600} und die maximal erreichten Biotrockenmassen bei den aufeinanderfolgenden Kultivierungen von *Klebsiella planticola* mit Biomasserückführung in Form von Lysat. Es ist deutlich die Zunahme beider Größen während der ersten vier Zyklen zu erkennen. In den darauffolgenden Zyklen verlangsamt sich die Zunahme.

Die im Vergleich zum 0. Zyklus höhere Zelldichte am Ende des 1. Zyklus wurde zum Teil dadurch verursacht, dass durch die Rückführung mehr Stickstoff und Kohlenstoff in das Medium eingetragen wurden als es durch den Hefeextrakt im Originalmedium der Fall war. Andererseits war davon auszugehen, dass das Lysat, da es aus den *Klebsiella planticola*-Zellen gewonnen wurde und damit genau die Bestandteile enthält, die zum Wachstum der Zellen benötigt werden, bessere Wachstumseigenschaften aufwies als der Hefeextrakt. Durch den schonenden Aufschluss und Lyse der Zellen konnten wichtige Wachstumsfaktoren wie Coenzyme und Vitamine erhalten bleiben. Auch die Aminosäurezusammensetzung der Lysate wird eher den Anforderungen der *Klebsiella*-Zellen entsprechen als die des Hefeextraktes. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Aminosäurespektrum beider Extrakte (**Kapitel 5.5**).

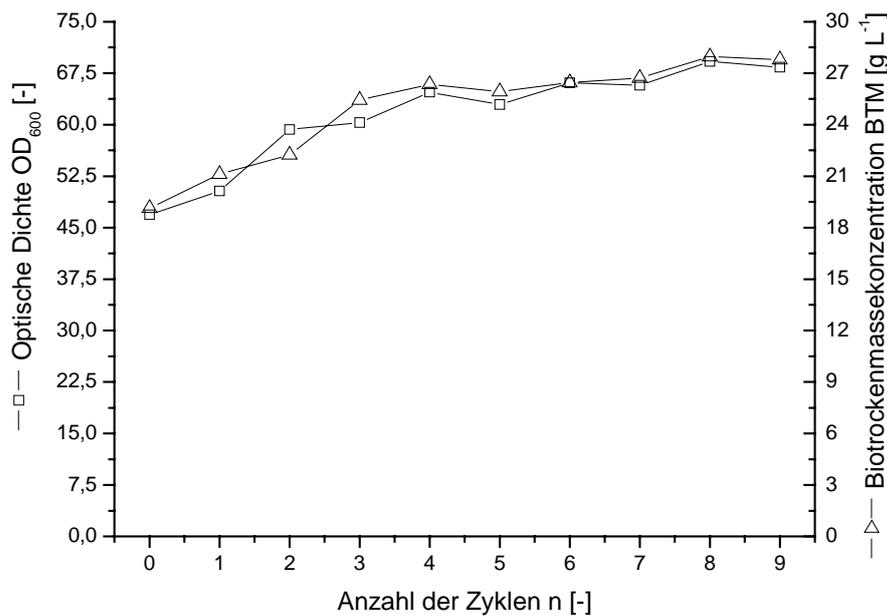


Abbildung 5.23: Auftragung der maximal erreichten Zelldichten beim Versuch zur zyklischen Rückführung der Biomasse von *Klebsiella planticola*. Der 0. Zyklus wurde ohne Lysat auf dem Originalmedium (modifiziertes A1-160-Medium) durchgeführt.

Am Ende der Kultivierungen wurde der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt in den beiden nach der Zentrifugation erhaltenen Fraktionen (flüssig und fest) bestimmt. Außerdem wurde über das CO₂-Signal die Menge an Kohlenstoff berechnet, die während der Kultivierung über die Abluft entwich. **Tabelle 5.11** zeigt die Ergebnisse. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (**Tabelle 5.10**) jeder Fermentation.

Die Kohlenstoffbilanzierung zeigte, dass etwa 43,0 - 48,3 % des vorgelegten Kohlenstoffs für den Aufbau von Biomasse genutzt wurde. Bei den unter **Kapitel 5.3** vorgestellten Fermentationen lag dieser Anteil bei 40 %. Darüber hinaus ließ sich mit steigender Zykluszahl zunächst ein zunehmender Kohlenstoffgehalt, der im Medium verblieb, nachweisen. Dieser Anteil stieg ab dem 3. Zyklus von 15,8 % auf 29,1 % im 6. Zyklus. Im weiteren Verlauf wurde mit 26 % Kohlenstoff ein nahezu konstanter Wert erreicht. Es schien, dass entweder die maximale Zelldichte unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen erreicht wurde oder andere Komponenten im Medium limitierend wirkten, so dass das erhöhte Angebot an Kohlenstoff nicht über die gesamten Zyklen in eine vermehrte Biomassenbildung umgesetzt wurde.

Tabelle 5.11: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte (Teil 1) bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	0. Zyklus	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus	4. Zyklus
Kohlenstoff, Restanteil	17,9 g (19,6 %)	20,9 g (18,0 %)	19,4 g (17,3 %)	20,6 g (15,8 %)	30,3 g (23,1 %)
Biomasse	41,2 g (44,9 %)	54,9 g (47,5 %)	59,7 g (53,3 %)	63,2 g (48,3 %)	60,1 g (45,9 %)
Kohlendioxid Abluft	35,4 g (38,6 %)	51,8 g (44,8 %)	36,5 g (32,6 %)	37,7 g (28,8 %)	39,4 g (30,1 %)
Summe C, analytisch	94,5 g (103,1 %)	127,6 g (110,3 %)	115,6 g (103,2 %)	121,5 g (92,9 %)	129,8 g (99,1 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-2,9 g (-3,1 %)	-11,9 g (-10,3 %)	-3,6 g (-3,2 %)	9,3 g (7,1 %)	1,2 g (0,9 %)

Tabelle 5.12: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte (Teil 2) bei der satzweisen Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf dem modifizierten A1-160-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	5. Zyklus	6. Zyklus	7. Zyklus	8. Zyklus	9. Zyklus
Kohlenstoff, Restanteil	36,5 g (26,7 %)	40,5 g (29,1 %)	37,2 g (25,9 %)	37,4 g (26,5 %)	34,9 g (24,6 %)
Biomasse	62,8 g (46,0 %)	59,7 g (43,0 %)	59,1 g (41,2 %)	65,9 g (46,8 %)	62,7 g (44,1 %)
Kohlendioxid Abluft	58,4 g (42,7 %)	35,4 g (25,5 %)	39,5 g (27,5 %)	37,7 g (26,7 %)	42,7 g (30,0 %)
Summe C, analytisch	157,7 g (115,4 %)	135,6 g (97,6 %)	135,8 g (94,6 %)	141,0 g (100,1 %)	140,3 g (98,8 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-21,0 g (-15,4 %)	3,4 g (2,4 %)	7,7 g (5,4 %)	-0,1 g (-0,1 %)	1,8 g (1,2 %)

Bei dem am Ende im Medium verbleibenden Kohlenstoff handelt es sich sowohl um nicht nutzbare Kohlenstoffquellen als auch um Stoffwechselendprodukte. Als Stoffwechselendprodukt konnte z. B. das gebildete und nicht vollständig verstoffwechselte Acetat gefunden werden.

Durch das Fehlen von extrazellulär vorliegenden Nukleasen kam es während der Kultivierungen zu keinem Abbau der durch das Lysat eingetragenen Nukleinsäuren. Dieses spiegelt sich in **Abbildung 5.24** wieder. Sowohl RNA als auch genomische DNA konnten in den Überständen der letzten Probe vor der Zellernte nachgewiesen werden. Also trug auch diese Gruppe an Biomolekülen, die als Kohlenstoffquelle nicht zur Verfügung stand, zu dem Restkohlenstoffanteil bei.

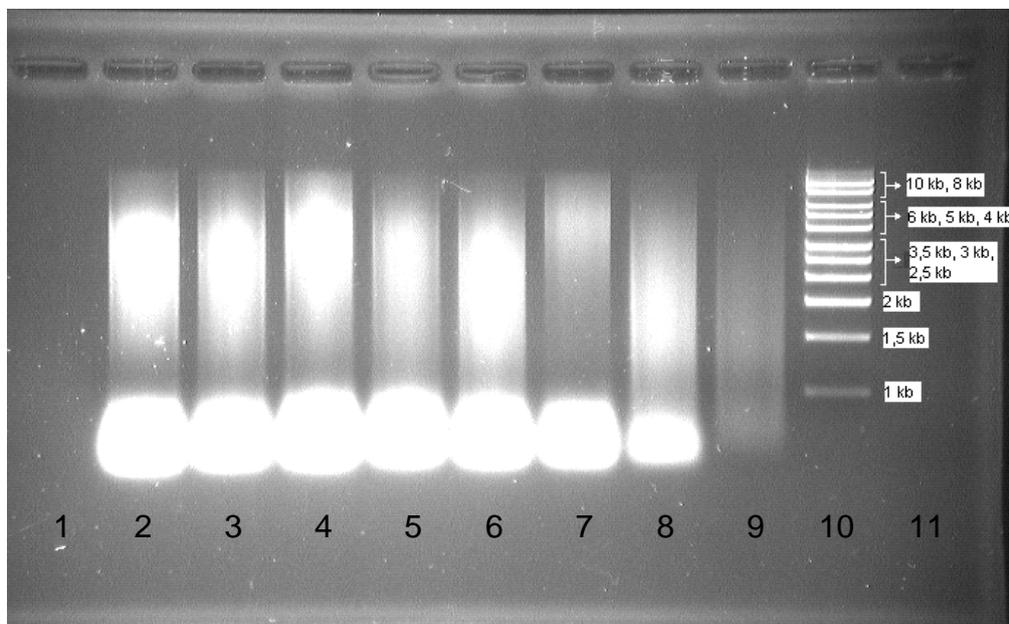


Abbildung 5.24: 1%iges Agarosegel mit den aufgearbeiteten Überständen des 2. bis 9. Zyklus, letzte Probe (Belegung: Spur 1 und 11: unbelegt; Spur 2 - 9: 2. bis 9. Zyklus; Spur 10: DNA-Leiter)

Ein Proteingel (**Abbildung 5.25**) zeigte, dass am Ende der Kultivierung auch ein typisches Muster an Proteinen im zellfreien Überstand vorlag. Bei diesen wird es sich sowohl um nicht verwertete Proteine aus dem Lysat als auch um sekretierte Enzyme oder durch aufgetretene Zellyse freigesetzte Proteine handeln.

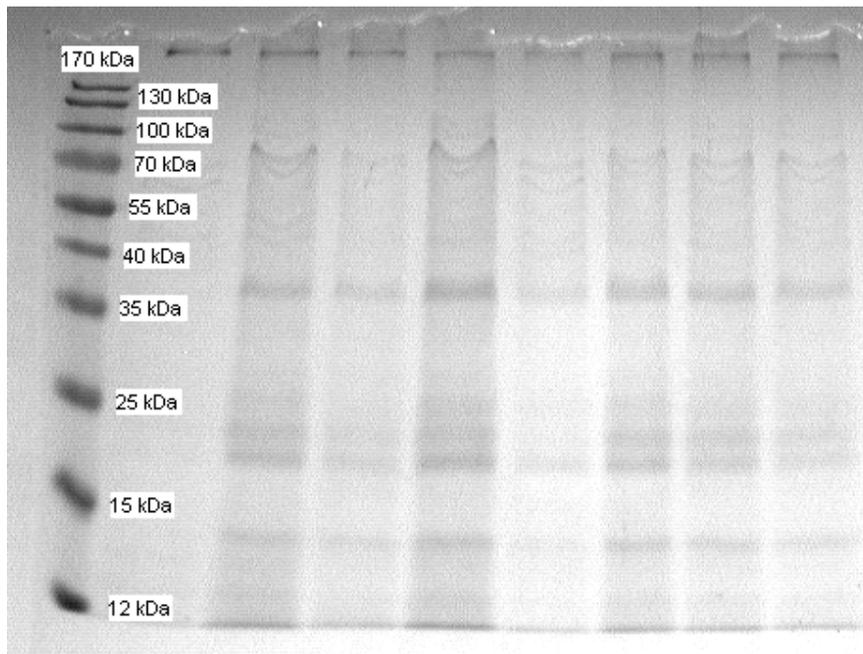


Abbildung 5.25: Diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel. Auftragung der zellfreien Überstände zum Zeitpunkt der Zellernte des 2. bis 9. Zyklus' (Belegung: Spur 1: Proteinmarker; Spur 3 - 9: 3. bis 9. Zyklus)

Die Summierung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte ergab für den 1. und 5. Zyklus auffällig hohe Abweichungen von -10,3 % und -15,4 % in Bezug auf den zum Startzeitpunkt vorgelegten Kohlenstoff. Durch die Bilanzierung konnte also am Ende mehr Kohlenstoff nachgewiesen werden als ursprünglich vorgelegt wurde. Dieses ging auf eine erhöhte Zudosierung des Antischaummittels (Pluronic[®] PE-8100) während dieser zwei Kultivierungen zurück.

Abbildung 5.26 bis **Abbildung 5.28** zeigen den Verlauf der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft. Die erste Grafik (**Abbildung 5.26**, oben links) zeigt die drei Wachstumsphasen auf dem Originalmedium, in denen zunächst die Aminosäuren des Hefeextraktes, dann die Glucose und als letztes die Maltose verstoffwechselt wurden. Dahingegen konnten ab dem 2. Zyklus bis zum 9. Zyklus mindestens vier Wachstumsphasen unterschieden werden.

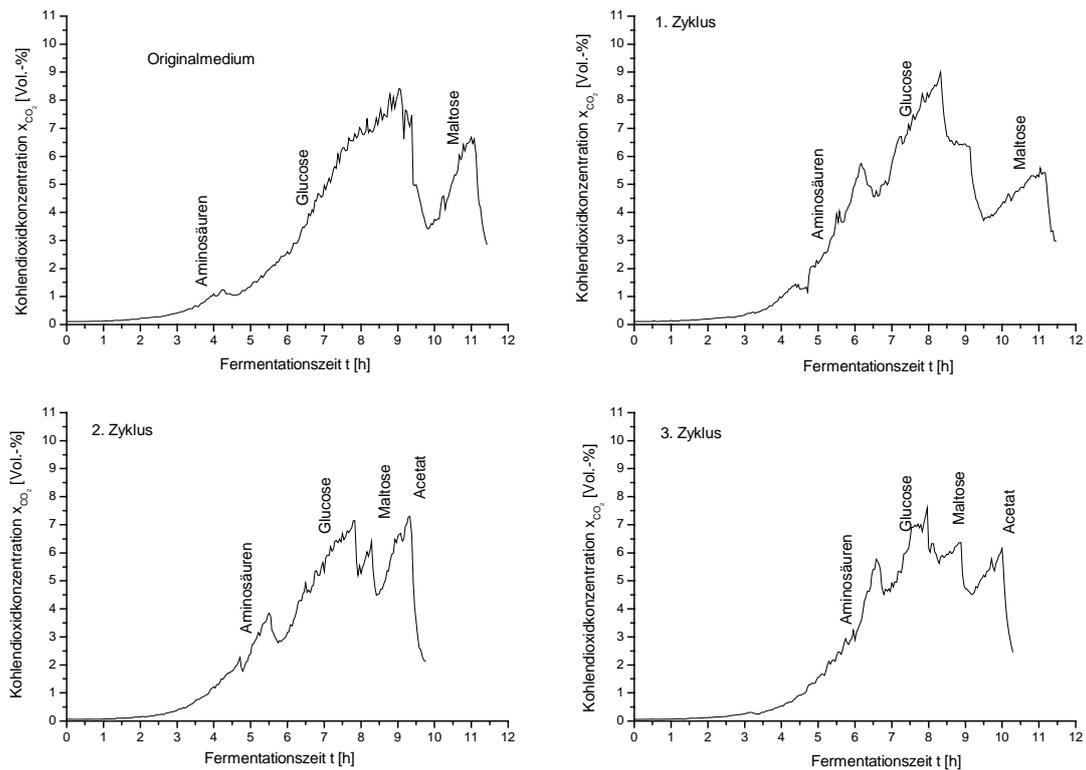


Abbildung 5.26: Versuch zur zyklischen Rückführung der aufgeschlossenen *Klebsiella planticola*-Biomasse als Ersatz für den Hefeextrakt in einem halbsynthetischen Medium (Originalmedium, 1. - 3. Zyklus)

Die Kohlendioxidkonzentration in der Abluft erreichte während des 5. Zyklus zeitweise Werte von über 10 %. Der Messbereich des verwendeten Detektors besaß eine maximal messbare Kohlendioxidkonzentration von 10 %, so dass die Werte oberhalb nicht aufgenommen wurden.

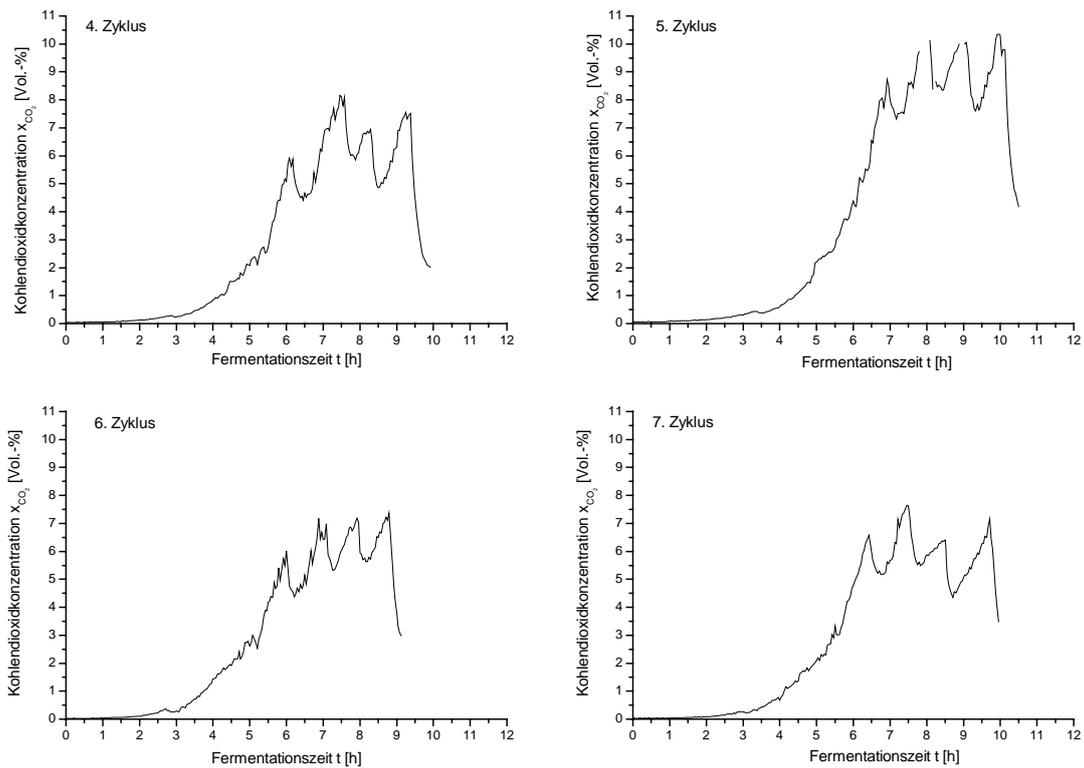


Abbildung 5.27: Versuch zur zyklischen Rückführung der aufgeschlossenen *Klebsiella planticola*-Biomasse als Ersatz für den Hefeextrakt in einem halbsynthetischen Medium (4. - 7. Zyklus)

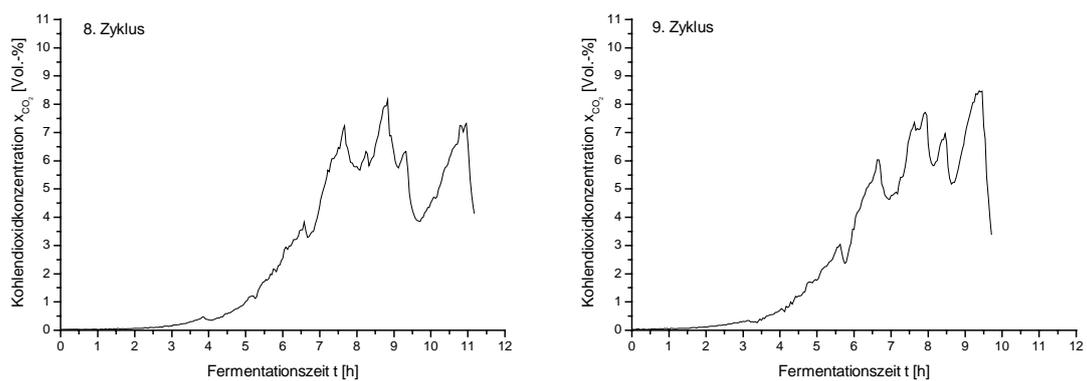


Abbildung 5.28: Versuch zur zyklischen Rückführung der aufgeschlossenen *Klebsiella planticola*-Biomasse als Ersatz für den Hefeextrakt in einem halbsynthetischen Medium (8. und 9. Zyklus)

Abbildung 5.29 gibt Hinweise auf die komplexen Vorgänge innerhalb der Phasen. Exemplarisch für die Zyklen ist hier für den 9. Zyklus der Verlauf der Glucosekonzentration, der Konzentration an reduzierenden Zuckern und der Acetatkonzentration gezeigt. Zunächst wurden die Aminosäuren des Lysats, dann die Glucose, danach die Maltose und abschließend das während der Kultivierung im Stoffwechsel entstandene Acetat abgebaut. Es konnte anhand der chromatographischen Acetatbestimmung nachgewiesen werden, dass der letzte Anstieg in der Kohlendioxidkonzentration mit einer deutlichen Reduzierung des Acetats einherging. Dabei erfolgte aber nie ein vollständiger Abbau des Acetats. Die Grenzen zwischen den Phasen dürfen nicht zu starr gesehen werden, da es bereits in der ersten Phase (Aminosäurenabbau) zu einer geringen Verstoffwechslung der Glucose kam.

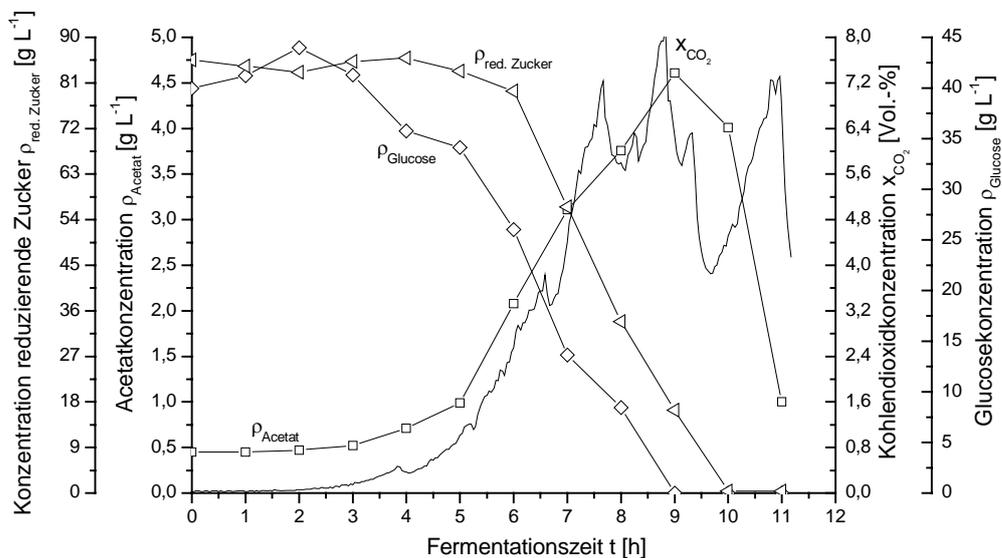


Abbildung 5.29 Satzweise Kultivierung von *Klebsiella planticola* auf modifiziertem A1-160-Medium mit Lysat (9. Zyklus, F102)

5.7 Zusammenfassung

Der für die Untersuchungen herangezogene *Klebsiella planticola*-Stamm wird in der Arbeitsgruppe seit Jahren erfolgreich für die Expression und Sekretion rekombinanter Proteine genutzt (Miksch *et al.*, 1999). Außerdem wird der Organismus sowohl von deutschen Behörden als auch durch die US-amerikanische Nahrungs- und Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) als unbedenklich eingestuft (GRAS, *Generally Recognized As Safe*), was einen Einsatz in vielen Bereichen der Biotechnologie interessant gestaltet.

Die im kleinen Maßstab durchgeführten Lyseversuche führten zur Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zur Behandlung des anfallenden Biomasseabfalls. Der entwickelte Aufschluss setzte sich aus einem mechanischen Hochdruckaufschluss mit nachgeschalteter enzymatischer Behandlung zusammen. Die erreichten Lysegrade lagen bei 77 %. Der Einsatz der Proteaselösung (Novozymes, Alcalase® 2.4 L FG) konnte auf unter 1 Liter pro Tonne Biotrockenmasse gesenkt werden.

Zahlreiche Fermentationen des *Klebsiella planticola*-Stammes auf dem halbsynthetischen Originalmedium mit Glucose und Maltose als Hauptkohlenstoffquelle und Hefeextrakt als komplexe Komponente führten zu einer Vielzahl von Daten. Mit deren Hilfe konnte das System genauestens untersucht werden. Drei charakteristische Wachstumsphasen traten auf. Zunächst wurden die Aminosäuren des Hefeextraktes ($\mu = 0,92 - 1,1 \text{ h}^{-1}$), dann die Glucose ($\mu = 0,62 - 0,68 \text{ h}^{-1}$) und zuletzt die Maltose verstoffwechselt. Mit Hilfe einer Kohlenstoffbilanzierung konnte festgestellt werden, dass der zu Beginn vorgelegte Kohlenstoff am Ende der Fermentation zu 41,5 % in der Biomasse, zu 38,7 % in der Abluft und zu 16,3 % im Medium vorlag. Die Bilanzierung des Stickstoffs zeigte, dass die Zuführung einer externen Stickstoffquelle in Form des Ammoniakwassers für die Biomassenbildung essentiell war.

Durch eine ausführliche Lysatanalytik konnten die Lysate ausreichend charakterisiert werden. Einen Vergleich der Zusammensetzung der Lysate mit denen verschiedener konventionell erhältlicher komplexer Substrate runden diesen Teil der Arbeiten ab. Die *Klebsiella planticola*-Lysate wiesen einen Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt zwischen 36,4 - 41,4 %TS bzw. zwischen 9,3 - 10,8 %TS auf. Der DNA-Gehalt der Lysate lag zwischen 2,2 - 3,4 %TS. Die Acetatkonzentration der Lysate betrug 4,2 - 9,8 %TS. Die Proteinkonzentration erreichte Werte zwischen 1,8 - 3,4 %TS und der Aminosäuregehalt zwischen 31 - 41 %TS.

Schließlich konnte durch den Einsatz der Lysate gezeigt werden, dass es möglich war, auf den Einsatz von konventionellem Hefeextrakt zu verzichten. Neun zyklische Rückführungen zeigten keinen negativen Einfluss auf das Wachstum. Eine deutliche höhere Biomassenbildung war mit Zunahme der Zykluszahl zu verzeichnen. Dies bietet gerade für eine biomassenabhängige Produktbildung interessante Möglichkeiten, da ein Mehr an Biomasse auch zur Bildung von größeren Mengen Produkt führen kann.

Durch die Arbeiten mit dem Gram-negativen Bakterium *Klebsiella planticola* konnte an einem ersten wichtigen Beispielsystem eindrucksvoll und erfolgreich die Möglichkeit einer alternativen Verwendung bakterieller Biomasse gezeigt werden. Der Verzicht auf konventionelle Extrakte führte zu einer Senkung des Rohstoffbedarfs und zu einer Reduzierung der bakteriellen Abfallmenge.

6 Ergebnisse und Diskussion - *Escherichia coli* B-3996

6.1 Fermentationen zur Biomassegewinnung

Das Ziel dieser Fermentationen lag in der Gewinnung von *Escherichia coli*-Biomasse für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab und in der Gewinnung von Daten zur Charakterisierung des Systems bestehend aus dem *Escherichia coli*-Stamm B-3996 und dem halbsynthetischen Medium A1-160. Dazu wurden mehrere Kultivierungen auf dem halbsynthetischen Medium mit Saccharose als Kohlenstoffquelle und Hefeextrakt als komplexe Komponente durchgeführt. Eine ausführliche Betrachtung dieser Fermentationen findet sich in **Kapitel 6.3**. Die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

6.2 Lyseversuche

Ein Hauptziel der Lyseversuche war es in Hinblick auf einen industriellen Einsatz eine effiziente Methode für die Lyse der *Escherichia coli* B-3996 Zellen zu finden. In verschiedenen Versuchsreihen wurden geeignete Verfahren zur Lyse der bakteriellen Biomasse entwickelt. Die Auswahl der eingesetzten Aufschlussverfahren konzentrierte sich ausschließlich auf solche Methoden, die für den Durchsatz großer Stoffströme geeignet waren. Es wurden mechanische, biochemische und chemische Verfahren benutzt. Für die Versuche wurden verschiedene Kombinationen angewandt und der Einfluss unterschiedlicher Variablen untersucht.

6.2.1 Autolyse ganzer Zellen unter Variation des pH

Die Auslösemechanismen der Autolyse können vielfältig sein. So kann sie durch milde chemische oder physikalische Behandlungen induziert werden (Hopkins, 1991). Dazu zählen z. B. die Zugabe eines organischen Lösungsmittels, eine Veränderung des pH oder der Temperatur. Ihre Wirksamkeit ist stark abhängig von den Kultivierungsbedingungen und dem Stoffwechselzustand der Zellen. Während durch die Zugabe niedriger Antibiotikakonzentrationen eine wachsende *E. coli*-Kultur zur Autolyse veranlasst werden kann (Leduc *et al.*, 1982), zeigen sich *E. coli*-Zellen in der stationären Phase gegenüber Penicillin und chaotropen Agen-

zien resistent (Tuomanen *et al.*, 1988). In der exponentiellen Phase geerntete *E. coli*-Zellen lassen sich durch die Zugabe verschiedener Salze oder Komplexbildner wie EDTA zur Autolyse bewegen (Leduc & van Heijenoort, 1980; Leduc *et al.*, 1982; van Heijenoort *et al.*, 1983). Über die Autolyse von sich in der stationären Phase befindenden *E. coli*-Zellen durch die Zugabe von speziellen Antibiotika wurde berichtet (Chitnis *et al.*, 1993).

In Hinblick auf eine effiziente Lyse der *Escherichia coli*-Zellen wurden im Rahmen der Autolyse keine Verfahren in Betracht gezogen, bei denen der Einsatz großer Mengen von Hilfsstoffen oder toxischer Stoffe wie Antibiotika notwendig war. Der Einsatz des Lysates als Nährmedienbestandteil schloss solche Möglichkeiten aus. Die Qualität der Lysate sollte nicht beeinträchtigt werden. Innerhalb dieses Versuches wurde daher versucht, die Autolyse der *Escherichia coli*-Zellen alleine über das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturen auszulösen. In einem Temperaturbereich von 25 °C bis 55 °C wurde dafür die Temperatur 1-stündlich bis 1,5-stündlich um 5 °C erhöht.

Es wurden fünf Schüttelkolben mit einer Biotrockenmassekonzentration von 28,7 g L⁻¹ im pH-Bereich zwischen 7,0 und 9,0 angesetzt. Die Proteinkonzentration im Überstand lag nach dem Resuspendieren des Biomassepellets und nach der pH-Einstellung bei Werten um 0,12 g L⁻¹ (**Abbildung 6.1**). Diese niedrige Konzentration an gelöstem Protein deutet auf eine nur geringe Lyse der Zellen durch den Einfrier- und Auftauprozess hin. Der in die Lyseansätze eingetragene Proteinanteil, der durch das den Zellen anhaftende Restmedium verursacht wurde, war vernachlässigbar gering. Zwei Gründe sind anzuführen: Zum einen enthielt das zur Kultivierung der Zellen eingesetzte halbsynthetische Fermentationsmedium (A1-160) keine Proteinquelle und zum anderen zeigte ein Proteingel des zellfreien Überstandes zum Zeitpunkt der Zellernte nur schwach ausgebildete Banden.

Der Blick auf die erreichten Lysegrade ließ erkennen, dass höhere Ausgangs-pH-Werte zu höheren Lysegraden und zu Beginn zu einer erhöhten Freisetzung von Proteinen führten. Jedoch blieb die Konzentration an Protein bis zum Ende der Lyse bei höheren Ausgangs-pH-Werten dementsprechend höher. Der maximale Lysegrad betrug nach 23 Stunden nur 18 % (pH 9,0). Eine Tendenz zu höheren Lysegraden bei höheren Ausgangs-pH-Werten war zu erkennen.

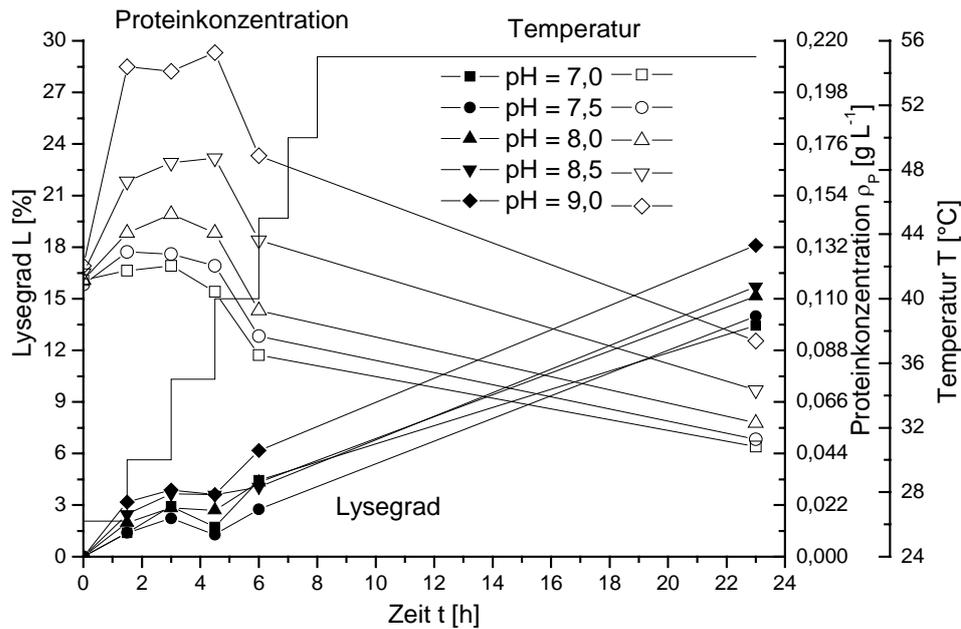


Abbildung 6.1: Autolyse von *Escherichia coli* B-3996 bei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten (Biotrockenmassekonzentration $28,7 \text{ g L}^{-1}$)

Dieser Versuch zeigte, dass durch das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturbereiche eine Autolyse herbeigeführt werden konnte. Jedoch lagen die Lysegrade mit Blick auf die Forderung eines möglichst hohen Lysegrades zu niedrig. Es wurde daher im Folgenden versucht, dem Autolyseschritt einen mechanischen Aufschluss voranzustellen. Dazu wurden zunächst die Aufschlussparameter Druck und Anzahl der Passagen aufeinander abgestimmt.

6.2.2 Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes für die *Escherichia coli*-Zellen bei Verwendung des Hochdruckhomogenisators

Das Ziel dieses Versuches lag in der Ermittlung der optimalen Passagenanzahl für den eingesetzten *Escherichia coli*-Stamm im Hochdruckhomogenisator bei einem Aufschlussdruck von 800 bar. Dieser Druck wurde aufgrund eines Vorversuches, bei dem der Aufschluss bei unterschiedlichen Drücken durchgeführt wurde, gewählt. Außerdem sollte die Abhängigkeit des Aufschlussresultates von der Zelldichte der eingesetzten Suspension überprüft werden.

Laut Literatur kann der Einfluss der Zelldichte über einen weiten Konzentrationsbereich als gering angesehen werden (Brookman, 1974; Büschelberger & Loncin, 1989; Agerkvist & Enfors, 1990). Aber auch zu diesem Sachverhalt gibt es wie auch bei den aufschlusswirksamen Mechanismen beim Hochdruckaufschluss unterschiedliche Meinungen. Sowohl Middelberg (Middelberg *et al.*, 1991) als auch Sauer (Sauer *et al.*, 1989) und Kleinig (Kleinig *et al.*, 1995) stellten entgegen anderer Quellen eine Abhängigkeit des Lysegrades von der Zellkonzentration fest. Nichtsdestotrotz erhöhen höhere Zellkonzentrationen die Wirtschaftlichkeit des Prozesses durch kürzere Betriebszeiten und damit geringere Energiekosten. Wichtig bei der praktischen Realisierung ist die Gewährleistung einer minimalen Pumpfähigkeit (Jahnke, 2000).

Der Aufschluss wurde indirekt über die freigesetzte Proteinmenge und über den auf die Feststoffkonzentration bezogenen Lysegrad verfolgt. **Tabelle 6.1** zeigt die Konzentrationen der drei eingesetzten Suspensionen.

Tabelle 6.1: Biotrockenmassekonzentrationen der eingesetzten *Escherichia coli*-Zellsuspensionen zur Ermittlung der optimalen Passagenanzahl durch den Hochdruckhomogenisator

	Biotrockenmassekonzentration $\rho_{\text{BTM}} [\text{g L}^{-1}]$
Zellsuspension 1	48,6
Zellsuspension 2	23,1
Zellsuspension 3	36,0

Abbildung 6.2 zeigt die analytisch gewonnenen Größen in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagen durch den Hochdruckhomogenisator. Der Lysegrad nahm durch in Lösung gehen von Zellbestandteilen im gesamten Verlauf zu. Unterstützt wird diese Aussage durch die stark ansteigende Proteinkonzentration im Verlauf des Aufschlusses. Die intrazellulär vorliegenden Proteine, darunter auch die Enzyme der Zelle, wurden durch die Zerstörung der Kompartimentierung ins Medium entlassen. Auch Proteine der äußeren Membran, der Cytoplasmamembran, der Zellwand und Enzyme des periplasmatischen Raumes, trugen zu diesem Anstieg der Proteinkonzentration bei.

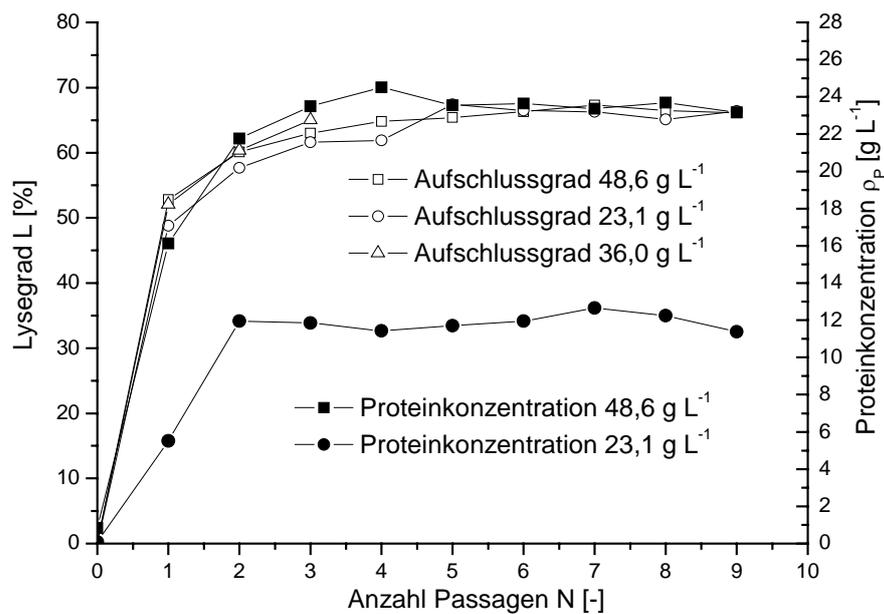


Abbildung 6.2: Hochdruckaufschluss von *Escherichia coli* B-3996 bei unterschiedlichen Biotrockenmassekonzentrationen und einem Aufschlussdruck von 800 bar

Die Zellsuspensionen zeigten die größten Veränderungen der Messgrößen bis zur dritten Passage. Das Aufschlussergebnis war bei den verwendeten Zellkonzentrationen nahezu identisch. Somit bestätigte sich die in der Literatur beschriebene Unabhängigkeit des Lysegrades von der Konzentration. Nach dem dritten Durchlauf kam es nur noch zu geringen Veränderungen. Während des Aufschlusses nahm die Viskosität aufgrund von freigesetzten Nukleinsäuren in den ersten vier Passagen deutlich zu. Danach kam es durch Scherung der Nukleinsäuren zu abnehmenden Viskositäten. Zusätzlich konnte eine Klärung der Zellsuspension beobachtet werden. Ein Blick auf die Proteinkonzentration in **Abbildung 6.2** lässt erkennen, dass bei doppelter Biotrockenmassekonzentration entsprechend auch die Konzentration an freigesetzten Proteinen doppelt so hoch war.

Für kommende mechanische Aufschlüsse wurde auf Basis dieses Versuches ein Arbeitsdruck von 800 bar und eine Passagenanzahl von drei gewählt.

6.2.3 Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH

Ziel des Versuches war es, durch eine Kombination aus mechanischem Aufschluss (drei Passagen bei 800 bar) und Autolyse eine Verbesserung des Autolysegrades und der Autolysegeschwindigkeit zu erreichen.

Das Temperaturprogramm wurde in der Weise geändert, dass die Intervalle auf 90 Minuten gesetzt, eine Phase bei 37 °C eingefügt und die maximale Autolysetemperatur in Anlehnung an Leduc (Leduc, 1980) auf 40 °C begrenzt wurde. Leduc stellte bei der Autolyse von exponentiell wachsenden *Escherichia coli*-Zellen eine abnehmende Fähigkeit zu autolytischen Prozessen bei einer Temperatur von über 40 °C fest und begründete dies durch Inaktivierung der an der Autolyse beteiligten Enzyme. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 6.3** dargestellt. Die Biotrockenmassekonzentration zu Beginn betrug 24,0 g L⁻¹. Durch den mechanischen Zellaufschluss veränderten sich die Startbedingungen im Gegensatz zu denen der reinen Autolyse in Bezug auf den Lysegrad und der Proteinkonzentration. Der Lysegrad lag zum Startzeitpunkt der Autolyse bei 68 % und die Proteinkonzentration bei 11,5 g L⁻¹.

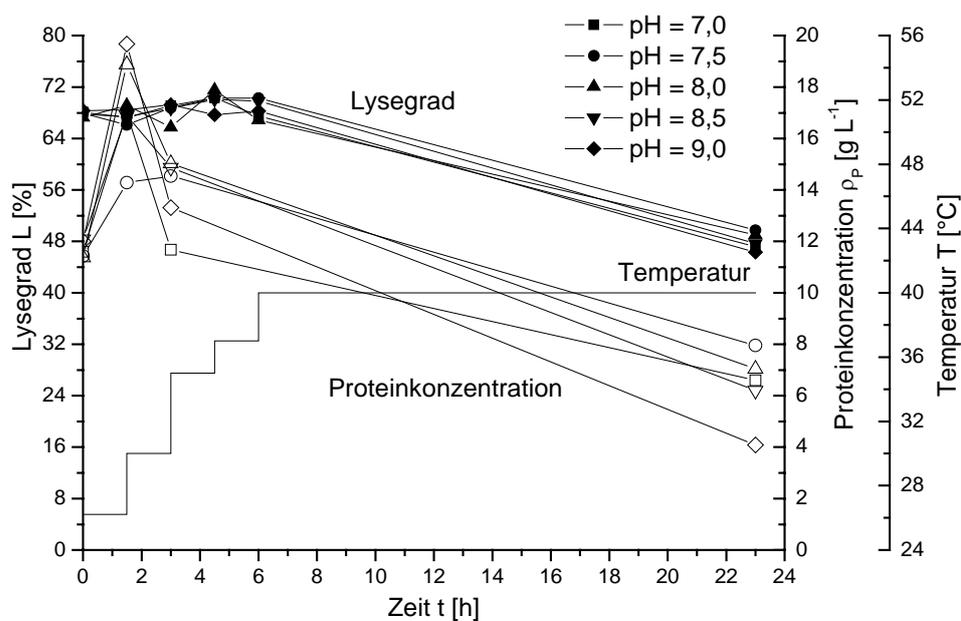


Abbildung 6.3: Hochdruckaufschluss von *Escherichia coli* B-3996 mit anschließender Autolyse bei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten (Biotrockenmassekonzentration 24,0 g L⁻¹)

Die Erhöhung der Temperatur bis auf 35 °C führte in allen Ansätzen zu einem gleichbleibenden Lysegrad, jedoch nahm die Proteinkonzentration im gleichen Zeitraum zunächst deutlich zu. Ab 30 °C kam es zu einer starken Reduzierung der gelösten Proteinkonzentration, was bei konstanten Lysegraden auf einen Abbau der Proteine durch vorhandene Proteasen hindeutete. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 40 °C nahm sowohl der Lysegrad als auch die Proteinkonzentration ab. Jedoch lag die Proteinkonzentration nach 23 Stunden mit Werten zwischen 4 g L⁻¹ und 8 g L⁻¹ auf hohem Niveau. Dies führte zu thermisch instabilen Lysaten, bei denen es durch die Hitzesterilisation zur Präzipitation der Proteine kam. Der erreichte Lysegrad lag nach 23 Stunden zwischen 46 % und 50 %. Die zelleigene Enzymausstattung vermochte die Zellinhaltsstoffe nicht effektiv abzubauen, um eine spätere Präzipitation zu verhindern. Einerseits konnte durch die Temperaturerhöhung das Temperaturoptimum der an der Autolyse beteiligten Enzyme überschritten worden sein, andererseits konnte es aber auch zu einer Inaktivierung gekommen sein. Generell ließ sich erneut feststellen, dass anfänglich höhere pH-Werte zu geringfügig höheren Lysegraden führten.

Als nächstes wurde versucht, durch den Zusatz einer alkalischen Protease nach dem Aufschluss (Alcalase[®] 2.4 L FG, Novozymes) den Proteinabbau zu verbessern. Proteine machen mit 50 - 70 %TS (Muttzall, 1993) den größten Anteil an der Trockenmasse der Bakterienzelle aus.

6.2.4 Enzymatische Lyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation der Enzymkonzentration

Ziel des Versuches war es, durch den Einsatz einer Proteaselösung nach einem mechanischen Aufschluss und einer Autolysephase das Lyseergebnis positiv zu beeinflussen. Außerdem sollte der Einfluss der Autolysephase überprüft werden.

Die Zellsuspension wurde zunächst mechanisch aufgeschlossen (drei Passagen bei 800 bar). Dann folgte für einen Teil der Ansätze eine einstündige Autolysephase bei 37 °C und einem pH-Wert von 8,5. Bei den anderen Ansätzen wurde diese Autolysephase weggelassen. Damit sollte der Einfluss dieses Schrittes auf das Lyseergebnis überprüft werden. Vor der Enzymzugabe wurden in beiden Fällen die pH-Werte auf 8,5 korrigiert, um am pH-Optimum der Alkalase arbeiten zu können. Außerdem wurde nach der Enzymzugabe die Temperatur auf 55 °C

erhöht und bis zum Ende der Lyse beibehalten. Die Konzentration des Enzyms wurde über einen großen Bereich variiert. Er erstreckte sich von $1 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$ bis $45 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$. Innerhalb dieser Spanne wurden zehn unterschiedliche Konzentrationen untersucht. **Abbildung 6.4** (mit Autolyse, Biotrockenmassekonzentration $22,1 \text{ g L}^{-1}$) und **Abbildung 6.5** (ohne Autolyse, Biotrockenmassekonzentration $26,0 \text{ g L}^{-1}$) zeigen die Ergebnisse.

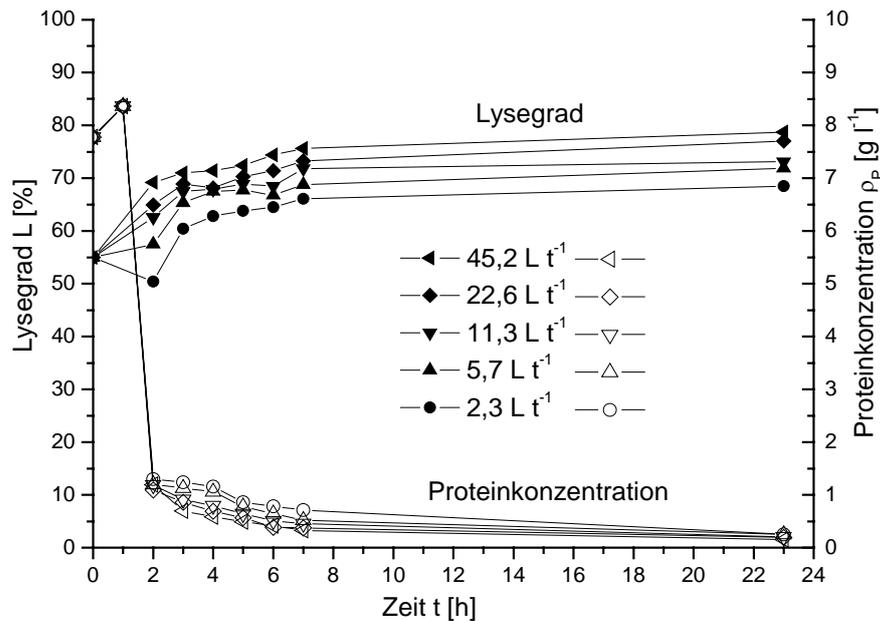


Abbildung 6.4: Hochdruckaufschluss von *Escherichia coli* B-3996 mit Autolysephase und anschließender enzymatischer Lyse unter Variation der Enzymkonzentration (Biotrockenmassekonzentration $22,1 \text{ g L}^{-1}$)

Während der Autolyse nahm die Proteinkonzentration in der ersten Stunde zu (**Abbildung 6.4**). Durch die Enzymzugabe sank die Proteinkonzentration in allen Schüttelkolben. Nach nur einer Stunde Alkalasebehandlung reduzierte sich die anfängliche Proteinkonzentration um mindestens 80 %. Eine leichte Staffelung war zu erkennen, d.h. je höher die eingesetzte Alkalasekonzentration desto niedriger lag die Proteinkonzentration nach einer Stunde. Dieser Trend setzte sich bis zur siebten Stunde fort. Erst nach 23 Stunden hoben sich die Unterschiede auf. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 55 °C kam es innerhalb der ersten Stunde der Alkalasebehandlung bei einer Enzymkonzentration von $2,3 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$ zu einem abnehmenden Lysegrad bei gleichzeitig abnehmender Proteinkonzentration. Es muss daher zur Präzipitation von Zellbestandteilen gekommen sein. Doch bereits eine Stunde später

stieg der Lysegrad durch den Abbau der gelösten und ausgefallenen Proteine. Die erreichten Lysegrade lagen nach 23 Stunden zwischen 69 % und 79 %.

Bei Betrachtung des Versuches ohne Autolysephase zeigten sich (**Abbildung 6.5**) übereinstimmende Ergebnisse. Die Zugabe der Protease führte zu einem sprunghaften Anstieg des Lysegrades. Wie zu erwarten, führten niedrigere Proteasekonzentrationen zwar zu einem verlangsamteten Abbau der Proteine und damit zu einer langsameren Zunahme des Lysegrades, jedoch glichen sich die Proteinkonzentrationen und die Lysegrade in den Schüttelkolben am Ende an. Es stellten sich Lysegrade zwischen 72 % und 75 % ein. Ein negativer Einfluss durch das Fehlen der Autolysephase ließ sich mit der durchgeführten Analytik nicht erkennen. Wie **Abbildung 6.5** erkennen lässt, wurde ein Schüttelkolben ohne Enzymzugabe als Referenzwert mitgeführt. Dessen Lysegrad lag durch das Ausfallen von Zellbestandteilen, größtenteils der Proteine, bei nur 29 %.

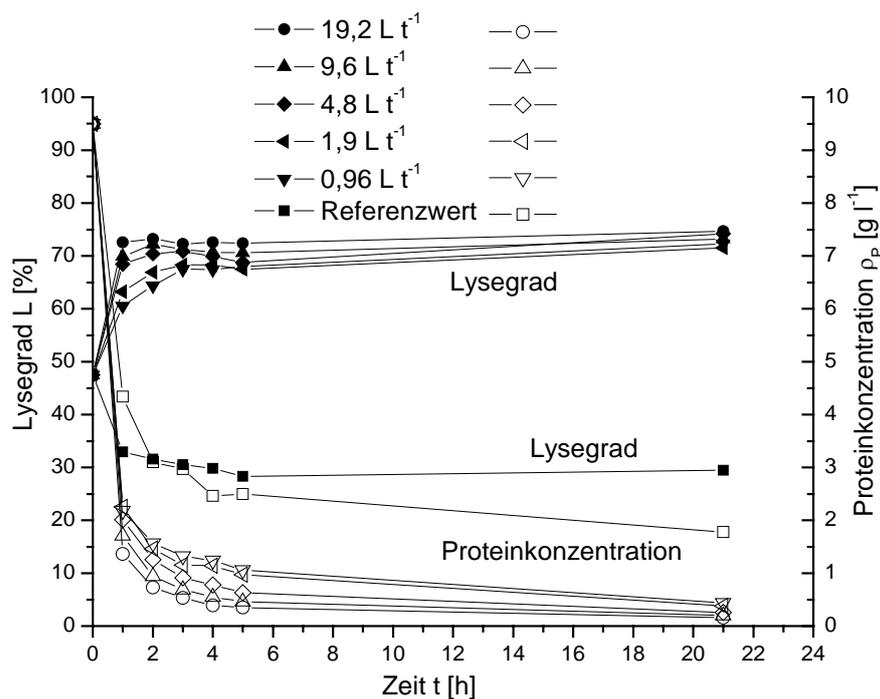


Abbildung 6.5: Hochdruckaufschluss von *Escherichia coli* B-3996 mit anschließender enzymatischer Lyse unter Variation der Enzymkonzentration (RW = Referenzwert ohne Enzymzugabe, Biotrockenmassekonzentration $26,0 \text{ g L}^{-1}$)

Diese Versuche zeigten zweierlei. Zum einen konnte die eingesetzte Enzymkonzentration für zukünftige Lysen auf unter $1 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$ gesenkt werden und zum anderen konnte auf die Autolysephase verzichtet werden.

6.2.5 Enzymatische Lyse ohne Hochdruckaufschluss

Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, inwieweit ein Hochdruckaufschluss vor der Zugabe der Proteaselösung notwendig war.

Die resuspendierte Biomasse wurde auf vier Schüttelkolben verteilt, mit Alkalasesuspension ($5,6 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$) versetzt und nach der pH-Einstellung auf 8,5 bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die vorhandene Proteinmenge wurde zwar schnell reduziert, jedoch lag die Proteinanfangskonzentration unter 1 g L^{-1} . Gründe dafür wurden bereits in **Kapitel 6.2.1** genannt. Durch die langsame Lyse der Zellen gab es wenig Angriffspunkte für die Protease, so dass sie vermutlich ihre Aktivität durch Selbstverdau schnell verlor. Der Lysegrad erreichte nach vier Stunden nur 22 % und lag damit weit hinter den bereits erzielten. Dieses Lyseverfahren wurde nicht weiter untersucht, da sich diese Form der Lyse als ineffizient erwies.

6.2.6 Enzymatische Lyse mittels zweier Enzyme nach Hochdruckaufschluss

Dieser Versuch sollte zeigen, inwieweit nach der Alkalasebehandlung die Zugabe einer Lysozymlösung den Lysegrad beeinflusst.

Die Bakteriensuspension wurde nach dem mechanischen Aufschluss (drei Passagen bei 800 bar) auf einen pH von 8,5 eingestellt. Die Zugabe der Protease erfolgte nach der einstündigen Autolysephase bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden sechs Schüttelkolben mit drei verschiedenen Alkalasekonzentrationen ($5,6 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$, $2,9 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$ und $1,1 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$) angesetzt. Nach sechs Stunden lag der Lysegrad unabhängig von der eingesetzten Alkalasekonzentration wie bereits bei den vorangegangenen Versuchen zwischen 67 % und 70 %. Auch die Proteinkonzentration konnte effektiv reduziert werden. Nach den sechs Stunden wurden zu jedem Schüttelkolben

2 mL einer Lysozymstammlösung ($\rho = 2,56 \text{ g L}^{-1}$) hinzugegeben und die Temperatur auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gesenkt. Während der Behandlungszeit von 14 Stunden veränderte sich weder der Lysegrad noch die Proteinkonzentration, so dass ein Einfluss des Lysozyms mit den hier verwendeten Methoden nicht festgestellt werden konnte. Der kombinierte Einsatz beider Enzyme wurde daher auch in Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit im Weiteren nicht mehr verfolgt.

6.2.7 Alkalische und saure Hydrolyse ganzer Zellen

Mit diesem Versuch sollte die Möglichkeit der chemischen Hydrolyse der *Escherichia coli*-Zellen überprüft werden. Über die Herstellung von Proteinhydrolysaten für Fütterungszwecke aus Algen, Hefen und Bakterien durch chemische Hydrolyse wurde bereits in der Literatur berichtet (Hedenskog *et al.*, 1970).

Bei einem ersten Versuch wurden die Schüttelkolben mit der resuspendierten Biomasse und einer Biotrockenmassekonzentration von $28,2 \text{ g L}^{-1}$ nach der pH-Einstellung für sieben Stunden in siedendes Wasser ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) gestellt. Eine stündliche Probennahme sollte den Verlauf des Aufschlusses zeigen. Je drei Hydrolyseansätze fanden unter alkalischen ($\text{pH}_0 = 12,5 / 12,0 / 11,5$) und unter sauren Bedingungen ($\text{pH}_0 = 1,5 / 2,0 / 2,5$) statt.

Schon während der Zugabe der Natronlauge bzw. Salzsäure kam es zur Lyse der Zellen. Die Reaktionen auf die pH-Änderung waren aber unterschiedlich. Durch die Alkalisierung kam es zur Verseifung der Phospholipide der Zellmembran (Belter *et al.*, 1988) verbunden mit einer plötzlichen Viskositätszunahme durch freigesetzte Nukleinsäuren. Eine Klärung der Suspension konnte beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte die Säurezugabe zu einem massiven Ausflocken von Proteinen und anderen hochmolekularen Biomolekülen. Unter dem Mikroskop zeigte sich in beiden Fällen eine stark reduzierte Anzahl an Zellen.

Abbildung 6.6 zeigt die Ergebnisse des Lyseversuches. Generell führte die alkalische Lyse mit Lysegraden zwischen 69 % und 75 % zu einer effektiveren Lyse der Zellen als die saure Hydrolyse mit einem maximalen Wert von 55 %.

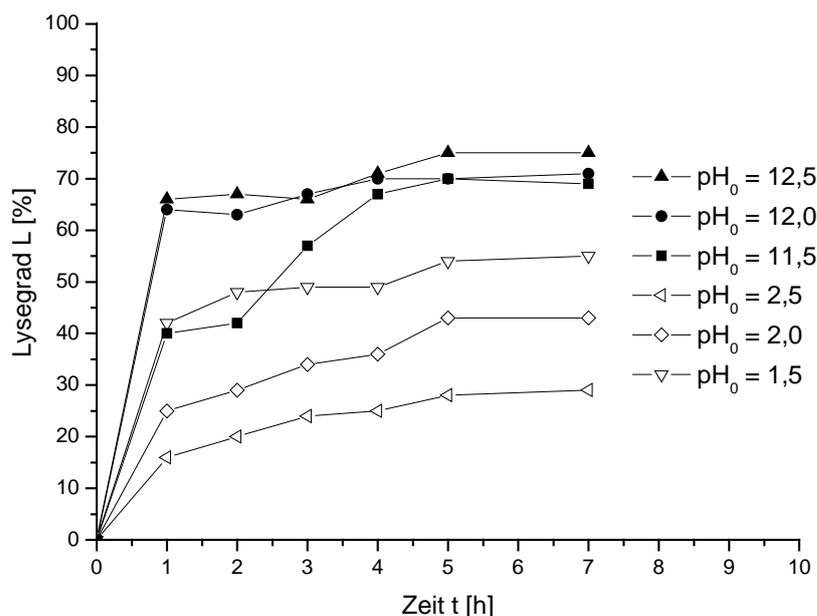


Abbildung 6.6: Chemische Hydrolyse von *Escherichia coli* B-3996 unter Variation des Ausgangs-pH-Wertes (Biotrockenmassekonzentration $28,2 \text{ g L}^{-1}$)

Innerhalb der ersten Stunde traten in allen Schüttelkolben die größten Veränderungen des Lysegrades auf. Eine Abhängigkeit des Lysegrades vom Ausgangs-pH-Wert war zu erkennen. Im sauren pH-Bereich sorgten niedrigere pH-Werte und im alkalischen pH-Bereich höhere pH-Werte zu höheren Lysegraden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration zeigte, dass durch die alkalische Hydrolyse mit einer Proteinkonzentration von $8,3 \text{ g L}^{-1}$ bereits nach einer Stunde Proteine in der gleichen Größenordnung wie durch einen mechanischen Aufschluss freigesetzt wurden. Jedoch kam es im weiteren Verlauf zu keiner Reduzierung der Proteinkonzentration. Die Bestimmung in den Ansätzen der sauren Hydrolyse zeigte eine sehr niedrige Proteinkonzentration, was in Zusammenhang mit der Flockenbildung auf die Präzipitation der Eiweiße hindeutete. Für einen Totalaufschluss der Proteine, mit den bereits in **Kapitel 2.4.3** aufgeführten Problemen, waren in beiden Fällen die Reaktionsbedingungen zu mild. Für einen enzymatischen Abbau der Proteine waren die Bedingungen ungeeignet und zusätzlich, wie sich in **Kapitel 6.2.3** zeigte, fehlte den Zellen die entsprechende Enzymausstattung für eine effektive Reduzierung.

Ein zweiter Versuch sollte die Frage klären, ob durch eine Erhöhung der Hydrolysetemperatur eine Steigerung des Lysegrades erzielt werden kann. Da sich die saure Hydrolyse als ineffektiv erwiesen hatte, wurden nur pH-Werte im basischen Bereich gewählt. Die Zellsuspensionen

(Biotrockenmassekonzentration $28,2 \text{ g L}^{-1}$) wurden für fünf Stunden bei 121 °C in den Autoklaven gestellt. Ein Nachteil dieser Behandlung war die fehlende Durchmischung während der Lyse.

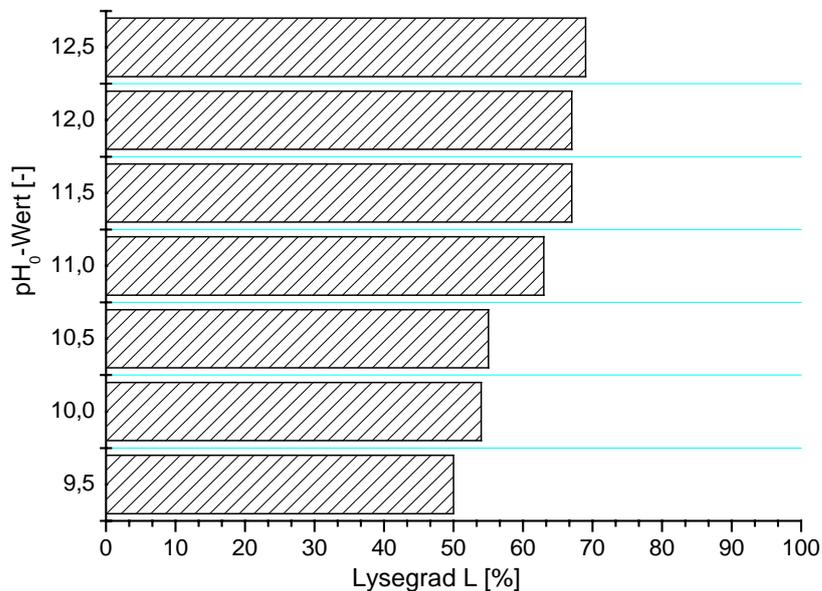


Abbildung 6.7 Alkalische Hydrolyse von *Escherichia coli* B-3996 unter Variation des Ausgangs-pH-Wertes bei 121 °C und 5 Stunden (Biotrockenmassekonzentration $28,2 \text{ g L}^{-1}$)

Wie **Abbildung 6.7** erkennen lässt, ergaben sich keine Verbesserungen in Hinblick auf den Lysegrad. Auch hier zeigten höhere pH-Werte bessere Ergebnisse.

Die chemische Hydrolyse überzeugte in Hinblick auf die Lysegeschwindigkeit in der hier durchgeführten Form im Vergleich zum Hochdruckaufschluss mit anschließender Proteasebehandlung. Der Lysegrad lag mit 75 % ($\text{pH}_0 = 12,5$ nach 7 Stunden) in der gleichen Größenordnung. Die Senkung der Behandlungszeit auf unter eine Stunde scheint möglich. In der Literatur werden für die Lyse von Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} = 10,5 - 12,5$) bereits 20 - 30 Minuten als ausreichend beschrieben (Stanbury & Whitaker, 1984; Schütte & Kula, 1990). Der größte Nachteil dieser Aufschlussmethode ist, dass zwar ein Zellaufschluss durch Zerstörung der Zellmembran erfolgt, der Lysegrad also messbar steigt, jedoch ein Abbau langkettiger Zellinhaltsstoffe nicht erfolgt. Eine ausführliche Betrachtung dieses Problems erfolgte bereits in **Kapitel 5.2.4**. Die Gefahr, wichtige Wachstumsfaktoren durch die Hydrolyse zu zerstören, ist ein weiterer Nachteil. Auch sind der Einsatz von Laugen und Säuren und der Eintrag und der damit verbundenen hohen Salzfracht ins Medium von

Nachteil. Jedoch enthalten einige Medien wie das im Labor häufig eingesetzte LB-Medium Natriumchlorid. Dieses ließe sich bei der Verwendung von Natronlauge zur pH-Wert Erhöhung und beim Einsatz von Salzsäure zur Neutralisation einsparen. Ein weiterer Vorteil der alkalischen Lyse ist ihre Unabhängigkeit vom Maßstab (Middelberg, 1995), die kostengünstige Durchführung (Schütte & Kula, 1990) und der geringe apparative Aufwand.

6.2.8 Alkalische und saure Hydrolyse nach Hochdruckaufschluss

Mit diesem Versuch sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich das Lyseergebnis bei der alkalischen Lyse durch einen vorgeschalteten mechanischen Aufschluss erhöhen ließ. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob sich durch die saure Hydrolyse nach einem Aufschluss höhere Lysegrade erreichen lassen als ohne diesen Schritt.

Dazu wurde die Zellsuspension wie beschrieben mechanisch aufgeschlossen und anschließend mit 2 M Natronlauge oder 2 M Salzsäure versetzt und in siedendes Wasser gegeben. Die Ausgangs-pH-Werte betragen unter alkalischen Bedingungen $\text{pH}_0 = 12,5 / 12,0 / 11,5 / 11,0 / 10,5 / 10,0$ (Biotrockenmassekonzentration $26,9 \text{ g L}^{-1}$) und unter sauren Bedingungen $\text{pH}_0 = 1,5 / 2,0 / 2,5 / 3,0$ (Biotrockenmassekonzentration $28,5 \text{ g L}^{-1}$). Nach dem Hochdruckaufschluss lag der Lysegrad der Zellsuspension zwischen 66,5 - 68,2 %. Die Veränderungen während der chemischen Hydrolyse zeigt **Abbildung 6.8**.

Es war zu erkennen, dass sich der Lysegrad bei den drei höchsten Ausgangs-pH-Werten im Vergleich zur alkalischen Hydrolyse ganzer Zellen auf ca. 85 % verbesserte. Auch die Lysegeschwindigkeit erhöhte sich stark. Nach nur einer Stunde war bereits ein Lysegrad zwischen 70 - 85 % erreicht. Der vorherige Aufschluss erlaubt darüber hinaus, die alkalische Lyse schon bei einem pH-Wert von 11,5 ohne nennenswerte Einbußen in Bezug auf Lysegeschwindigkeit und Lysegrad durchzuführen. Dieses birgt ein weiteres Einsparungspotential. Ein weiterer Vorteil ist die reduzierte Salzfracht. Auch bei dieser alkalischen Hydrolyse zeigte sich keine nennenswerte Reduzierung der durch den Hochdruckaufschluss freigesetzten Proteinkonzentration.

Wie **Abbildung 6.8** zusätzlich zeigt, führte die saure Hydrolyse nach dem Hochdruckaufschluss zu einem Lysegrad von maximal 40 %. Schon während der Einstellung des pH-Wertes kam es zu einem massiven Ausfall von Zellbestandteilen. Diese Fällung konnte innerhalb des untersuchten Zeitraumes durch die chemische Hydrolyse nicht ausgeglichen werden.

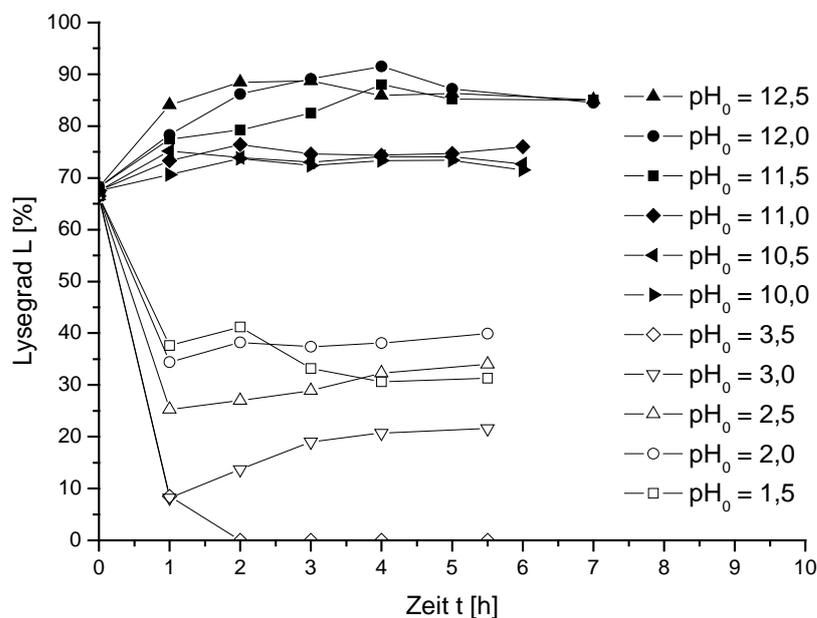


Abbildung 6.8: Hochdruckaufschluss von *Escherichia coli* B-3996 mit anschließender alkalischer Hydrolyse unter Variation des Ausgangs-pH-Wertes (Biotrockenmassekonzentration $26,9 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $28,5 \text{ g L}^{-1}$)

Es lässt sich abschließend feststellen, dass die alkalische Hydrolyse mit vorgeschaltetem mechanischen Aufschluss in Hinblick auf den Lysegrad und die Lysegeschwindigkeit dem mechanischen Aufschluss mit anschließender Alkalasebehandlung überlegen war. Die erzielten Lysegrade lagen mit über 85 % höher als die durch Enzymbehandlung erhaltenen. Die saure Hydrolyse hingegen zeigte sich in diesem Fall wiederum sowohl in Bezug auf den Lysegrad als auch auf die Lysegeschwindigkeit als ineffektives Verfahren zum Aufschluss der Zellen.

6.2.9 Zusammenfassende Betrachtung der Lyseversuche

Abbildung 6.9 gibt in grafischer Übersicht die verschiedenen mit *Escherichia coli* B-3996 durchgeführten Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab wieder. Die maximal erreichten Ly-

segrade sind übersichtshalber mit in das Schema aufgenommen worden. Durch Präzipitatbildung konnte sich der Lysegrad innerhalb eines Aufschlussgangs auch wieder reduzieren.

Die Abstimmung der Aufschlussparameter für den Hochdruckaufschluss führten zu einem optimalen Arbeitsdruck von 800 bar und eine Passagenanzahl von drei. So konnte bereits ein Lysegrad von 65 % erreicht werden. Darüber hinaus wurde für den *Escherichia coli*-Stamm unter den gewählten Bedingungen eine Unabhängigkeit des Lysegrades von der Zellkonzentration festgestellt.

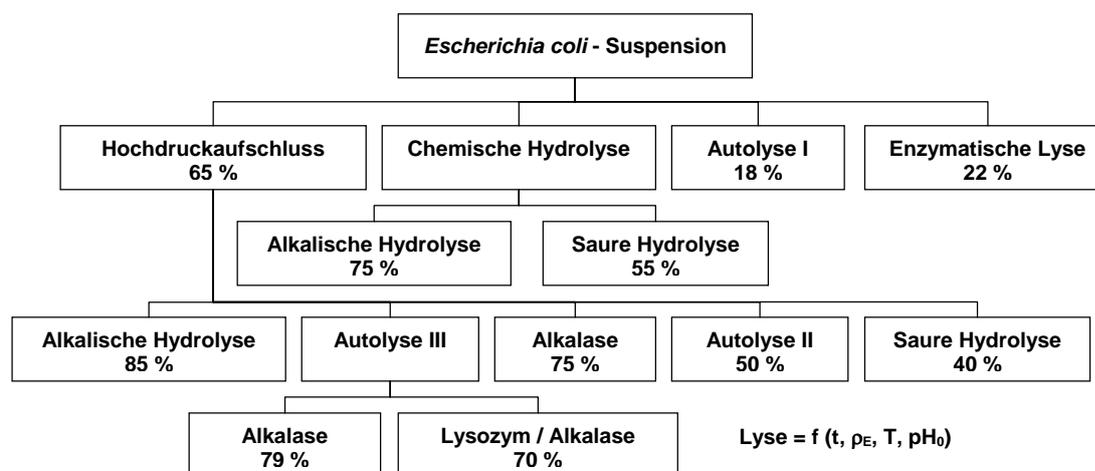


Abbildung 6.9: Schüttelkolbenversuche mit *Escherichia coli* B-3996 mit Angabe der maximal erreichten Lysegrade. Die Biomasse für die Lyseversuche wurde durch Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 im Rührkesselreaktor gewonnen.

Der Blick auf die Übersicht zeigt, dass die chemischen Hydrolysen im alkalischen Milieu sowohl mit als auch ohne vorgeschalteten Hochdruckaufschluss zu den höchsten Lysegraden führten. Auch in Bezug auf die Lysegeschwindigkeiten überzeugten diese beiden Verfahren. Ein klarer Nachteil lag im fehlenden Abbau der freigesetzten Proteine, der hohen Salzfracht und der möglichen Zerstörung von Wachstumsfaktoren.

Im Gegensatz zu den guten Ergebnissen im basischen pH-Bereich konnte unter sauren Bedingungen keine effektive Lyse erzielt werden. Der Hochdruckaufschluss führte hier sogar zu einer Verschlechterung der Lyse. Die Zellen wurden zwar aufgeschlossen, jedoch präzipitierten die Zellinhaltsstoffe und führten zu niedrigen Lysegraden. Auch hier wurden die Proteine aufgrund der zu milden Reaktionsbedingungen in ihrer Konzentration nicht reduziert.

Sowohl die proteaseunterstützte Lyse intakter Zellen mit einem maximalen Lysegrad von 22 % als auch die Autolyse mit einem maximalen Lysegrad von 18 % konnten zwar unter milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, aber sie führten nur zu inakzeptablen niedrigen Lysegraden.

Die Behandlung des Homogenisats mit einer alkalischen Protease in einer Konzentration von $1 \text{ L t}_{\text{BTM}}^{-1}$ führte unabhängig von einer Autolysephase zu Lysegraden von 75 % bis 79 %. Durch Einbeziehen der Proteinkonzentration in die Beurteilung der Lyseergebnisse, lag die enzymatische Lyse damit gegenüber der alkalischen Hydrolyse nach einem Hochdruckaufschluss im Vorteil. Durch den proteolytischen Abbau sank die Konzentration der Proteine um 95 %. Durch die gewählten Bedingungen bei der alkalischen Hydrolyse konnte keine Reduzierung erreicht werden. Es zeigte sich daher, dass bei der Hitzesterilisation ein Großteil der Proteine durch Denaturierung ausfiel. Die Restproteine und Peptide der enzymatisch behandelten Lysate dahingegen blieben in Lösung. Einen weiteren Vorteil stellten die milden Lysebedingungen dar. Durch diese konnten wichtige Wachstumsfaktoren wie Vorstufen für Coenzyme und auch die Coenzyme selbst erhalten bleiben. Auch konnte, wie sich später zeigen wird (**Kapitel 6.5**), durch den Einsatz der Alkalase eine große Menge an Aminosäuren freigesetzt werden.

Für die Wachstumsversuche wurde daher, auch durch die positiven Ergebnisse der Wachstumsversuche bei den Kultivierungen mit *Klebsiella planticola* (**Kapitel 5.6**), die Herstellung von Lysat mittels Hochdruckhomogenisation und anschließender Proteasebehandlung gewählt.

6.3 Fermentationen von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160

Das Ziel dieser Fermentationen lag in der Gewinnung von Biomasse (**Kapitel 6.1**) für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab und in der Gewinnung von Daten zur Charakterisierung des Systems Medium (A1-160) / Stamm (*Escherichia coli* B-3996).

Es wurden 11 Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Saccharose als Hauptkohlenstoffquelle und Hefeextrakt als komplexem Bestandteil durchgeführt. Anhand einer typischen Kultivierung erfolgt nun die ausführliche Betrachtung dieser Versuchsreihe. Es handelt sich um die Fermentation mit der Nummer 56 und wird im Folgenden mit F56 abgekürzt. Danach wird die Reproduzierbarkeit des Prozesses durch Vergleich mit weiteren Fermentationen belegt.

Nach einer kurzen Adaptions- und Beschleunigungsphase trat die Bakterienkultur in eine erste Phase mit exponentiellem Wachstum ein. Mit Hilfe der halblogarithmischen Auftragung der optischen Dichte gegen die Zeit ließ sich exponentielles Wachstum anhand der Bereiche mit konstanter Steigung erkennen (**Abbildung 6.10**).

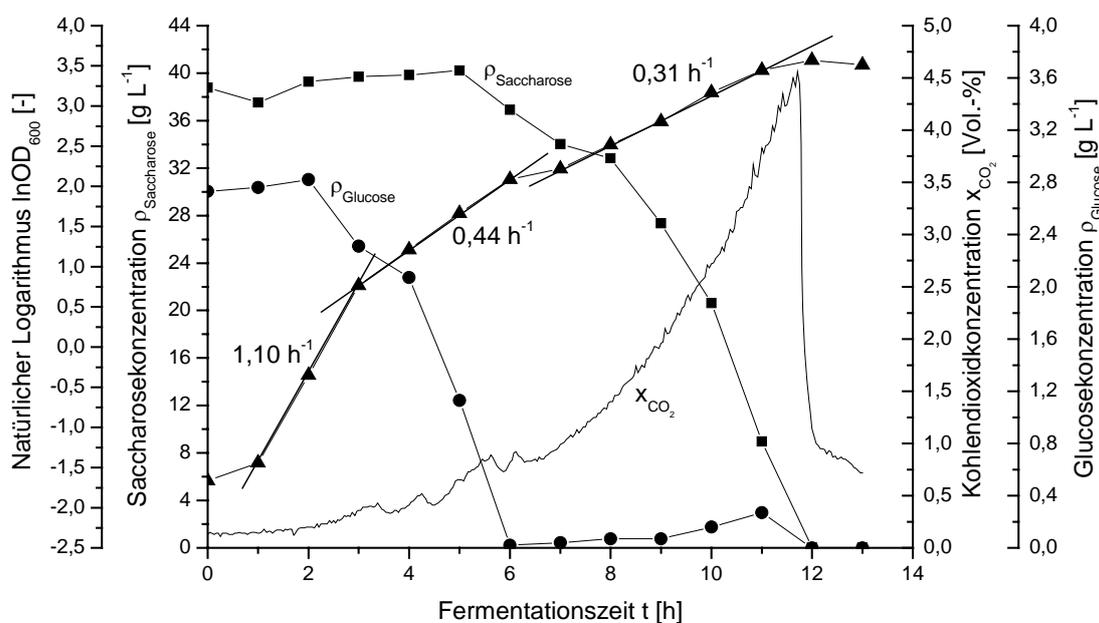


Abbildung 6.10: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 (F56)

Zwischen der ersten und der dritten Stunde zeigte sich eine erste exponentielle Wachstumsphase. Dieser Zeitraum entsprach etwa dem erstmaligen Anstieg und Abfall der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft. Es ergab sich eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von $1,10 \text{ h}^{-1}$. Das Ende dieser Phase ließ sich durch das Abknicken der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft und dem Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration gut erkennen (**Abbildung 6.11**).

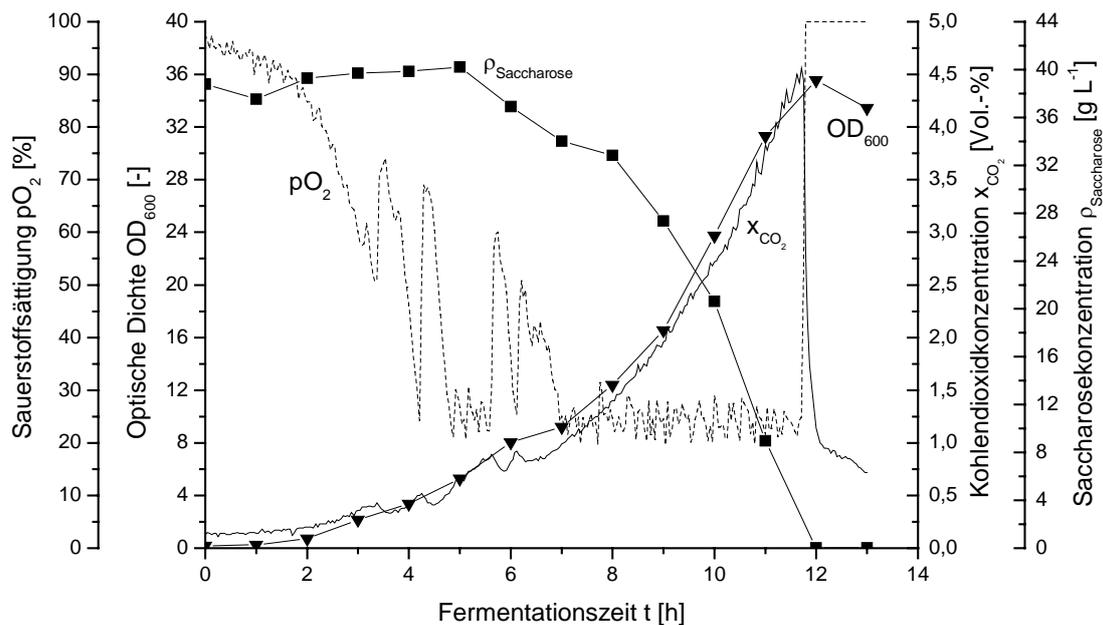


Abbildung 6.11: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 (F56)

Eine zweite Wachstumsphase mit einer spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,44 \text{ h}^{-1}$ schloss sich der ersten an. Aus **Abbildung 6.12** wird ersichtlich, wie es zu den für alle Fermentationen charakteristischen Schwankungen im Kohlendioxid signal kam. Innerhalb der ersten sechs Stunden wurden die über den Hefeextrakt in das Medium eingetragenen Aminosäuren verstoffwechselt. Aminosäuren mit einer Konzentration von unter $0,06 \text{ g L}^{-1}$ wurden nicht mit in die Grafik aufgenommen. Das gebildete Threonin wurde in seiner Konzentration nicht reduziert. **Abbildung 6.10** zeigt außerdem, dass Glucose, die zum einen aus dem Hefeextrakt und zum anderen durch hydrolytische Spaltung der Saccharose während der Hitzesterilisation entstanden war, abgebaut wurde. Der Grund für die Ausnahme des Threonins vom Abbau der Aminosäuren war genetisch bedingt und wurde bereits in **Kapitel 2.5.2** beschrieben.

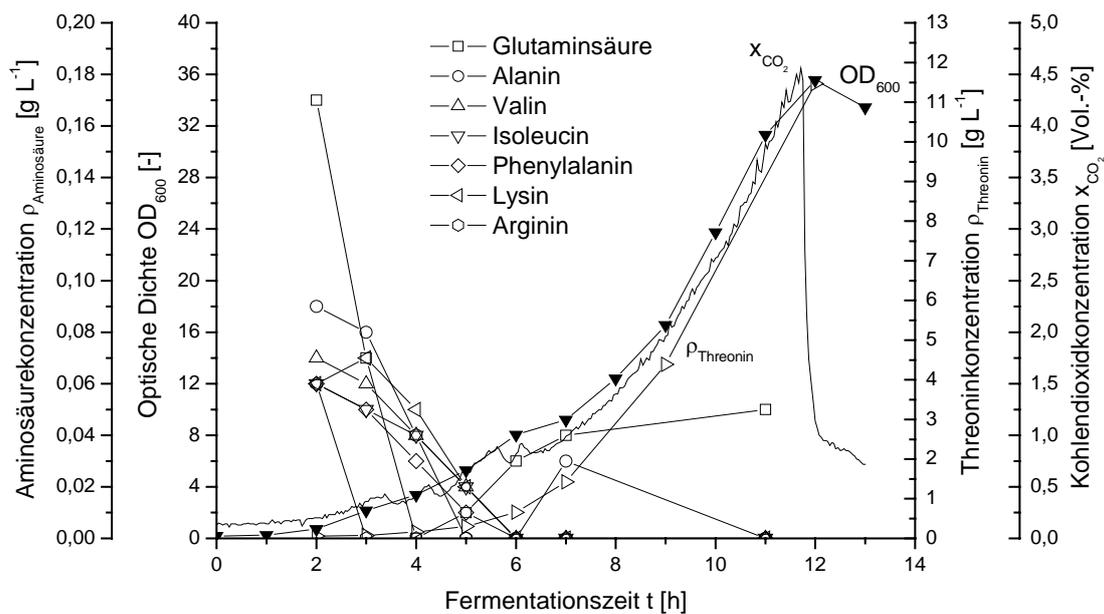


Abbildung 6.12: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 (F56)

Nachdem die Aminosäuren und die Glucose fast verbraucht worden waren, setzte der Abbau der Saccharose nach etwa fünf Stunden ein. Dies ging einher mit dem letzten großen Anstieg der Kohlendioxidkonzentration. Er setzte sich bis zur vollständigen Verstoffwechslung nach 12 Stunden fort. In der letzten exponentiellen Wachstumsphase konnte, wie in allen Fermentationen auf A1-160, beobachtet werden, dass die Glucosekonzentration wieder leicht anstieg (**Abbildung 6.10**), bevor sie dann beim Erreichen der stationären Phase verschwand.

Generell gelangt die Saccharose durch ein Porin in der äußeren Membran in das Periplasma. Dort wird sie über das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (PTS-System) in die Zelle transportiert (Meadow *et al.* 2005). Die zur Akkumulation der Saccharose benötigte Stoffwechselenergie wird dabei nicht aus ATP gewonnen, sondern aus Phosphoenolpyruvat (PEP). Transportprozesse in Verbindung mit der chemischen Modifikation des Substratmoleküls werden im Allgemeinen als Gruppentranslokation bezeichnet (Sauter, 2003). Da sich die phosphorylierte Saccharose, die in die Zelle gelangt, chemisch von der Saccharose außerhalb der Zelle unterscheidet, kommt es zu keinem Konzentrationsgradienten über die Membran. PEP-abhängige PTS-Systeme transportieren eine weite Palette von Substraten. Dazu gehören viele Mono- und Disaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Sac-

charose und Trehalose aber auch andere Substrate wie Glucosamine und Mannitol (Meadow *et al.* 1990; Meadow *et al.* 2005).

Der erneute Anstieg der Glucosekonzentration in der Phase des Saccharoseabbaus ließ sich nun damit erklären, dass durch Zellyse Glucose aus den Zellen freigesetzt wurde. Die Glucose wird enzymatisch durch eine Invertase aus der Saccharose entstanden sein. Eine Diffusion der Glucose aus dem Cytoplasma ins Medium aus lebensfähigen Zellen wird als unwahrscheinlich angesehen.

Nach Verbrauch der letzten Kohlenstoffquelle, der Saccharose, sank die Kohlendioxidkonzentration in der Abluft sehr stark (**Abbildung 6.12**). Im Gegensatz dazu stieg die Sauerstoffsättigung im Medium aufgrund des geringeren Sauerstoffbedarfs und der hohen Rührerdrehfrequenz stark an (**Abbildung 6.11**).

Wie **Abbildung 6.12** erkennen lässt, nahm die Threoninkonzentration ab der vierten Stunde zu und folgte dann der Kurve der optischen Dichte. Dies deutete auf eine wachstumsabhängige Produktbildung hin. Nach Chmiel (Chmiel, 2005) wird bei Stoffen des primären Anabolismus eine weitgehende Wachstumsassoziation festgestellt. Weitere Aminosäuren ließen sich, bis auf die am Ende nur in zu vernachlässigbaren Konzentrationen von unter $0,06 \text{ g L}^{-1}$ vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin, nicht nachweisen.

Im Folgenden wird nun anhand der Darstellung wichtiger Fermentationsgrößen die Reproduzierbarkeit des Prozesses belegt. Gekennzeichnet werden die Kultivierungen durch die Abkürzungen F32, F34, F105, F106 und F108.

Die segregative Plasmidstabilität konnte am Ende aller 11 Fermentationen mit über 90 % bestimmt werden. Dieser hohe Wert ließ sich zum einen mit dem bestehenden Selektionsdruck, der durch die Zugabe des Aminoglykosid-Antibiotikums Streptomycin erzielt wurde, erklären. Zum anderen enthielt der verwendete *E. coli*-Stamm das Plasmid pVIC40, welches auch unter nicht selektiven Wachstumsbedingungen eine hohe Stabilität aufweist (Debabov *et al.*, 1992). Die Resistenz wird durch eine Phosphorylierung des Antibiotikums und der damit einhergehenden Inaktivierung verursacht (Kornder, 2002). Das dazu benötigte Enzym ist plasmidcodiert.

Abbildung 6.13 zeigt exemplarisch den Verlauf der optischen Dichte für fünf Kultivierungen. Die maximal erreichte optische Dichte dieser Fermentationen lag zwischen 31 und 33.

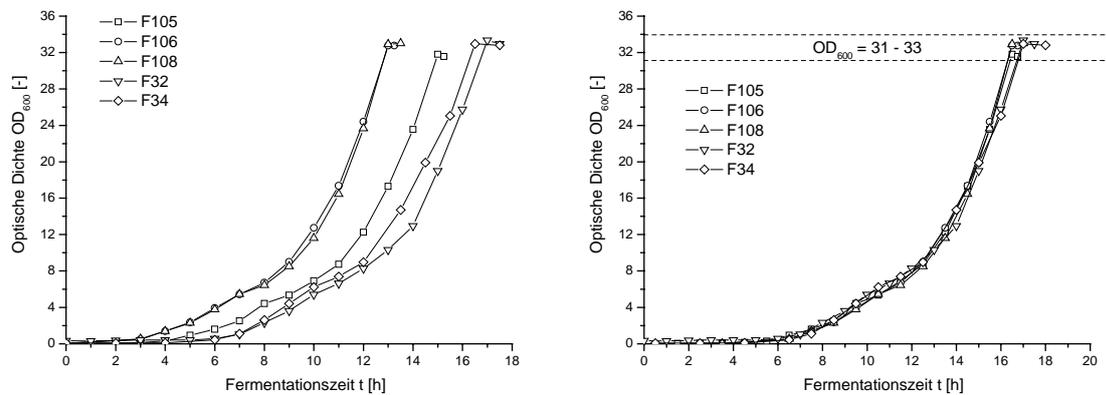


Abbildung 6.13: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160: links: Verlauf der optischen Dichte; rechts: Adaptionsphasenkorrigierte OD_{600} -Verläufe

Abbildung 6.13 lässt zusätzlich erkennen, dass die Adaptionsphasen der einzelnen Fermentationen sehr unterschiedlich ausfielen. Diese Unterschiede ließen sich auf verschiedene optische Dichten der Vorkulturen zurückführen. Eine niedrigere Zelldichte wirkte sich ebenso negativ auf die Länge der Adaptionsphase und damit auf die zeitliche Ausdehnung der gesamten Fermentation aus wie eine überalterte Kultur. Der große Einfluss der Vorkultur auf die Länge der Adaptionsphase und damit auf die Produktivität des ganzen Prozesses zeigte sich eindrucksvoll. In der betrieblichen Praxis ist deshalb die Wahl der optimalen Bedingungen für die Anlegung einer Animpfkultur außerordentlich wichtig.

Anhand **Abbildung 6.14** lässt sich die gute Reproduzierbarkeit des CO_2 -Ausstoßes erkennen. Wie belegt werden konnte, entstand das charakteristische Kohlendioxidmuster in der ersten Fermentationshälfte durch die sukzessive Verstoffwechslung der Aminosäuren des Hefeextraktes und der Glucose. Der letzte und größte Anstieg des Signals zeigte den Abbau der Saccharose an.

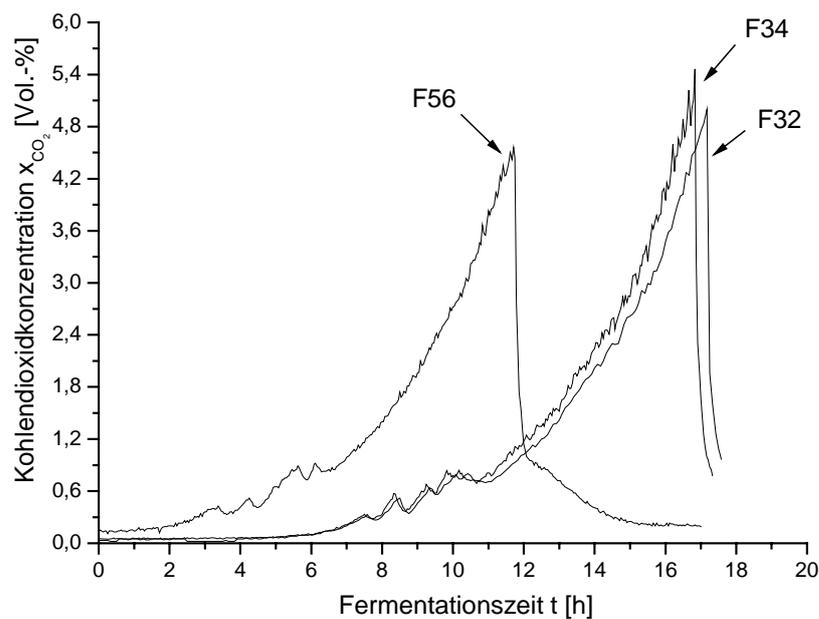


Abbildung 6.14: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160

Tabelle 6.2: Gegenüberstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160. Die in Klammern gesetzten Zeitangaben geben die ungefähre Dauer der Wachstumsphase an.

Fermentation	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ [h ⁻¹]		
F34	0,89 (2 h)	0,44 (2 h)	0,28 (5 h)
F56	1,10 (2 h)	0,44 (3 h)	0,31 (5 h)
F60	0,95 (2 h)	0,39 (2,5 h)	0,31 (4,5 h)
F61	0,80 (4 h)	0,35 (2 h)	0,30 (5 h)
F63	0,85 (2 h)	0,38 (2 h)	0,32 (5 h)
F105	0,98 (2 h)	0,51 (4 h)	0,31 (5 h)
F106	0,91 (4 h)	0,52 (2 h)	0,32 (5 h)
F108	0,91 (4 h)	0,52 (2 h)	0,33 (5 h)
Mittelwert	0,92 (2,8 h)	0,44 (2,4 h)	0,31 (4,9 h)

Die für die Wachstumsphasen bestimmten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten zeigt **Tabelle 6.2**. Die in Klammern gesetzten Zeitangaben geben die ungefähre Dauer der Wachstumsphase an. Die größten Übereinstimmungen ergaben sich sowohl in der Wachstumsgeschwindigkeit als auch in der Dauer der Phase für den Saccharoseabbau.

Abbildung 6.15 zeigt deutlich die wachstumsassoziierte Produktbildung. Dies führte zu Produktivitäten bezüglich des Threonins zwischen $0,94 - 1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Durch die lange Adaptionsphase bei F105 lag die Produktivität als zeitabhängige Größe mit $0,79 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ungleich niedriger. **Tabelle 6.3** und **Tabelle 6.4** zeigen eine Gegenüberstellung verschiedener Größen. Wie bereits gezeigt werden konnte, wies sowohl der Verlauf als auch die maximal erreichte Zelldichte eine sehr hohe Übereinstimmung auf. Die erzielten Threoninkonzentrationen lagen zwischen $11,47 \text{ g L}^{-1}$ und $13,40 \text{ g L}^{-1}$.

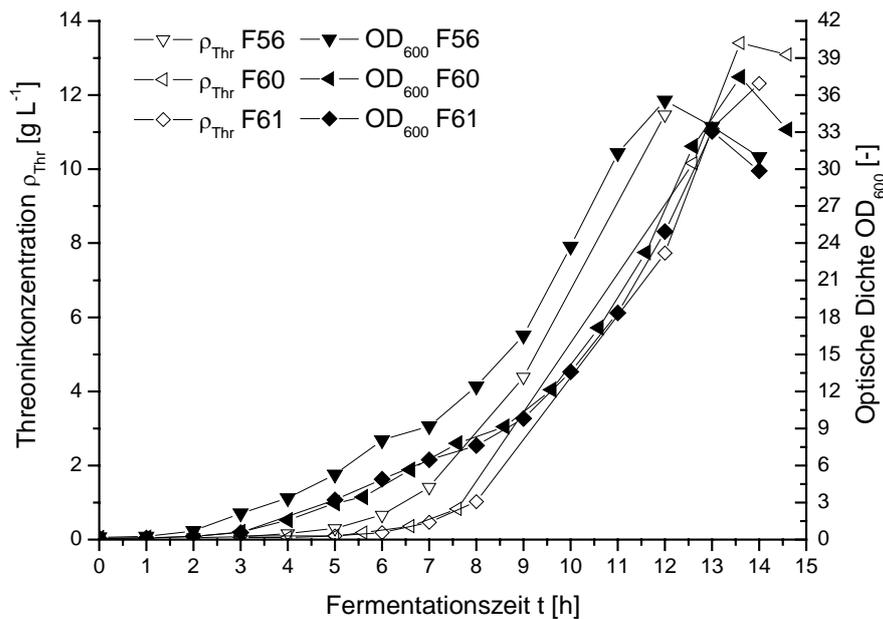


Abbildung 6.15: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Hefeextrakt

Tabelle 6.3: Gegenüberstellung wichtiger Prozessgrößen für die satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160

	Fermentationsdauer t [h]	Optische Dichte OD ₆₀₀ [-]	Biotrockenmasse- konzentration BTM [g L ⁻¹]	Threonin- konzentration ρ_{Thr} [g L ⁻¹]	Threonin- produktivität P [g L ⁻¹ h ⁻¹]
F56	12,00	35,60	10,79	11,47	0,96
F60	13,60	37,50	11,30	13,40	0,99
F61	13,00	33,10	12,20	12,31	0,95
F63	13,00	37,90	12,70	13,30	1,02
F105	15,25	29,97	12,35	12,01	0,79
F106	13,25	31,11	11,59	12,41	0,94
F108	13,00	31,26	11,40	13,03	1,00

Die Ertragskoeffizienten in **Tabelle 6.4** zeigen, dass pro Gramm Biomasse etwa 1,07 g Threonin gebildet wurden ($Y_{P/X}$ zwischen 0,97 g g⁻¹ und 1,19 g g⁻¹). Für die substratabhängigen Koeffizienten ergaben sich Bereiche zwischen 0,27 - 0,32 g g⁻¹ für $Y_{X/S}$ und 0,29 - 0,34 g g⁻¹ für $Y_{P/S}$. Das heißt, dass rechnerisch sowohl für die Bildung eines Gramms Biomasse als auch für die Synthese eines Gramms Threonin 3 g Saccharose benötigt wurden.

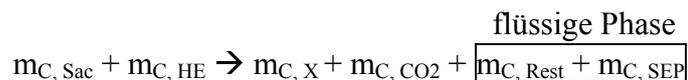
Tabelle 6.4: Gegenüberstellung wichtiger Ertragskoeffizienten für die satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 (X: Biotrockenmasse, P: Threonin, S: Saccharose)

	Ertragskoeffizient $Y_{P/X}$ [g g ⁻¹]	Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ [g g ⁻¹]	Ertragskoeffizient $Y_{P/S}$ [g g ⁻¹]
F56	1,06	0,27	0,29
F60	1,19	0,28	0,34
F61	1,01	0,31	0,31
F63	1,05	0,32	0,33
F105	0,97	0,31	0,30
F106	1,07	0,29	0,31
F108	1,14	0,29	0,33
Mittelwert	1,07	0,30	0,32

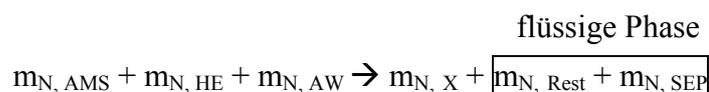
6.4 Bilanzierungen für die Fermentationen von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160

Das Ziel der Bilanzierung lag darin, die Verteilung des Kohlenstoffs und Stickstoffs zu Beginn der Fermentation und zum Zeitpunkt der Zellernte festzustellen. Dadurch sollte auch eine Vergleichsmöglichkeit für die späteren Fermentationen mit Lysat geschaffen werden.

Für die Kohlenstoffbilanzierung wurde angenommen, dass sich der zu Beginn der Kultivierung vorliegende Kohlenstoff anteilig aus dem der Saccharose und dem des Hefeextrakts zusammensetzte. Am Kultivierungsende befand sich der Kohlenstoff entweder in der Biomasse oder er war dem Fermenter über die Abluft in Form von Kohlendioxid entwichen. Außerdem lag in der flüssigen Phase ein Teil des Kohlenstoffes entweder als unverwerteter Rest (Restanteil Medium) oder als Stoffwechselendprodukt (Threonin) vor. Nachfolgende Gleichung verdeutlicht den Sachverhalt:



Der zum Startzeitpunkt vorliegende Stickstoff setzte sich anteilig aus dem des eingewogenen Ammoniumsulfats und dem des Hefeextraktes (Aminosäuren, Peptide) zusammen. Zusätzlich zu diesen Stickstoffquellen trat eine weitere variable Quelle in Erscheinung. Der pH-Wert wurde vor und während der Kultivierung mit 25 %igem Ammoniakwasser geregelt. Dieser Umstand erschwerte die Bilanzierung des Stickstoffs, da die anfangs vorgelegte Stickstoffmasse nicht mit der Masse am Ende identisch war. Am Ende der Kultivierung verteilte sich der Stickstoff auf die gebildete Biomasse, auf Stoffwechselendprodukte (Threonin) und auf nicht verwertete stickstoffhaltige Verbindungen (Restanteil Medium). Die zwei zuletzt genannten Gruppen bildeten zusammen die flüssige Phase. Innerhalb des Restanteils im Medium befand sich auch das hinzudosierte Ammoniakwasser. Es ergab sich für die Bilanzierung folgender Ausdruck:



Die Differenzierung innerhalb der flüssigen Phase in Restanteil und Stoffwechselprodukte konnte sowohl für den Kohlenstoff als auch für den Stickstoff nur für das Threonin (Ende) und das Ammoniakwasser (Anfang und Ende) durchgeführt werden.

Für die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffmassen in der Kultivierungssuspension wurden je zwei Proben vor dem Animpfen und zum Zeitpunkt der Zellernte entnommen und durch Zentrifugation geklärt. Bei den Proben nach der Kultivierung wurde sowohl im Pellet (Biomasse sowie evtl. Fällungsprodukte) als auch im Überstand (Restanteil Medium, Stoffwechselendprodukte) der Gehalt bestimmt. Bei den Proben vor dem Animpfen wurde nur der Überstand der Analyse zugeführt, da die Pelletmenge, wenn überhaupt vorhanden, verschwindend gering war und so für eine Elementaranalyse nicht ausreichte. Die Überstände wurden für die Analyse gefriergetrocknet. Die Trocknung der Zellpellets erfolgte dahingegen bei 60 °C im Vakuumtrockenschrank.

Die Bilanzierung erfolgt nun für drei auf dem halbsynthetischen Medium durchgeführte Fermentationen.

Startbedingungen (t = 0 h) für die Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 in einem Rührkesselreaktor

Rechnerisch ergaben sich bei einem Arbeitsvolumen von 5 L für den **Kohlenstoff** folgende Startbedingungen:

Einwaage Saccharose : 200,0 g	Einwaage Hefeextrakt: 10,0 g
Anteil Kohlenstoff : 42,1 %	Anteil Kohlenstoff : 41,1 %
Masse Kohlenstoff : 84,2 g	Masse Kohlenstoff : 4,1 g

Theoretisch befanden sich damit vor dem Animpfen 88,3 g Kohlenstoff im Fermenter. Dieser Wert wurde analytisch überprüft. **Tabelle 6.5** zeigt die Ergebnisse. Es ergaben sich Abweichungen von unter 3 %. Die angegebenen Werte zeigen somit die hohe Genauigkeit der durchgeführten Bilanzierung.

Tabelle 6.5: Theoretische und analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	F105	F106	F108
Kohlenstoff, analytisch	88,5 g (100,2 %)	87,2 g (98,8 %)	90,7 g (102,7 %)
Kohlenstoff, rechnerisch	88,3 g (100 %)		
Differenz (analytisch - rechnerisch)	0,2 g (0,2 %)	-1,1 g (-1,2 %)	2,4 g (2,7 %)

Nach der Betrachtung des Kohlenstoffs soll nun ein Blick auf den Stickstoff geworfen werden. Die Auswertung erfolgte analog zu der des Kohlenstoffs. Rechnerisch ergaben sich bei einem Arbeitsvolumen von 5 L für den **Stickstoff** folgende Startbedingungen:

Einwaage Ammoniumsulfat	: 25,0 g	Einwaage Hefeextrakt	: 10,0 g
Anteil Stickstoff	: 21,2 %	Anteil Stickstoff	: 12,3 %
Masse Stickstoff	: 5,3 g	Masse Stickstoff	: 1,23 g

Theoretisch befanden sich vor dem Animpfen 6,53 g Stickstoff im Fermenter. Dieser Wert wurde analytisch wie bereits für den Kohlenstoff überprüft. **Tabelle 6.6** zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 6.6: Theoretische und analytisch ermittelte Stickstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	F105	F106	F108
Stickstoff, analytisch	6,70 g (102,6 %)	7,80 g (119,4 %)	9,40 g (144,0 %)
Stickstoff, rechnerisch	6,53 g (100 %)		
Differenz (analytisch - rechnerisch)	0,17 g (2,6 %)	1,27 g (19,4 %)	2,87 g (44,0 %)
Stickstoffmasse im zudosierten Ammoniakwasser	0,41 g	1,44 g	2,68 g
Differenz nach Berücksichtigung der hinzudosierten Masse an Ammoniakwasser	-0,24 g	-0,17 g	0,19 g

Die Abweichung des analytisch ermittelten Stickstoffgehaltes von dem rechnerisch über die Einwaagen der Komponenten ermittelten Wert (6,53 g) betrug bis zu 44 %. Hierbei wurde aber noch nicht der Tatsache Rechnung getragen, dass durch das Einstellen des pH-Wertes auf den Ausgangswert Ammoniakwasser in den Fermenter gepumpt wurde. Unter Berücksichtigung dieser hinzudosierten Stickstoffmasse ließ sich der erhöhte Stickstoffgehalt vor dem Animpfen aufklären. Wie sich zeigte, verschwanden die Abweichungen fast vollständig.

Bedingungen für die Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 in einem Rührkesselreaktor zum Zeitpunkt der Zellernte ($t = t_{\max}$)

Am Ende der Kultivierungen wurden der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt in den beiden nach der Zentrifugation erhaltenen Fraktionen (flüssig und fest) bestimmt. Außerdem wurde über das CO₂-Signal die Menge an Kohlenstoff berechnet, die während der Kultivierung über die Abluft entwich. Innerhalb der flüssigen Phase wurde eine Differenzierung für das Threonin und das Ammoniakwasser vorgenommen.

Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Biomasse ergab im Mittelwert Werte von 12,9 % für den Stickstoff und 45,3 % für den Kohlenstoff.

Tabelle 6.7 zeigt die Ergebnisse der Kohlenstoffbilanzierung. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (**Tabelle 6.5**) jeder Fermentation.

Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil des Kohlenstoffs an der Biomasse mit Werten zwischen 29,5 % und 34,1 % leicht schwankte. Auch ergaben sich Schwankungen bei den Anteilen in der Abluft, dort lagen die Werte zwischen 28,0 % und 39,2 %. Der Kohlenstoffanteil in der flüssigen Phase konnte mit Werten zwischen 35,6 % und 36,8 % bestimmt werden. Davon fielen 76,8 % bis 80,4 % auf das Threonin. Bei den restlichen 20 % bis 25 % Kohlenstoff in der flüssigen Phase handelte es sich zum einen um weitere Stoffwechselprodukte wie Aminosäuren und zum anderen um den nicht verwertbaren Anteil der kohlenstoffhaltigen Verbindungen des Mediums. Beweise für diese Annahme gaben ein Proteingel und ein aufgenommenes Aminosäurespektrum. Das Proteingel zeigte für den Zeitpunkt der Zellernte nur sehr schwache Banden und die Bestimmung des Aminosäurespektrums zeigte neben dem Threonin auch geringe Anteile der Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin (**Kapitel 6.3**). Sowohl diese Aminosäuren als auch die nachgewiesenen Proteine verursachten somit einen Teil des Kohlenstoffs in der flüssigen Phase am Ende der Fermentation.

Tabelle 6.7: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 und einem Arbeitsvolumen von 5 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Kohlenstoffmassen aus **Tabelle 6.5**

Fermentation	F105	F106	F108
Kohlenstoff, flüssige Phase	31,5 g (35,6 %)	32,1 g (36,8 %)	32,7 g (36,1 %)
→ davon Threonin	24,2 g (76,8 %)	25,0g (77,9 %)	26,3 g (80,4 %)
Biomasse	30,2 g (34,1 %)	25,7 g (29,5 %)	29,6 g (32,6 %)
Kohlendioxid Abluft	31,2 g (35,3 %)	34,2g (39,2 %)	25,4 g (28,0 %)
Summe C, analytisch	92,9 g (105,0 %)	92,0 g (105,5 %)	87,7 g (96,7 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	4,4 g (5 %)	4,8 g (5,5 %)	-3,0 g (-3,3 %)

Die Summierung des Kohlenstoffs ergab im Vergleich zu der vorgelegten Masse zu Beginn der Kultivierung eine maximale Abweichung von 5,5 %.

Die Ergebnisse der Bilanzierung des Stickstoffs zeigt **Tabelle 6.8**. Die in Klammern gesetzten Werte in der fünften Zeile geben die anfänglich analytisch ermittelte Stickstoffmasse (**Tabelle 6.6**) nach der pH-Werteinstellung jeder Fermentation wieder.

Generell zeigte die Stickstoffbilanzierung auch in diesem Fall, dass die Zugabe einer externen Stickstoffquelle für eine nicht stickstofflimitierte Biomasse- und Produktbildung unabdingbar war. Der Stickstoff, der in der Biomasse und dem Threonin gebunden war, überstieg deutlich den der vorgelegten Masse zu Beginn der Fermentation. Zur Erinnerung: Die vor der pH-Einstellung am Anfang vorgelegte Stickstoffmasse lag bei nur 6,53 g (**Tabelle 6.6**). Auch die vor dem Animpfen durch die pH-Werteinstellung eingebrachte Stickstoffmasse hätte für eine Biomasse- und Produktbildung, wie sie auftrat, nicht ausgereicht. Die Kopplung zwischen pH-Regelung und Stickstoffzufütterung birgt die Gefahr in eine Stickstofflimitierung zu geraten, wenn mehr Stickstoff benötigt wird, als die Veränderung des pH zulässt. Während dieser Fermentationen kam es jedoch, wie sich später zeigen wird, zu einer Akkumulation von Stickstoff im Medium.

Tabelle 6.8: Verteilung des Stickstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 und einem Arbeitsvolumen von 5 L. Die in Klammern gesetzten Werte geben die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen nach der pH-Werteinstellung aus **Tabelle 6.6** wieder

Fermentation	F105	F106	F108
Stickstoff, flüssige Phase	16,7 g	19,7 g	18,8 g
→ davon Threonin	7,1 g	7,3 g	7,7 g
Biomasse	7,8 g	7,7 g	7,7 g
Summe N, analytisch	24,5 g (6,7 g)	27,4 g (7,8 g)	26,5 g (9,4 g)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	17,8 g	19,6 g	17,1 g
Stickstoffmasse im zudosierten Ammoniakwasser	18,1 g	19,4 g	18,9 g
Differenz nach Berücksichtigung der hinzudosierten Menge an Ammoniakwasser	0,3 g	-0,2 g	1,8 g

Wie bereits am Anfang des Kapitels angedeutet, führte die Verwendung von 25 %igem Ammoniakwasser als Korrekturmittel zu einer erschwerten Bilanzierung des Stickstoffs. Anhand der Fermentation F105, im Folgenden abgekürzt durch F105, soll die Bilanzierung für den Zeitpunkt der Zellernte nachvollzogen werden.

Aus **Tabelle 6.8** lässt sich entnehmen, dass zum Zeitpunkt der Zellernte 16,7 g Stickstoff in der flüssigen Phase (Threonin, Stoffwechselendprodukte, Restanteil Medium, Ammoniak) und 7,8 g Stickstoff in der festen Phase (Biomasse) vorlagen. Von den 16,7 g entfielen 7,1 g (42,5 %) auf das Threonin. Die Summierung der beiden Phasen führte zu 24,5 g Stickstoff. Die vorgelegte Masse Stickstoff zu Beginn der Fermentation betrug 6,7 g, daraus folgt, dass am Ende 17,8 g Stickstoff mehr im Fermenter waren. Diese Menge konnte nur über das Ammoniakwasser eingetragen und akkumuliert worden sein. Die Masse an hinzudosiertem 25 %igem Ammoniakwasser betrug während F105 88 g. In dieser Masse sind 18,1 g Stickstoff enthalten. Die Herkunft des am Ende der Kultivierung ohne Berücksichtigung der hinzudosierten Menge an Korrekturmittel übriggebliebenen Stickstoffs (17,8 g) konnte somit geklärt werden.

Wie **Tabelle 6.8** zeigt, konnten unter Berücksichtigung der Zugabe des Ammoniakwassers die Lücken in der Stickstoffbilanz mit nur geringen Abweichungen geschlossen werden.

Fazit

Durch die Bilanzierungen konnte der Weg des Kohlenstoffs und Stickstoffs während der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 nachgezeichnet werden.

Abbildung 6.16 zeigt in der graphischen Darstellung die Verteilung des Kohlenstoffs zu Beginn und zum Zeitpunkt der Zellernte. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte aus den drei ausgewerteten Fermentationen. Zu Beginn liegen 94,8 % des Kohlenstoffs in der Hauptkohlenstoffquelle Saccharose vor, nur ein kleiner Teil lässt sich in der komplexen Komponente, dem Hefeextrakt, finden. Insgesamt werden am Anfang 88,8 g Kohlenstoff vorgelegt, der am Ende der Fermentation zu 32,1 % (28,5 g) in der Biomasse, zu 34,1 % (30,3 g) in der Abluft, zu 28,3 % (25,2 g) im Threonin und 7,8 % (6,9 g) als Restanteil im Medium vorlag.

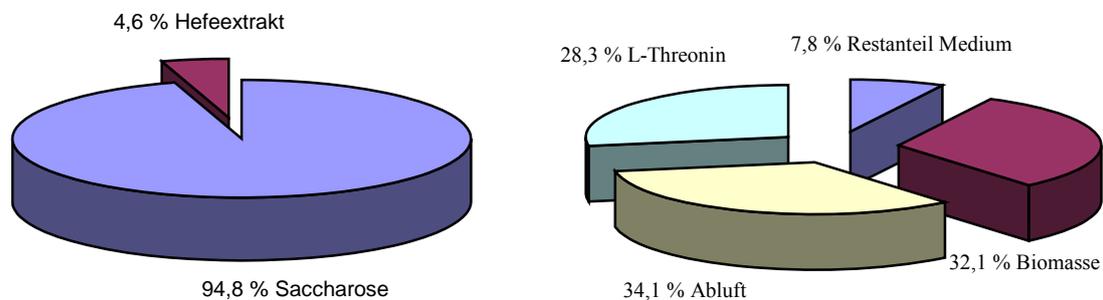


Abbildung 6.16: Verteilung des Kohlenstoffs zu Beginn (links) und zum Zeitpunkt der Zellernte (rechts) bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160

Die Bilanzierung des Stickstoffs zeigte, dass die Zuführung einer externen Stickstoffquelle in Form des Ammoniakwassers für die Biomassenbildung essentiell war. Sogleich erschwerte der Einsatz des Ammoniakwassers die Bilanzierung.

6.5 Lysatanalytik

Die in diesem Kapitel gemachten Aussagen zeigen die Ergebnisse der Charakterisierung der Lysate für die Wachstumsversuche. Gewonnen wurden die Lysate durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss (drei Passagen bei 800 bar) und anschließende Proteasebehandlung (**Kapitel 6.2.4**). Ein Vergleich der Lysate mit konventionell erhältlichen und im Labor eingesetzten komplexen Substraten schließt dieses Kapitel mit ein.

Tabelle 6.9 und **Tabelle 6.10** geben die Ergebnisse der Analysen wieder. In der ersten Spalte „Zyklus“ ist angegeben, für welchen Zyklus das Lysat eingesetzt wurde. Die Spalte „Fermentation“ gibt die Nummer der Kultivierung mit dem entsprechenden Lysat aus Spalte 1 an. Das Volumen der Lysate sowie der Lysegrad, der durch die Lyse erzielt werden konnte, finden sich in der dritten und vierten Spalte.

Tabelle 6.9: Ergebnisse der Lysatcharakterisierung (Teil 1). Die Lysate wurden aus *Escherichia coli*-Biomasse durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss und anschließende Proteasebehandlung gewonnen

Zyklus	Fermentation	Lysatvolumen V_{Lysat} [L]	Lysegrad L [%]	Feststoffkonzentration ρ [g L ⁻¹]	DNA-Gehalt des Feststoffanteils x_{DNA} [%TS]
1. Zyklus	F55	0,85	71,5	16,5	1,83
1. Zyklus	F57 / F58	2,0	69,3	15,4	2,34
1. Zyklus	F64	1,5	73,9	17,6	2,11
2. Zyklus	F66	1,9	69,2	18,4	2,35
3. Zyklus	F68	2,1	66,9	18,3	1,94
4. Zyklus	F72	2,0	69,0	18,2	2,51

Sojapepton, UD Chemie	-	-	9,5	2,06
Caseinpepton, Carl Roth	-	-	10,0	n. n.
Hefeextrakt, Biospringer	-	-	10,0	0,84
Hefeextrakt, Ohly	-	-	9,9	0,77

n. n.: nicht nachweisbar

Die Feststoffkonzentrationen lagen zwischen 15,4 - 18,4 g L⁻¹ und die Lysatvolumina zwischen 1,5 - 2,1 L. Die unterschiedlichen Feststoffkonzentrationen ergaben sich aus den verschiedenen Mengen an eingesetzter Biofeuchtmasse, den ihnen anhaftenden Restmediumsbestandteilen und den unterschiedlichen Lysegraden.

Der DNA-Gehalt der Lysate lag zwischen 1,8 - 2,5 %TS. Der durchschnittliche DNA-Gehalt einer Bakterienzelle wird mit 3 - 4 %TS angegeben (Storhas, 2003; Schlegel, 1992). Daraus folgt, dass mindestens die Hälfte der genomischen DNA der Zellen in Lösung gegangen war und sich im Lysat wiederfand. Wie zu erwarten enthielt Caseinpepton keine nachweisbare DNA, da es aus proteolytisch verdaulichem Milchprotein gewonnen wurde. Die untersuchten Hefeextrakte zeigten mit Gehalten um 0,8 %TS einen deutlich niedrigeren Wert. Hier muss während des Herstellungsprozesses eine Abtrennung der DNA oder ein weitgehender Abbau erreicht worden sein.

Tabelle 6.10: Ergebnisse der Lysatcharakterisierung (Teil 2). Die Lysate wurden aus *Escherichia coli*-Biomasse durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss und anschließende Proteasebehandlung gewonnen

Zyklus	Kohlenstoffgehalt des Feststoffanteils x_C [%TS]	Stickstoffgehalt des Feststoffanteils x_N [%TS]	Protein- konzentration ρ_P [g L ⁻¹]
1. Zyklus	49,9	8,1	0,13 (0,78 %TS)
1. Zyklus	34,5	9,4	0,16 (1,04 %TS)
1. Zyklus	39,0	13,1	0,18 (1,02 %TS)
2. Zyklus	38,7	12,9	0,16 (0,87 %TS)
3. Zyklus	38,6	12,4	0,18 (0,98 %TS)
4. Zyklus	38,7	13,1	0,22 (1,21 %TS)
SP, UD Chemie	41,5	10,2	0,03 (0,32 %TS)
CP, Carl Roth	39,0	12,1	n. n.
HX, Biospringer	41,1	12,3	0,01 (0,10 %TS)
HX, Ohly	40,3	12,5	0,01 (0,10 %TS)

SP: Sojapepton; CP: Caseinpepton; HX: Hefeextrakt; %TS: Prozentualer Anteil am Trockensstoff; n. n.: nicht nachweisbar

Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der *Escherichia coli*-Lysate lag zwischen 34,5 - 49,9 %TS bzw. zwischen 8,1 - 13,1 %TS. Damit lagen der Kohlenstoffgehalt im gleichen Bereich und der Stickstoffgehalt niedriger im Vergleich zu den aufgeführten konventionellen komplexen Substraten.

Die Proteinkonzentration lag trotz des Einsatzes einer Proteaselösung im Vergleich zu den konventionellen Substraten höher. Ein Teil der bestimmten Proteinkonzentration wurde durch die Miterfassung der Alkalase, die ein Molmasse von 27,3 kDa besaß (Novozymes, 2004), verursacht. Der Bradford Test konnte erst Proteine mit einem Molmasse von über 3 kDa nachweisen, so dass kleinere Proteine, Oligo- und Dipeptide nicht erfasst wurden. Der Lysegrad der Proteine in den herkömmlichen Extrakten musste daher höher sein.

Die Acetatkonzentration der Lysate lag wie zu erwarten unter der Nachweisgrenze. Durch hohe Wachstumsgeschwindigkeiten und einen Substratüberschuss an Glucose wurde bei *Escherichia coli* auch unter strikt aeroben Bedingungen die Bildung von Acetat beobachtet (Kleman & Strohl, 1994). Die Aufnahme der Glucose erfolgt dabei schneller als deren Umsetzung in Biomasse und Energie, was im Stoffwechsel zur Bildung von Acetat führt. Durch die Verwendung von Saccharose als Kohlenstoffquelle wurde dieser Effekt in diesem Fall vermieden.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalytik des Lysats im Vergleich zu den konventionellen Extrakten sind in **Abbildung 6.17** und **Abbildung 6.18** dargestellt. Bei den Aminosäurespektren der konventionellen Extrakte handelt es sich um Ergebnisse, die bereits in **Kapitel 5.5** dargestellt wurden. Da es sich bei der Aminosäure *L*-Prolin um ein sekundäres Amin handelt, kann es mit der gewählten Methode zur Vorsäulenderivatisierung nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion der Aminosäure *L*-Cystein mit *o*-Phthaldialdehyd führt hingegen zu sehr schwach fluoreszierenden Derivaten, die quantitativ nicht detektierbar sind (Büntemeyer, 2000).

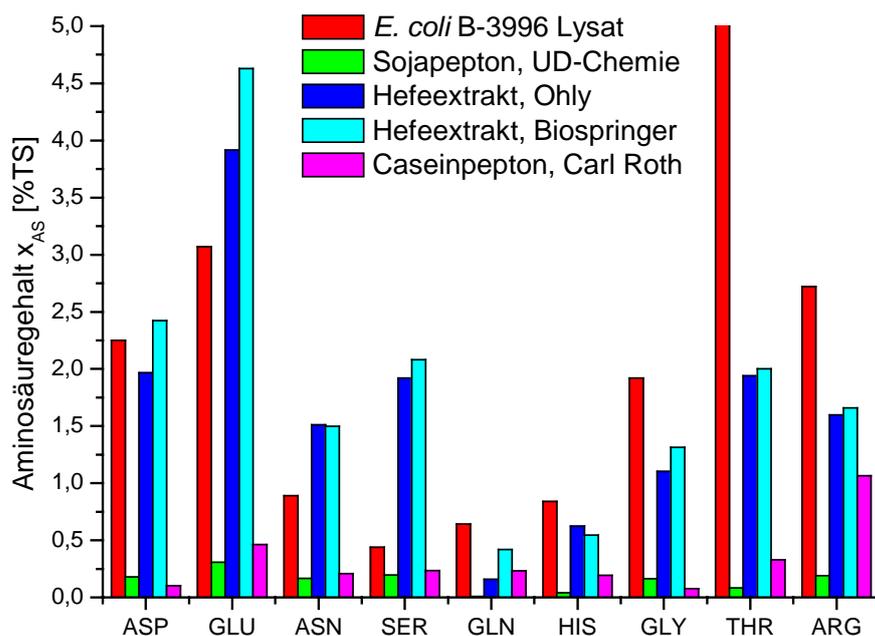


Abbildung 6.17: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Escherichia coli*-Lysate und der konventionellen Extrakte (Teil 1). Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Asp: Asparaginsäure; Glu: Glutaminsäure; Asn: Asparagin; Ser: Serin; Gln: Glutamin; His: Histidin; Gly: Glycin; Thr: Threonin; Arg: Arginin

Die Summierung der Aminosäuregehalte ergab, dass 36,1 % des Trockenstoffs aus Aminosäuren bestand. Der durchschnittliche Stickstoffgehalt von Aminosäuren wird mit 16 % (Faktor 6,25) angegeben (Matissek *et al.*, 1992; Baltes, 2000). Somit lässt sich aus dem Aminosäuregehalt des Lysats der Anteil des Aminosäurestickstoffs berechnen. Dieser liegt bei 5,8 %TS. Bei einem Gesamtstickstoffgehalt der Lysate zwischen 8,1 - 13,1 %TS fallen also bis zu 72 %TS des Stickstoffs auf die Aminosäuren. Des Weiteren lässt sich der Bestimmung der Aminosäurespektren entnehmen, dass vier Aminosäuren in den Lysaten mit einer Konzentration von über 3 %TS auftraten. Dies waren Glutaminsäure, Threonin, Valin und Leucin. Das charakteristische Aminosäurespektrum hat seinen Ursprung in der Lysatherstellung. Durch den Hochdruckaufschluss werden die Proteine der Zelle freigesetzt und anschließend durch die Protease zu kleineren Fragmenten bis hin zu den Aminosäuren abgebaut. Es entsteht ein spezifisches und reproduzierbares Spaltungsmuster der Proteine der *Escherichia coli*-Biomasse, welches sich im Chromatogramm als charakteristisches Aminosäurespektrum zeigt. Die verwendete Alkalase (E.C. 3.4.21.62) gehört zur Gruppe der Serin-Endopeptidasen.

Sie besitzt eine breite Spezifität und hydrolysiert Peptidbindungen neben nahezu allen Aminosäureresten (Kellermann, 1998b).

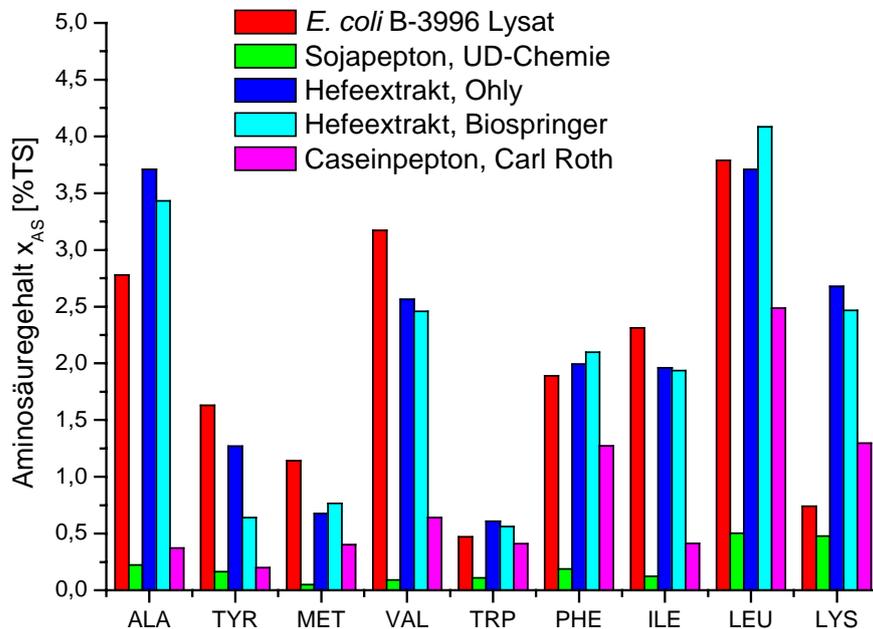


Abbildung 6.18: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Escherichia coli*-Lysate und der konventionellen Extrakte (Teil 2). Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Ala: Alanin; Tyr: Tyrosin; Met: Methionin; Val: Valin; Trp: Tryptophan; Phe: Phenylalanin; Ile: Isoleucin; Leu: Leucin; Lys: Lysin

Beide Hefeextrakte wiesen ein sehr ähnliches Aminosäurespektrum auf. Beide wurden aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen. Der Gesamtgehalt lag zwischen 34 %TS und 35 %TS der Extrakttrockenmasse und damit im gleichen Rahmen wie die der Lysate. Das Sojapepton enthielt mit 3,3 %TS Aminosäuren im Trockenstoff am wenigsten Aminosäuren. Das Caseinpepton lag mit 10,4 %TS im Mittelfeld. Es fiel auf, dass das Caseinpepton keine Proteine über 3 kDa und sehr wenig Aminosäuren enthielt. Der Stickstoffgehalt lag aber bei 12,1 %TS. Deshalb war davon auszugehen, dass ein Großteil des Stickstoffs in Form von Peptiden und kleineren Proteinen mit einer Molmasse unter 3 kDa vorlag.

Für die unter **Kapitel 6.3** vorgestellten Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium wurde der Hefeextrakt von Biospringer als komplexe Nährstoffquelle verwendet. Der Vergleich des Aminosäurespektrums dieses konventionellen Extraktes mit dem der Lysate zeigt,

dass einige Aminosäuren in den *Escherichia coli*-Lysaten in höheren Konzentrationen vorkommen als im Hefeextrakt (Biospringer), bei anderen ist es umgekehrt. Die *Escherichia coli*-Lysate besaßen eine höhere Konzentration an Glutamin, Histidin, Glycin, Threonin, Arginin, Tyrosin, Methionin, Valin und Isoleucin. Der Hefeextrakt enthielt hingegen mehr Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Serin, Alanin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin und Lysin. Bei manchen Aminosäuren war der Unterschied nur sehr gering wie z. B. im Fall von Asparaginsäure, Histidin und Tryptophan. Bei anderen traten die Unterschiede deutlicher hervor. Im bakteriellen Lysat überwogen die Aminosäuren Glycin, Threonin, Arginin und Tyrosin, während im Hefeextrakt die Aminosäuren Glutaminsäure, Serin und Lysin mengenmäßig stärker vertreten waren.

Der mit 5 %TS hohe Gehalt der Aminosäure Threonin lässt sich mit dem verwendeten Ausgangsmaterial für die Lysatgewinnung erklären. Bei dem eingesetzten *Escherichia coli*-Stamm handelt es sich um einen Threoninproduzenten. Durch das Resuspendieren der Biomasse vor der Lyse gelangt auch das dem Pellet anhaftende Restmedium und damit Threonin mit in das Lysat. Außerdem wird durch den Hochdruckaufschluss intrazellulär vorliegendes Threonin freigesetzt und gelangt so in den Lyseansatz.

Ein Grund für die unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen der Extrakte liegt in der Herkunft der Ausgangsmaterialien. Der kommerziell erhältliche Hefeextrakt wird aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen. Dem gegenüber stehen die Lysate aus *Escherichia coli*-Biomasse. Im Rahmen der Extraktgewinnung entstehen durch unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Biomasse und den unterschiedlichen Herstellungsverfahren unterschiedliche Aminosäurespektren. Generell ist davon auszugehen, dass die Zusammensetzung der Lysate nicht nur in Bezug auf deren Aminosäuren sondern auf jegliche Inhaltstoffe stark von den Lysebedingungen abhängen. Diese entscheiden darüber, in welchem Maß die verschiedenen Gruppen an Biomolekülen freigesetzt und abgebaut werden. Einen weiteren großen Einfluss auf das Spaltungsmuster der Proteine besitzt die eingesetzte Alkalase.

Durch die Lysatanalytik konnte gezeigt werden, dass eine gleichbleibende Qualität der Lysate gewährleistet ist. Eine wenig schwankende Qualität komplexer Substrate spielt in Hinblick auf eine gleichbleibende Produktqualität eine große Rolle in der Fermentationstechnik (Storhas, 2003).

6.6 Fermentationen auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat

Mit diesen Fermentationen sollte untersucht werden, ob der Ersatz des Hefeextraktes im halbsynthetischen Medium A1-160 durch ein *Escherichia coli*-Zelllysate möglich ist. Dabei wurde neben dem Wachstum besonders auf die Produktbildung geachtet.

Die Herstellung des Lysates erfolgte nach dem in **Kapitel 6.2.4** vorgestellten Verfahren durch einen Hochdruckaufschluss mit anschließender Alkalasebehandlung. Das nach der Lyse geklärte Lysat wurde dann als Ersatz für den Hefeextrakt eingesetzt. Dabei wurde die dem Medium hinzugegebene Lysatmenge so dosiert, dass der ursprünglich durch den Hefeextrakt in das Medium eingebrachte Stickstoff durch die Zugabe von Lysat ersetzt wurde. Die Charakterisierung der in diesem Kapitel verwendeten Lysate lässt sich in **Kapitel 6.5** nachlesen.

Tabelle 6.11 gibt für die drei mit Lysat durchgeführten Fermentationen die Verhältnisse in Bezug auf den Stickstoff und Kohlenstoff zum Startzeitpunkt an. Als Stickstoffquelle sind zu Beginn das Ammoniumsulfat, das Lysat und das zur pH-Werteinstellung hinzudosierte Ammoniakwasser zu nennen. Der Kohlenstoff setzte sich aus der Saccharose und dem Lysat zusammen.

Tabelle 6.11: Stickstoff- und Kohlenstoffmasse vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Hefeextrakt oder Lysat und einem Arbeitsvolumen von 5 L

Fermentation	F55	F57	F58
Stickstoff, analytisch	7,6 g	9,1 g	8,5 g
Stickstoff, analytisch - A1-160	6,7 g - 9,4 g		
Fermentation	F55	F57	F58
Kohlenstoff, analytisch	92,1 g	89,7 g	92,5 g
Kohlenstoff, analytisch - A1-160	88,5 g - 90,7 g		

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass durch die gewählte Dosierung an *Escherichia coli*-Lysat die Anfangsbedingungen in Bezug auf den Kohlenstoff und Stickstoff im Vergleich zu den Kultivierungen auf dem A1-160-Medium mit Hefeextrakt in guter Übereinstimmung standen.

Somit konnten Einflüsse auf den Herstellungsprozess aufgrund anfänglich unterschiedlicher Kohlen- und Stickstoffmassen ausgeschlossen werden.

Es folgt nun zunächst die Auswertung für eine der drei mit Lysat durchgeführten Kultivierungen. Es handelt sich dabei um die Fermentation mit der Nummer 55, im Folgenden mit F55 abgekürzt. Anschließend wird die Reproduzierbarkeit des Prozesses bei Ersatz des Hefeextraktes durch Zellysate durch Vergleich mit weiteren Fermentationen überprüft.

Nach einer kurzen Adaptions- und Beschleunigungsphase von zwei Stunden, die mit denen auf dem A1-160-Medium vergleichbar war, trat die *Escherichia coli*-Kultur in eine erste Phase mit exponentiellem Wachstum ein. Dies war am linearen Kurvenverlauf in der halblogarithmischen Auftragung der optischen Dichte (**Abbildung 6.19**) zu erkennen.

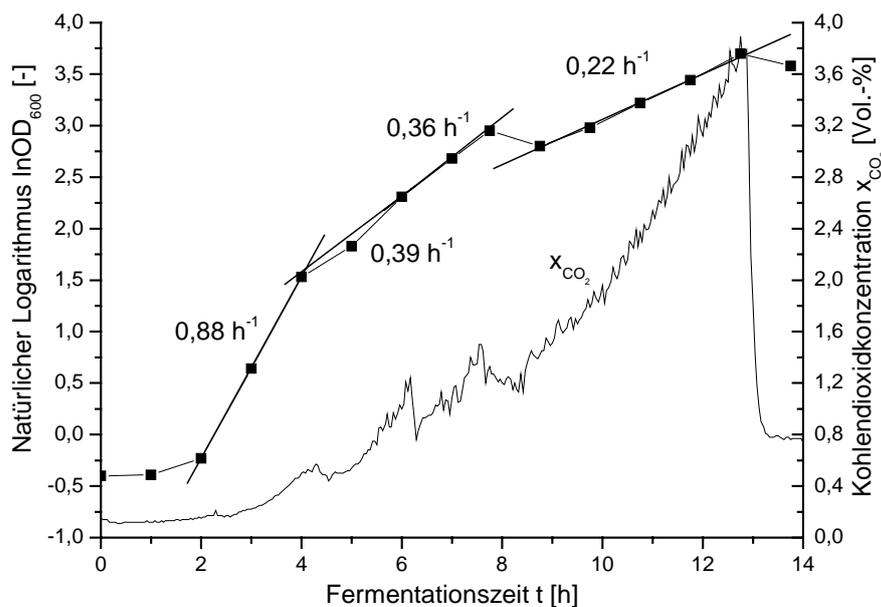


Abbildung 6.19: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat (F55)

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit betrug in diesem Zeitraum $\mu = 0,88 \text{ h}^{-1}$. Das Ende dieser Phase ließ sich durch das Abknicken der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft und dem erneuten Anstieg der Sauerstoffsättigung erkennen (**Abbildung 6.20**). Die CO_2 -Kurve zeigte drei weitere lokale Anstiege mit darauffolgendem Abfall. Jeder dieser Abschnitte stand für das Ende einer weiteren Phase mit exponentiellem Wachstum. Anhand von

Abbildung 6.19 ließ sich diese Aussage bestätigen. Sowohl zwischen 4 Stunden und 6 Stunden, 6 Stunden und 7,75 Stunden als auch zwischen 8,75 Stunden und 12,75 Stunden lagen Bereiche mit konstanter Steigung. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit betrug $0,39 \text{ h}^{-1}$, $0,36 \text{ h}^{-1}$ und $0,22 \text{ h}^{-1}$.

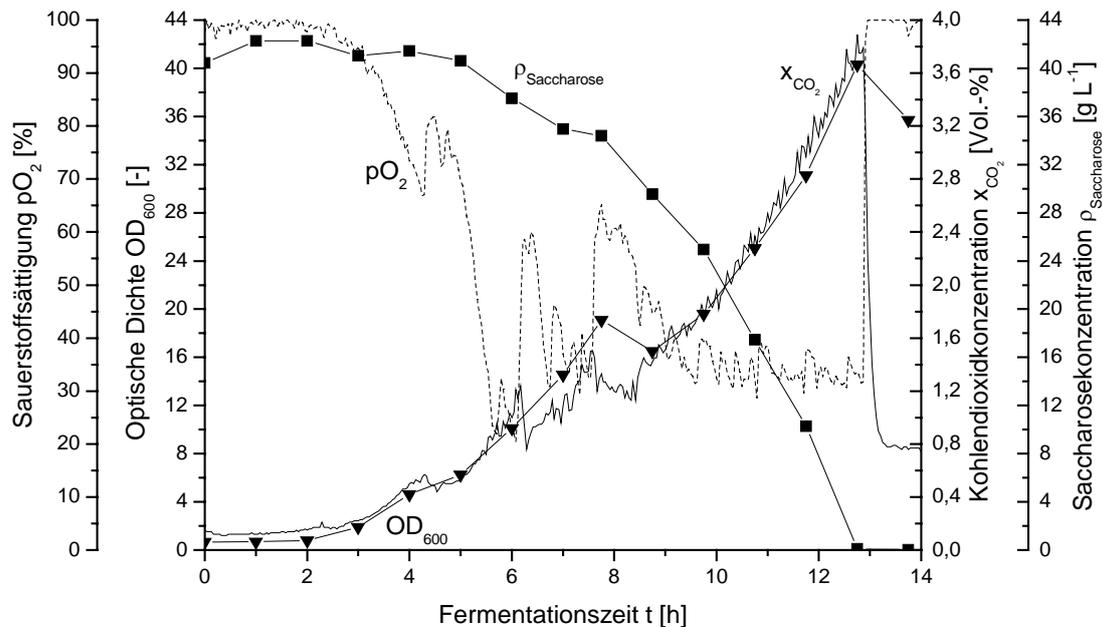


Abbildung 6.20: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat (F55)

Gründe für die aufeinanderfolgenden Wachstumsphasen ließen sich in der Zusammensetzung des Mediums insbesondere des Lysats finden. Durch seine Komplexität wurden sukzessiv verschiedene Inhaltsstoffe in der Reihenfolge des geringsten Aufwands für die Zellen abgebaut. In den ersten Stunden veränderte sich die Saccharosekonzentration aufgrund der geringen Zellzahl und der Anwesenheit anderen Kohlenstoff- und Energiequellen nicht. Der Saccharoseabbau setzte erst nach fünf Stunden ein (**Abbildung 6.21**). Dies entsprach etwa dem Ende der zweiten und dem Beginn der dritten exponentiellen Wachstumsphase. Zunächst wurden andere Komponenten des Mediums zur Biomasse- und Produktbildung herangezogen. Zum einen handelte es sich dabei um die bei der Hitzesterilisation aus der Saccharose freigesetzte Glucose. Diese wurde innerhalb der ersten drei Stunden verstoffwechselt. Zum anderen wurden die durch das Lysat dem Medium zugeführten Aminosäuren innerhalb eines achtstündigen Zeitraums verbraucht (**Abbildung 6.22**). Aminosäuren deren Anfangskonzentrationen unter $0,10 \text{ g L}^{-1}$ lagen, wurden der Übersichtlichkeit wegen in der Grafik nicht berücksichtigt.

Zwischen der fünften und sechsten Stunde begann parallel zu den Aminosäuren der Abbau der Saccharose. Ab der achten Stunde beschleunigte sich aufgrund der hohen Zelldichte und dem Fehlen alternativer Energiequellen deren Abbau, was etwa dem Beginn der letzten exponentiellen Wachstumsphase entsprach. Gleichzeitig stieg die Glucosekonzentration an (**Abbildung 6.21**). Mit fortschreitender Fermentationszeit sanken beide Zuckerkonzentrationen unter die Nachweisgrenze.

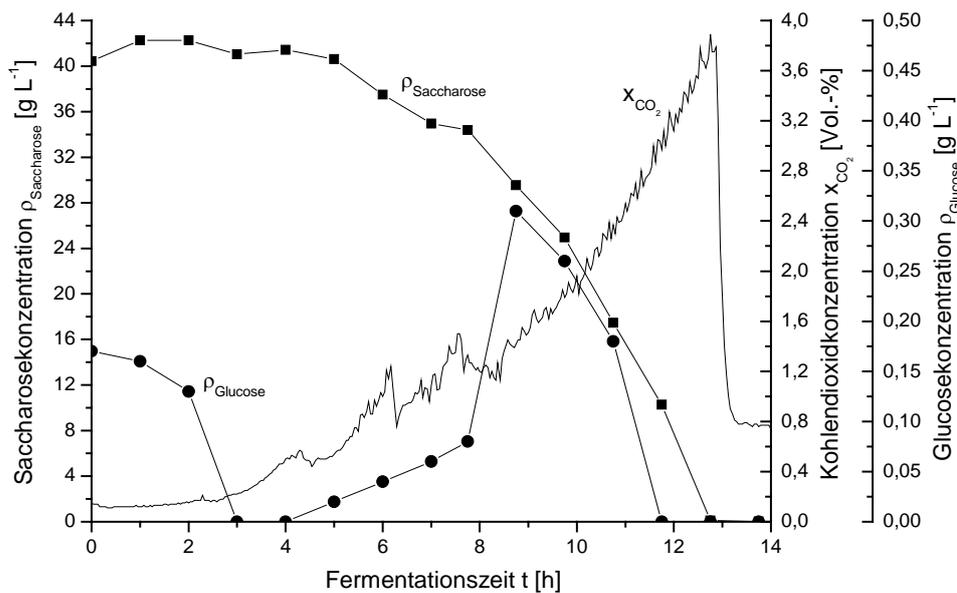


Abbildung 6.21: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat (F55)

Die klare Abtrennung der Wachstumsphasen anhand der verstoffwechselten Kohlenstoffquelle, wie es bei Verwendung von Hefeextrakt der Fall war, zeigt sich hier nicht. Denn bereits vor der vollständigen Reduzierung der Aminosäuren zur achten Stunde kam es bereits zum Abbau der Saccharose nach fünf Stunden.

Mit der vollständigen Verstoffwechslung der Zucker trat die Kultur in die stationäre Phase ein. Die Kohlendioxidkonzentration sank und die Sauerstoffsättigung nahm zu.

Die zuvor festgestellte wachstumsassoziierte Produktbildung trat auch in diesem Fall in Erscheinung. Am Ende der Kultivierung wurde eine Threoninkonzentration von $12,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

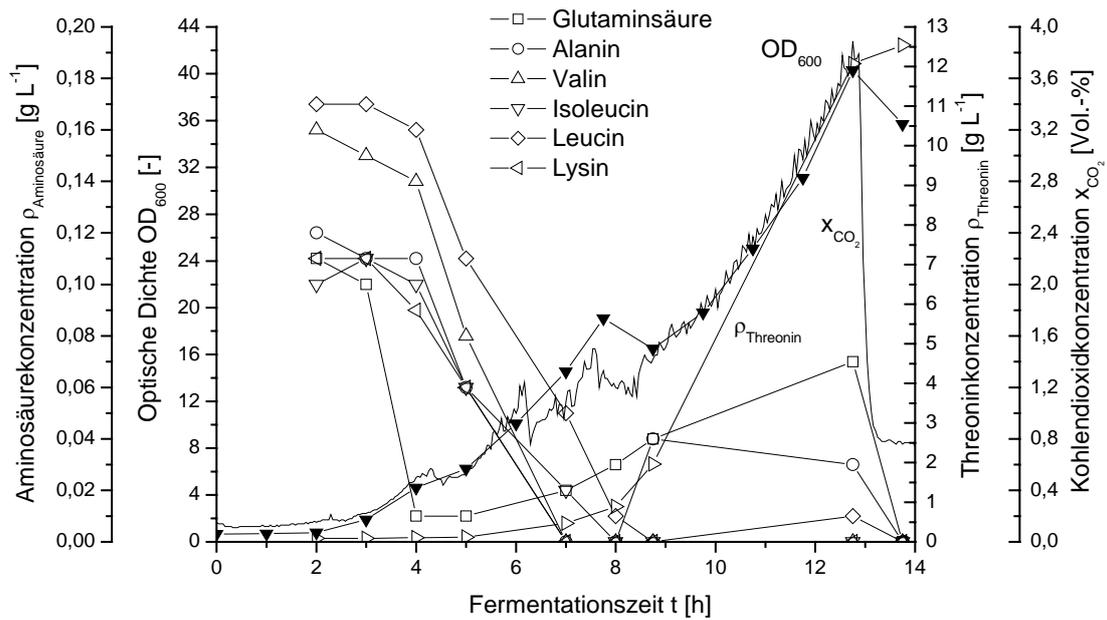


Abbildung 6.22: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat (F55)

Die oben beschriebene Fermentation wurde zur Absicherung der Ergebnisse zweimal wiederholt. Abgekürzt werden diese beiden Kultivierungen durch F57 und F58. Die maximal erreichten optischen Dichten lagen zwischen 36 bis 41 (**Abbildung 6.23**).

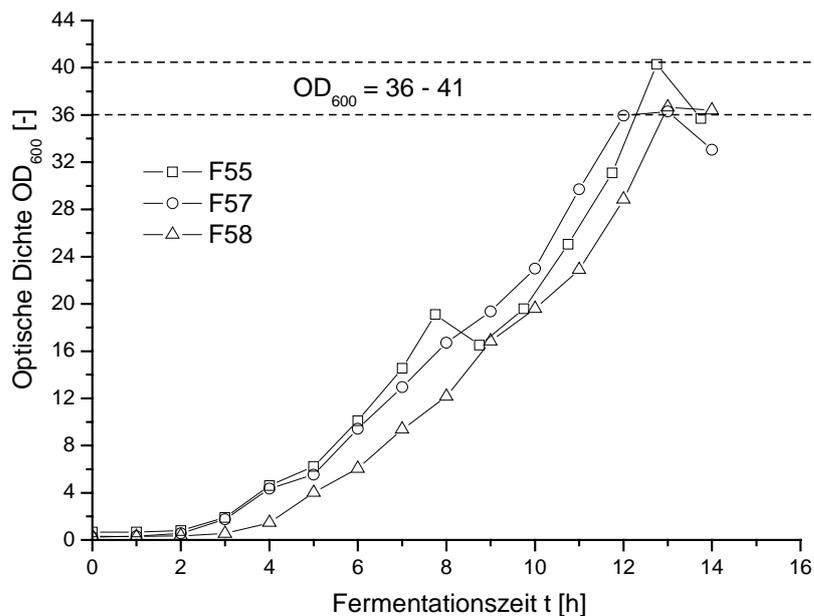


Abbildung 6.23: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat

Auch für F57 und F58 ließen sich anhand der halblogarithmischen Auftragung der optischen Dichte jeweils vier Phasen mit exponentiellem Wachstum erkennen. Jeder dieser Phasen konnte durch den Kohlendioxidkonzentrationsverlauf eindeutig ausgemacht werden. Die bestimmten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten sind zusammen mit den bereits bekannten aus Fermentation F55 in **Tabelle 6.12** aufgeführt. Die in Klammern gesetzten Zeitangaben geben die ungefähre Dauer der jeweiligen Wachstumsphase an. Beide Parameter wiesen eine hohe Übereinstimmung auf. Zum Vergleich sind zusätzlich die Mittelwerte der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten in den drei exponentiellen Phasen der Kultivierungen auf dem A1-160-Medium mit Hefeextrakt aufgeführt.

Tabelle 6.12: Gegenüberstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat. Die in Klammern gesetzten Zeitangaben geben die ungefähre Dauer der Wachstumsphase an

Fermentation	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ [h ⁻¹]			
	F55	0,88 (2 h)	0,39 (2 h)	0,36 (2 h)
F57	1,0 (2 h)	0,39 (2 h)	0,29 (2 h)	0,21 (4 h)
F58	1,0 (2 h)	0,42 (2 h)	0,29 (2 h)	0,21 (4 h)
Mittelwert	0,96 (2 h)	0,40 (2 h)	0,31 (2 h)	0,21 (4 h)
A1-160-Medium mit Hefeextrakt				
Mittelwert	0,92 (2,8 h)	0,44 (2,4 h)	0,31 (4,9 h)	

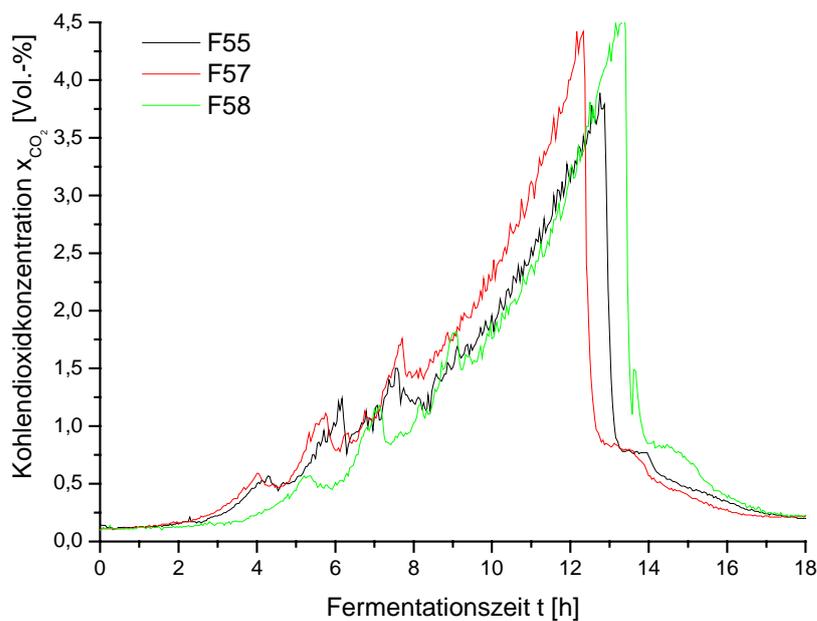


Abbildung 6.24: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat

Ein Blick auf **Abbildung 6.24** zeigt auch auf Seite der Kohlendioxidkonzentration eine große Übereinstimmung der Ergebnisse. Leichte Unterschiede in den Kurvenverläufen zwischen F55, F57 und F58 ließen sich damit erklären, dass für die Herstellung der Lysate zwar dasselbe Verfahren gewählt wurde, aber es sich um zwei verschiedene Lyseansätze handelte. Auch die Zugabemenge an Lysat variierte leicht.

In **Abbildung 6.25** sind u. a. die Ergebnisse der Threoninbestimmung dargestellt. Fermentation F57 führte zu einer Konzentration von $11,7 \text{ g L}^{-1}$ und F58 zu $11,1 \text{ g L}^{-1}$.

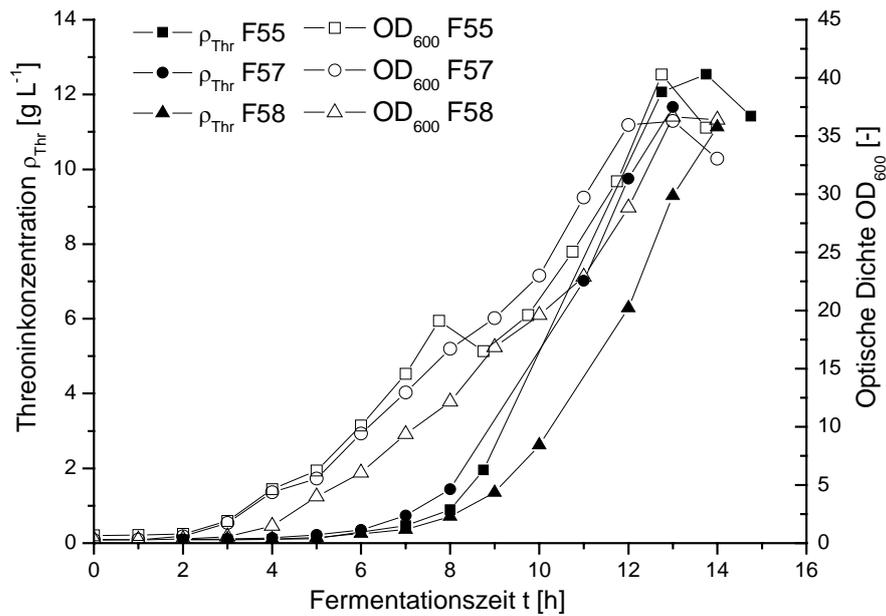


Abbildung 6.25: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat

Nachdem nun die Reproduzierbarkeit des Prozesses bei Verwendung von *Escherichia coli*-Lysat als Ersatz für den Hefeextrakt im halbsynthetischen A1-160-Medium gezeigt werden konnte, soll nun ein Vergleich mit den unter **Kapitel 6.3** vorgestellten Fermentationen auf dem A1-160-Medium mit Hefeextrakt erfolgen. Dazu wird zunächst generell auf wichtige Prozessgrößen wie die Produktivität und verschiedene Ertragskoeffizienten eingegangen.

Aus **Tabelle 6.13** und **Tabelle 6.14** lassen sich wichtige Prozessgrößen der Kultivierungen auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat entnehmen. Eine wichtige Prozessgröße ist die Threoninproduktivität. Diese lag bei Verwendung von Lysat als Ersatz für den Hefeextrakt bei Werten zwischen $0,86 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,98 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der Vergleich mit den Werten auf dem A1-160-Medium zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Produktivität.

Tabelle 6.13: Gegenüberstellung wichtiger Prozessgrößen für die satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat

	Fermentationsdauer t [h]	Optische Dichte OD ₆₀₀ [-]	Biotrockenmasse- konzentration BTM [g L ⁻¹]	Threonin- konzentration ρ _{Thr} [g L ⁻¹]	Threonin- produktivität P [g L ⁻¹ h ⁻¹]
A1-160	12,00 - 15,25	31,11 - 37,90	10,8 - 12,7	11,47 - 13,40	0,79 - 1,02
F55	12,75	40,3	12,2	12,50	0,98
F57	13,00	36,3	11,0	11,67	0,90
F58	13,00	36,7	11,1	11,13	0,86

Die Ertragskoeffizienten zeigten, dass pro Gramm Biomasse etwa 1,03 g Threonin gebildet wurden ($Y_{P/X}$ zwischen 1,00 g g⁻¹ und 1,06 g g⁻¹). Für die substratabhängigen Koeffizienten ergaben sich Bereiche zwischen 0,27 - 0,31 g g⁻¹ für $Y_{X/S}$ und 0,28 - 0,31 g g⁻¹ für $Y_{P/S}$. Das heißt, dass rechnerisch sowohl für die Bildung eines Gramms Biomasse als auch für die Synthese eines Gramms Threonin 3 g Saccharose benötigt wurden.

Die verschiedenen Ertragskoeffizienten lagen im Vergleich zu den Fermentationen auf dem unveränderten A1-160-Medium mit Hefeextrakt im gleichen Bereich. Auch anhand dieser Parameter ließen sich keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum oder die Produktbildung erkennen.

Tabelle 6.14: Gegenüberstellung wichtiger Prozessgrößen für die satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat (X: Biotrockenmasse, P: Threonin, S: Saccharose)

	Ertragskoeffizient $Y_{P/X}$ [g g ⁻¹]	Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ [g g ⁻¹]	Ertragskoeffizient $Y_{P/S}$ [g g ⁻¹]
A1-160	0,97 - 1,14	0,27 - 0,32	0,29 - 0,34
F55	1,02	0,31	0,31
F57	1,06	0,27	0,29
F58	1,00	0,28	0,28

Aus **Abbildung 6.26** geht der Verlauf der Threoninkonzentration während jeweils drei Fermentationen mit Hefeextrakt und *Escherichia coli*-Zelllysate hervor. Ein Unterschied konnte nicht festgestellt werden.

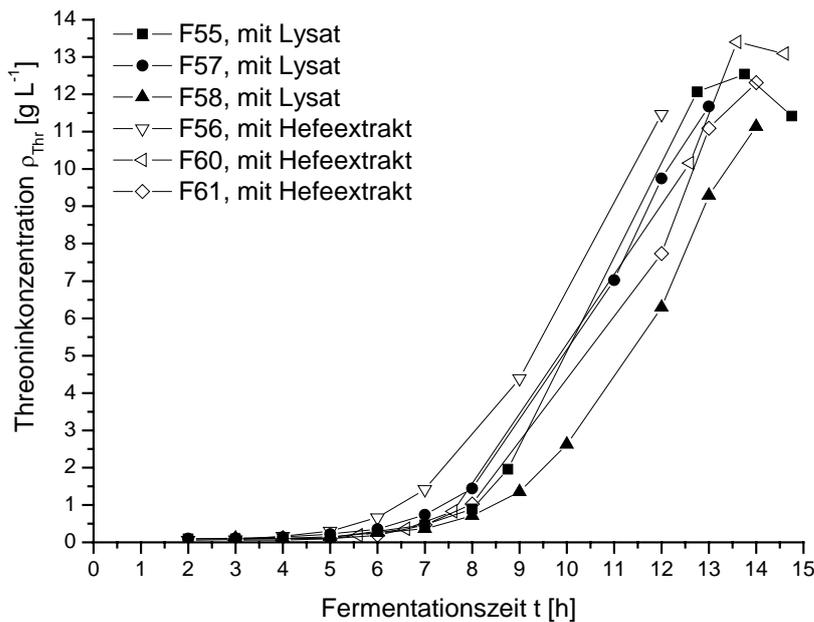


Abbildung 6.26: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat

Im Folgenden soll noch auf einen Unterschied im Wachstum der Zellen bei Verwendung von Lysat und Hefeextrakt eingegangen werden.

Es fiel auf, dass in der letzten exponentiellen Wachstumsphase die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit mit durchschnittlich $0,21 \text{ h}^{-1}$ (**Tabelle 6.12**) geringer ausfiel als bei den Kultivierungen auf dem A1-160-Medium mit Hefeextrakt. Dort wurden für diese Phase, in der die Saccharose abgebaut wurde, Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen $0,28 \text{ h}^{-1}$ und $0,33 \text{ h}^{-1}$ (**Tabelle 6.2**) erreicht. Die geringere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in der Phase ließ sich damit erklären, dass wichtige Verbindungen für den Stoffwechsel bereits in den ersten Wachstumsphasen verbraucht wurden. Folglich wirkten diese in den letzten Stunden der Fermentation limitierend und führten dazu, dass auf Saccharose keine höhere Wachstumsgeschwindigkeit zu erreichen war. In der ersten Hälfte der Fermentation bei Verwendung von Lysat traten drei exponentielle Wachstumsphasen mit hohen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten auf. Das führte dazu, dass die Zellzahl in diesem Zeitraum stärker anstieg als auf dem A1-160-Medium mit Hefeextrakt. In **Abbildung 6.27** ist dies durch den Vergleich typischer OD_{600} -Verläufe zu erkennen. Bei der Auftragung wurden alle Kurven adaptionphasenkoriigiert aufgetragen. Durch die niedrigere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in der letzten Phase glichen sich die maximalen Zelldichten bis zum Erntezeitpunkt wieder an.

Gründe für die höhere Biomassebildung in der ersten Fermentationshälfte, in der es u. a. zur Verstoffwechslung der Aminosäuren kam, konnten mit der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung der komplexen Komponenten (Hefeextrakt oder *E. coli*-Lysat) gefunden werden.

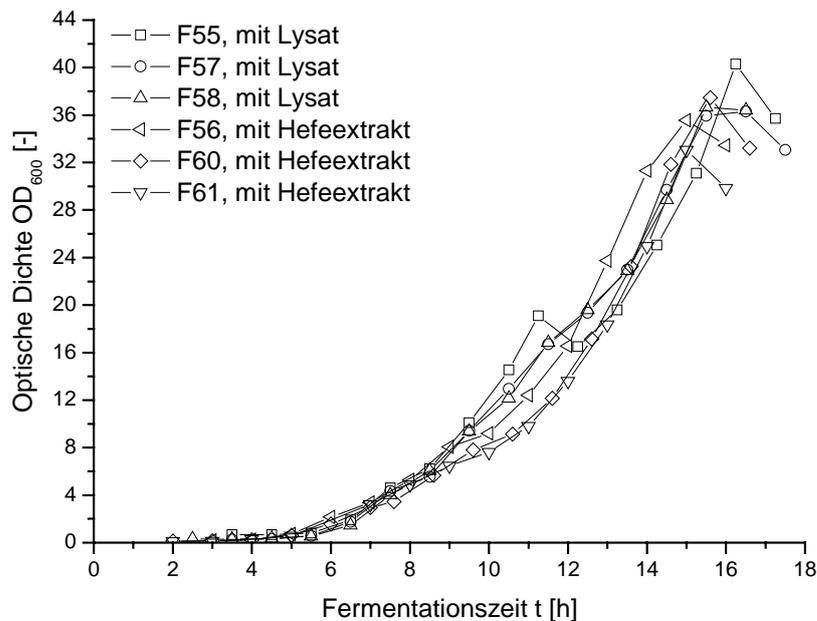


Abbildung 6.27: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat. Die Kurven wurden adaptionsphasenkorrigiert aufgetragen.

Abbildung 6.28 zeigt, dass die höhere optische Dichte in der ersten Hälfte auch anhand des höheren Kohlendioxidausstoßes zu erkennen ist. Außerdem lässt sich erkennen, dass die Einteilung der Wachstumsphasen nach der verstoffwechselten Kohlenstoffquelle bei der Verwendung von Lysat nicht mehr eindeutig möglich war. Bei der Kultivierung mit Hefeextrakt als komplexe Nährstoffquelle traten drei charakteristische und abgrenzbare Wachstumsphasen auf, in denen sukzessiv die Glucose, die Aminosäuren und die Saccharose verstoffwechselt wurde. Im Vergleich dazu verschwimmen die Grenzen zwischen der Aminosäure- und Saccharoseverstoffwechslung bei der Verwendung von Lysat. Die letzte Wachstumsphase, in der ausschließlich die Saccharose als Kohlenstoffquelle diente, wurde eine höhere Zelldichte erreicht als es auf dem A1-160-Medium der Fall war. Jedoch wurde die Saccharosekonzentration in der Phase davor auch bereits reduziert. Nach acht Stunden waren die Aminosäuren

vollständig verstoffwechselt und die Zellen mussten auf Saccharose als alleinige C-Quelle umstellen, was sich am Abknicken des CO₂-Signals zu diesem Zeitpunkt zeigte.

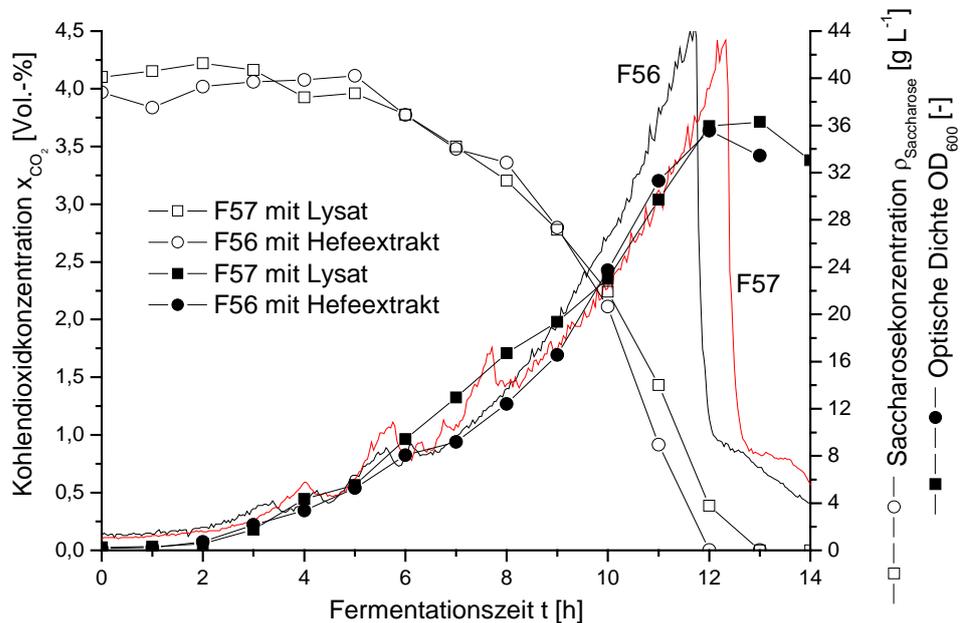


Abbildung 6.28: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit und ohne Lysat

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dem halbsynthetischen A1-160-Medium der Ersatz des Hefeextraktes durch ein *Escherichia coli*-Lysat möglich war. Weder das Wachstum noch wichtige Prozessgrößen wie die Produktivität und verschiedene Ertragskoeffizienten ließen negative Effekte erkennen. Auf den Einsatz des konventionellen Hefeextraktes konnte vollständig verzichtet werden.

6.7 Rückführung der Biomasse über mehrere Zyklen

Ziel dieser Fermentationen war es herauszufinden, inwieweit die Erhöhung des Anteils des *Escherichia coli*-Lysates bei der Rückführung in den Fermentationsprozess eine Veränderung im Wachstum und in der Produktbildung verursachte.

Begonnen wurde mit einer Fermentation auf A1-160-Medium. Die aus dieser Fermentation gewonnene Biomasse wurde der Lyse zugeführt und der gesamte durch die Lyse in Lösung gebrachte Anteil als Ersatz für den Hefeextrakt im nächsten Fermentationsschritt eingesetzt. Die in das Medium eingebrachte Kohlenstoff- und Stickstoffmasse wurde dadurch im Vergleich zum A1-160-Medium mit Hefeextrakt erhöht. **Tabelle 6.15** zeigt die zu Beginn der Kultivierungen vorliegende Kohlen- und Stickstoffmasse. Diese setzte sich entweder aus den Kohlenstoffanteilen der Saccharose und der Lysate bzw. bei der ersten Fermentation aus der des Hefeextrakts (0. Zyklus) zusammen oder aus den Stickstoffanteilen des Ammoniumsulfats, des Ammoniakwassers und der Lysate bzw. bei der ersten Fermentation aus der des Hefeextrakts. Die anfänglich im A1-160 vorgelegte Kohlenstoffmasse stieg von 88,8 g bis auf 109,2 g (4. Zyklus) und die anfänglich im A1-160 vorgelegte Stickstoffmasse stieg von 8,8 g bis auf 11,5 g (4. Zyklus).

Tabelle 6.15: Darstellung der anfänglichen Kohlenstoff- und Stickstoffmasse bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* auf dem A1-160-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 5 L. Die erste Fermentation fand unter Einsatz von Hefeextrakt statt (0. Zyklus)

Zyklus	Kohlenstoff, analytisch	Stickstoff, analytisch
0. Zyklus	88,5 g - 90,7 g (Mittelwert: 88,8 g)	6,7 g - 9,4 g (Mittelwert: 8,8 g)
1. Zyklus	100,6 g	10,2 g
2. Zyklus	104,3 g	10,7 g
3. Zyklus	109,2 g	11,5 g
4. Zyklus	112,2 g	11,7 g

Ein weiterer Grund für die Zunahme des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes bei fortschreitender Zykluszahl neben der Rückführung des gesamten Lysates war, dass die Verwendung

von Lysat zu einer erhöhten Biomassebildung führte, so dass für die Lysen mehr Biomasse zur Verfügung stand.

Abbildung 6.29 fasst die wichtigsten Ergebnisse der vier zyklischen Rückführungen zusammen. Durch das erhöhte Angebot an Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nahm die Zelldichte mit steigender Zyklusanzahl zu. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zunahme der Zelldichte in der ersten Fermentationshälfte, in der die Aminosäuren des Lysats verstoffwechselt wurden, am größten war. Dieses zeigte sich bereits in geringerem Umfang in **Kapitel 6.6** bei der partiellen Rückführung. Wie **Abbildung 6.30** erkennen lässt, erhöhte sich das Zellwachstum bereits im ersten Zyklus und trat im vierten Zyklus am deutlichsten hervor. Jedoch konnte die erhöhte Biomassebildung nicht in eine erhöhte Produktkonzentration umgesetzt werden. Die Threoninkonzentration blieb auf einem Niveau von ca. $12,0 \text{ g L}^{-1}$. Dies führte zwar durch die unveränderten Kultivierungszeiten und Threoninkonzentrationen zu gleichbleibenden Produktivitäten von $0,89 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis $1,07 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, jedoch erhöhte sich der anfallende Biomasseabfall deutlich. Vermutlich wurde aufgrund der hohen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten in der ersten Fermentationshälfte die Threoninproduktion in der Zelle unterdrückt.

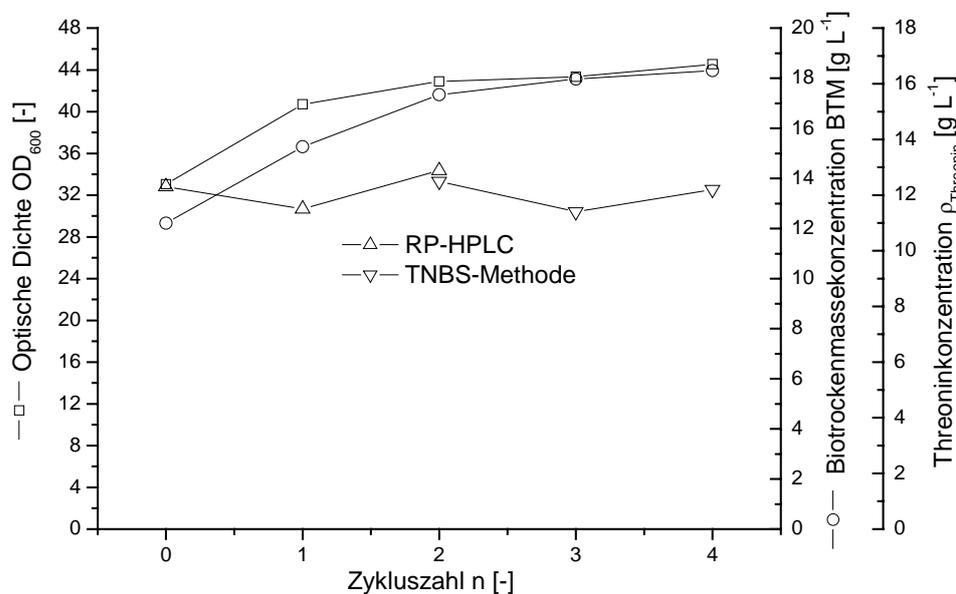


Abbildung 6.29: Auftragung der maximal erreichten Zelldichten und der Threoninkonzentration beim Versuch zur zyklischen Rückführung der Biomasse von *Escherichia coli*. Der 0. Zyklus wurde ohne Lysat auf A1-160-Medium durchgeführt. Die Threoninkonzentration wurde entweder durch RP-HPLC oder mit der TNBS-Methode bestimmt.

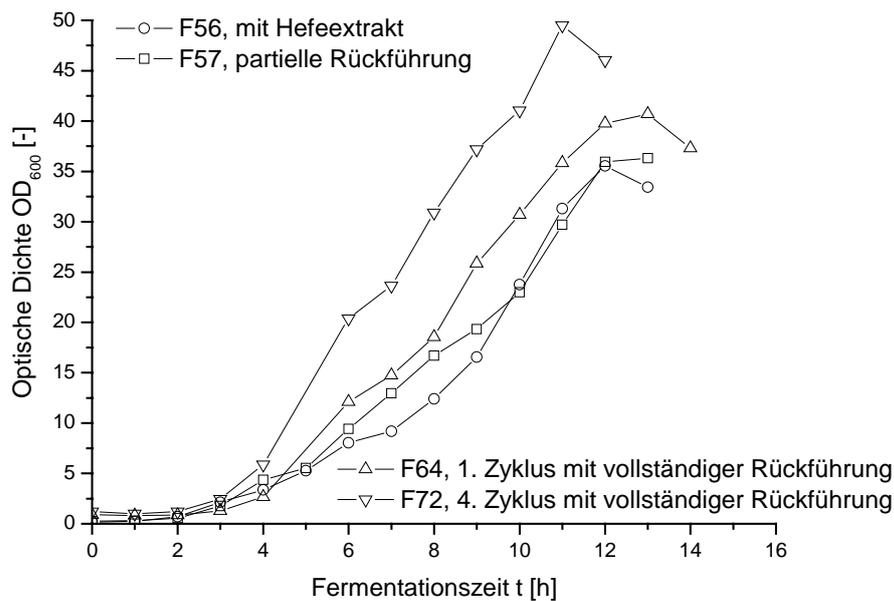


Abbildung 6.30: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 ohne (F56) und mit Lysat (F57, F64 und F72)

Abbildung 6.31 zeigt einige Parameter für den 1. Zyklus bei Rückführung der gesamten Lysatmenge. Er steht stellvertretend für die drei folgenden Zyklen. Wieder zeigte sich, dass jeder Anstieg der CO₂-Kurve einer Phase mit exponentiellem Wachstum entsprach. Der lineare Bereich zwischen der dritten und sechsten Stunde entsprach der ersten Wachstumsphase. Hier wurde eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von $0,75 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Zwischen dieser ersten und der nachfolgenden Phase kam es zu einem starken Abfall der Kohlendioxidkonzentration. Dieser ließ sich auch anhand der optischen Dichte ausmachen. Die Umstellung des Stoffwechsels auf Saccharose als Hauptkohlenstoffquelle führte zu dieser knapp einstündigen Phase mit nur geringem Wachstum. Bei geringerer Lysatzugabe, wie bei F55, F57 und F58, kam es nicht zu dieser langen Adaptionsphase. Im anschließenden Wachstumsabschnitt betrug die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit $\mu = 0,28 \text{ h}^{-1}$. In der letzten Phase wurde eine Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Damit lag sie um die Hälfte niedriger im Vergleich zum A1-160-Medium mit Hefeextrakt.

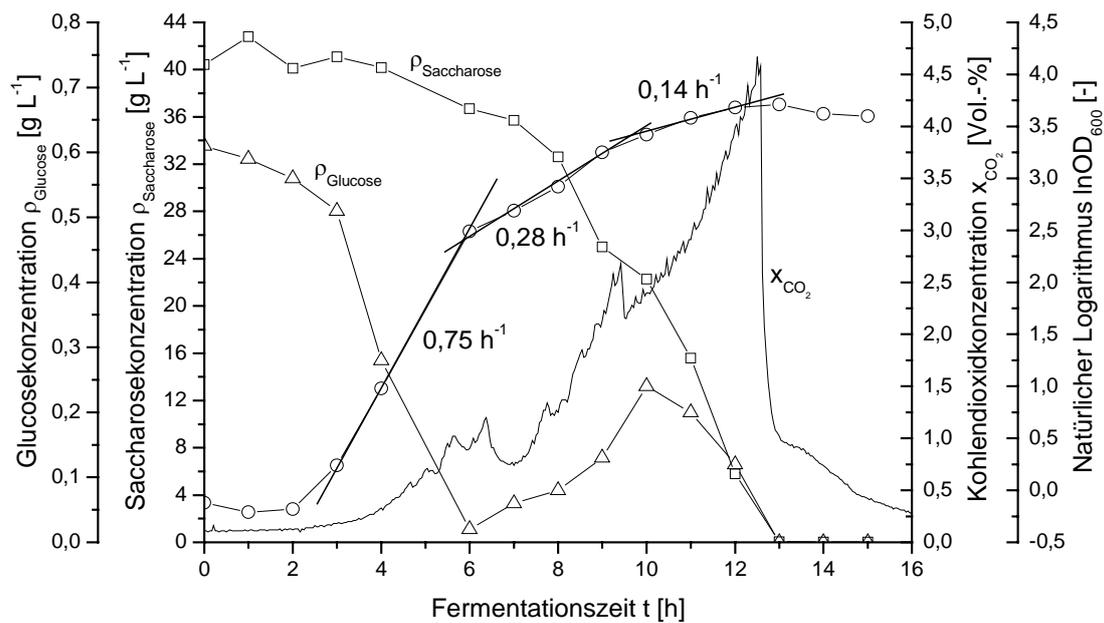


Abbildung 6.31: Satzweise Kultivierung von *Escherichia coli* B-3996 auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Lysat (F64)

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse stehen zum Teil in Konflikt mit den Ansprüchen dieser Arbeit, die sich u. a. zum Ziel gesetzt hatte, bakterielle Abfallmengen zu reduzieren und damit die Ökonomie des Prozesses durch Einsparungen bei den Entsorgungskosten zu erhöhen. Die Rückführung des gesamten anfallenden Lysats führte zur Erhöhung des Biomasseaufkommens durch höhere Zelldichten. Die Produktbildung wurde jedoch nicht negativ beeinflusst. Im vorherigen Kapitel konnte aber bereits erfolgreich gezeigt werden, dass die Rückführung eines Teils der Biomasse in Form von Lysat ohne negativen Einfluss auf die Produktivität und die Ertragskoeffizienten möglich ist.

6.8 Zusammenfassung

Der für die Untersuchungen zur Biomasserückführung herangezogene *Escherichia coli* B-3996 Stamm ist ein Organismus zur Produktion der essentiellen Aminosäure *L*-Threonin. Verwendung findet Threonin z. B. in der Lebensmittelindustrie sowie als Futtermitteladditiv in der Nutztierhaltung.

Die im kleinen Maßstab durchgeführten Lyseversuche bedienten sich chemischer, mechanischer und biochemischer Methoden und führten zur Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zur Behandlung des anfallenden Biomasseabfalls. Die verwendete Biomasse wurde durch Kultivierungen auf dem halbsynthetischen A1-160-Medium gewonnen. Mit dem entwickelten Aufschluss, der sich aus einem mechanischen Hochdruckaufschluss und einer nachgeschalteten enzymatischen Behandlung durch eine Protease zusammensetzt, konnte ein Verfahren gefunden werden, das der gestellten Forderung nach einem effizienten Verfahren bei gleichzeitiger Möglichkeit der Verarbeitung großer Stoffströme gerecht wird. Die erreichten Lysegrade lagen bei 75 %. Der Einsatz der Proteaselösung (Novozymes, Alcalase[®] 2.4 L FG) konnte auf unter 1 Liter pro Tonne Biotrockenmasse gesenkt werden.

Zahlreiche Fermentationen des *Escherichia coli*-Stammes auf dem halbsynthetischen Medium A1-160 mit Saccharose als Hauptkohlenstoffquelle und Hefeextrakt als komplexe Komponente führten zu einer Vielzahl von Daten. Mit deren Hilfe konnte das System ausreichend charakterisiert werden. Drei typische Wachstumsphasen traten auf, in denen sukzessiv die Glucose, die Aminosäuren und die Saccharose verstoffwechselt wurden. Die spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten dieser Phasen lagen bei $0,92 \text{ h}^{-1}$, $0,44 \text{ h}^{-1}$ und $0,31 \text{ h}^{-1}$. Mit Hilfe einer Kohlenstoffbilanzierung konnte festgestellt werden, dass der zu Beginn vorgelegte Kohlenstoff am Ende der Fermentation zu 32,1 % in der Biomasse, zu 34,1 % in der Abluft, zu 7,8 % im Medium und zu 28,3 % im Threonin vorlag. Die Bilanzierung des Stickstoffs wurde durch den Einsatz von Ammoniakwasser als Base erschwert. Jedoch zeigte sich, dass die Zuführung einer externen Stickstoffquelle in Form des Ammoniakwassers für die Biomassen- und Produktbildung essentiell war. Die in Bezug auf das Threonin erzielten Produktivitäten lagen zwischen $0,79 - 1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Ertragskoeffizienten zeigten, dass pro Gramm Biomasse etwa $1,07 \text{ g Threonin}$ gebildet wurden ($Y_{P/X}$ zwischen $0,97 - 1,19 \text{ g g}^{-1}$). Für die substratabhängigen Koeffizienten ergaben sich Werte zwischen $0,27 - 0,32 \text{ g g}^{-1}$ für $Y_{X/S}$ und $0,29 - 0,34 \text{ g g}^{-1}$ für $Y_{P/S}$.

Durch eine eingehende Lysatanalytik konnten die Lysate ausreichend charakterisiert werden. Einen Vergleich der Zusammensetzung der Lysate mit denen verschiedener konventionell erhältlicher komplexer Substrate rundeten diesen Teil der Arbeiten ab. Die *Escherichia coli*-Lysate wiesen einen Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt zwischen 34,5 - 49,9 %TS bzw. zwischen 8,1 - 13,1 %TS auf. Der DNA-Gehalt der Lysate lag zwischen 1,8 - 2,5 %TS. Die Proteinkonzentration erreichte Werte zwischen 0,13 - 0,22 %TS und der Aminosäuregehalt lag bei 36,1 %TS. Acetat konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Einsatz von *Escherichia coli*-Lysat wurde in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Der Ersatz der ursprünglich durch den Hefeextrakt in das Medium eingetragene Stickstoff- und Kohlenstoffmasse durch Lysat führte zu keinen negativen Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung. Die in Bezug auf das Threonin erzielten Produktivitäten lagen zwischen 0,86 - 0,98 g L⁻¹ h⁻¹. Die bestimmten Ertragskoeffizienten zeigten, dass pro Gramm Biomasse etwa 1,03 g Threonin gebildet wurden ($Y_{P/X}$ zwischen 1,00 - 1,06 g g⁻¹). Für die substratabhängigen Koeffizienten ergaben sich Bereiche zwischen 0,27 - 0,31 g g⁻¹ für $Y_{X/S}$ und 0,28 - 0,31 g g⁻¹ für $Y_{P/S}$.

Die Rückführung der gesamten durch die Lyse in Lösung gegangenen Masse führte hingegen zu einer vermehrten Biomassebildung verbunden mit einer unveränderten Threoninkonzentration und Produktivität im Vergleich zu den Kultivierungen auf dem A1-160-Medium mit Hefeextrakt. Dieser Versuchsabschnitt war damit nur teilweise erfolgreich, da das Ziel der Arbeit u. a. die Reduzierung von Abfallmengen war.

Durch die Arbeiten mit dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* B-3996 konnte an einem weiteren interessanten und industrienahen Beispielsystem erfolgreich die Möglichkeit einer alternativen Verwendung bakterieller Biomasse gezeigt werden. Durch das im Vergleich zum in **Kapitel 4** vorgestellten System mit *Klebsiella planticola* wurde hier eine weitere wichtige Messgröße, die Threoninkonzentration, zur Beurteilung hinzugezogen. Dadurch konnte der Einfluss der Rückführung auf die Produktbildung in dem betrachteten Fall geklärt werden.

7 Ergebnisse und Diskussion - *Bacillus licheniformis* P300

7.1 Biomassegewinnung

Das Ziel dieser Fermentationen lag in der Gewinnung von *Bacillus licheniformis*-Biomasse für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab. Dazu wurden zwei Kultivierungen auf HSG-Medium in einem 7 L und 30 L Rührkesselreaktor durchgeführt.

Abbildung 7.1 zeigt einen Teil der online aufgenommenen Daten der Fermentation zur Biomasseerzeugung. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte lediglich am Ende der Kultivierung durch Trübungsmessung. Außerdem wurde durch lichtmikroskopische Betrachtung und Überprüfung auf die Abwesenheit der *L*-Alanin-Aminopeptidase eine Kontamination ausgeschlossen. Eine weitere Probennahme fand nicht statt. Das nach der Zellernte erhaltene Pellet wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

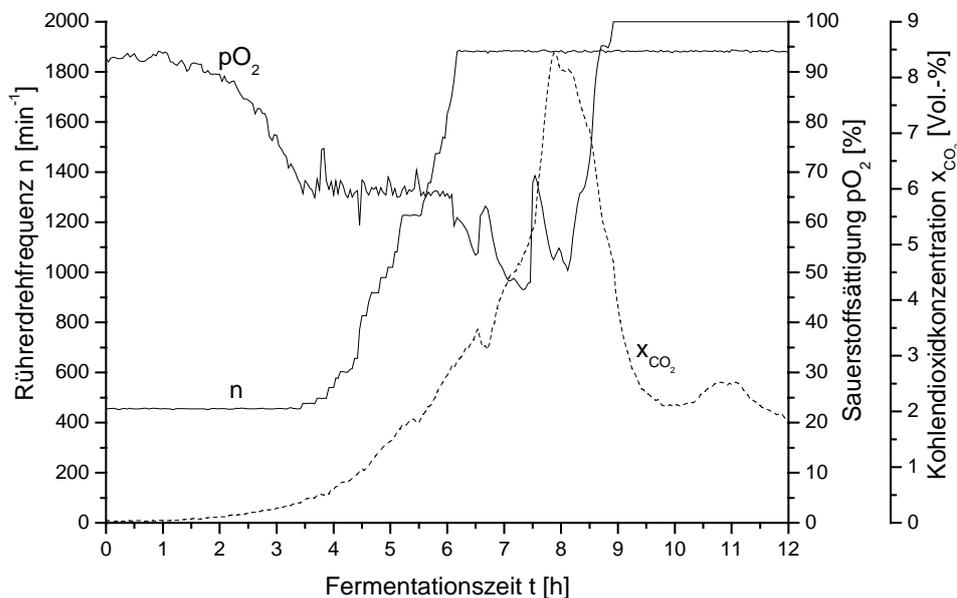


Abbildung 7.1: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf HSG-Medium

7.2 Lyseversuche

Ein Hauptziel der Lyseversuche lag darin eine geeignete Methode für die Lyse der *Bacillus licheniformis*-Zellen zu finden. Die Auswahl der eingesetzten Aufschlussverfahren konzentrierte sich in Hinblick auf den Durchsatz großer Stoffströme ausschließlich auf solche Methoden, die für den großtechnischen Maßstab geeignet sind.

Bei der Auswahl der Lyseverfahren wurden in Hinblick auf den Ersatz verschiedener Komponenten des Mediums zwei Strategien verfolgt.

Zum einen sollte mit den ersten Versuchen ein möglichst großer Anteil der langkettigen Zellinhaltsstoffe wie Proteine und Nukleinsäuren durch Reduzierung ihrer Kettenlänge in Lösung gebracht werden. Dazu wurde z. B. mit der Autolyse eine schonende Möglichkeit des Aufschlusses gewählt. Durch sie sollten wichtige Wachstumsfaktoren wie Aminosäuren freigesetzt werden und Vorstufen für Coenzyme und die Coenzyme selbst erhalten bleiben. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, das Maisquellwasser als wichtigsten Wachstoffsstofflieferanten im Medium zu ersetzen. Eine entscheidende Rolle beim Abbau der Proteine zu niedermolekularen Bausteinen spielte die zelleigene Protease Subtilisin. Durch die gewählten milden Lysebedingungen sollte ihre Aktivität erhalten bleiben.

Zum anderen sollte mit der alkalischen Hydrolyse ein Verfahren eingesetzt werden, bei dem durch die Wahl der Lysebedingungen zwar ein Zellaufschluss stattfindet, jedoch ein Abbau der Proteine nicht eintritt. In der Literatur werden für die Lyse von Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen (pH = 11,5 - 12,5) bereits 20 - 30 Minuten als ausreichend beschrieben (Stanbury & Whitaker, 1984; Schütte & Kula, 1990). Jedoch werden für die alkalische Totalhydrolyse von Proteinen Temperaturen von 110 °C und Haltezeiten von 18 bis 70 Stunden vorgeschlagen (Kellermann, 1998a). Ergebnisse mit den Gram-negativen Stämmen *Klebsiella planticola* und *Escherichia coli* B-3996 zeigten, dass durch eine alkalische Hydrolyse hohe Lysegrade bei gleichzeitig hoher Proteinkonzentration erreicht werden konnten. Dies führte bei der Hitzesterilisation zur Präzipitation der Proteine und damit zu einer unlöslichen Stickstoffquelle. Dieses soll sich nun in dem hier untersuchten System zu Nutze gemacht werden, da eine feste Stickstoffquelle für die Expression und Sekretion der Protease eine entscheidende Rolle spielt. Es eröffnete sich somit die Möglichkeit, einen Teil der organischen Stickstoffquelle (Sojamehl oder Caseinat) zu ersetzen.

7.2.1 Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes für die *Bacillus licheniformis*-Zellen bei Verwendung des Hochdruckhomogenisators

Das Ziel dieses Versuches lag in der Ermittlung der optimalen Passagenanzahl und des optimalen Aufschlussdruckes für die *Bacillus licheniformis*-Zellen bei Einsatz des Hochdruckhomogenisators.

Der Aufschluss wurde indirekt über den auf die Feststoffkonzentration bezogenen Lysegrad verfolgt. Es wurde mit einer Biotrockenmassekonzentration von $21,5 \text{ g L}^{-1}$ gearbeitet. **Abbildung 7.2** zeigt die Veränderungen des Lysegrades in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagen durch den Hochdruckhomogenisator.

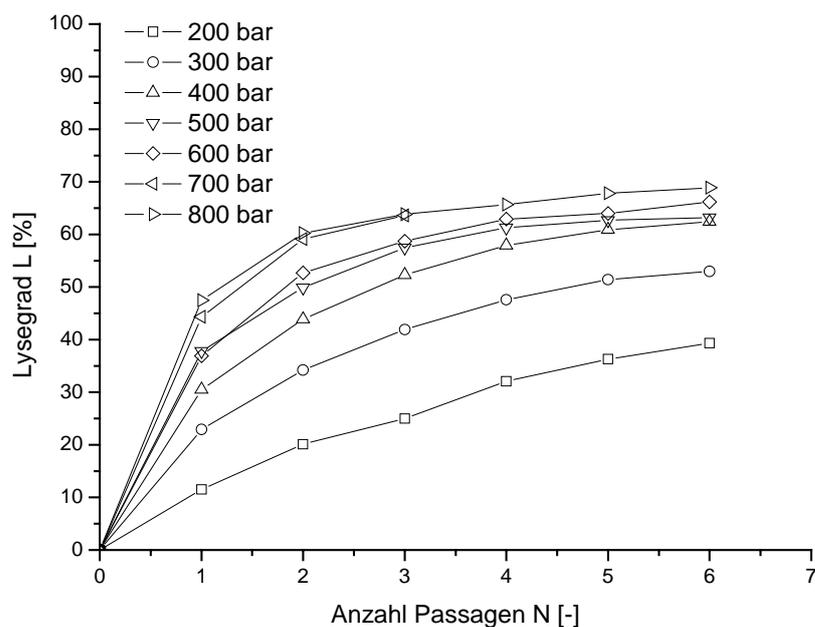


Abbildung 7.2: Hochdruckaufschluss von *Bacillus licheniformis* bei unterschiedlichen Aufschlussdrücken (Biotrockenmassekonzentration $21,5 \text{ g L}^{-1}$)

Der Lysegrad nahm durch in Lösung gehen von Zellbestandteilen im gesamten Verlauf zu. Wie zu erkennen ist, führten während der ersten Passage höhere Drücke zu höheren Lysegraden (11,5 % bei 200 bar gegenüber 47,5 % bei 800 bar). Jedoch glichen sich die Ergebnisse im Druckbereich von 400 bar bis 800 bar mit zunehmender Passagenanzahl an. Nach dem

dritten Durchlauf kam es im oberen Druckbereich nur noch zu geringen Veränderungen. Während des Aufschlusses nahm die Viskosität aufgrund von freigesetzten Nukleinsäuren deutlich zu. Zusätzlich konnte eine Klärung der Zellsuspension beobachtet werden. Ein Arbeitsdruck von 200 bar führte zu keinem effektiven Aufschluss der Zellen (sechs Passagen, Lysegrad 39,3 %).

Für zukünftige Hochdruckaufschlüsse wurden zwei Kombinationen gewählt: Zum einen eine Passage bei 800 bar und zum anderen drei Passagen bei 400 bar. Beides führte zu einem Lysegrad von etwa 50 %.

7.2.2 Autolyse unter Variation des pH

Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, ob es möglich ist, die *Bacillus licheniformis*-Zellen nur durch thermische Behandlung bei verschiedenen pH-Werten zur Lyse zu veranlassen. Dabei sollten neben den Proteinen auch langkettige Kohlenhydrate, Lipide und Nukleinsäuren einem enzymatischen Abbau zu kürzeren Einheiten unterliegen. Es wurden fünf Schüttelkolben in einem pH-Bereich von 7,0 bis 9,0 untersucht. Die Biotrockenmassekonzentration betrug $24,1 \text{ g L}^{-1}$. Das Temperaturprogramm wurde so gewählt, dass die Temperatur, ausgehend von $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, jede Stunde um $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht wurde. Die maximale Temperatur wurde auf $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ festgelegt, da davon ausgegangen wurde, dass höhere Temperaturen zu einer abnehmenden enzymatischen Aktivität führen und die Gefahr der Denaturierung der Proteine steigt. Durch das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturen sollten die Temperaturoptima vieler an der Autolyse beteiligter Enzyme erreicht werden.

Abbildung 7.3 und **Abbildung 7.4** zeigen die Ergebnisse des Versuches. Bei diesem Lyseversuch wurde neben den üblichen Methoden zur Verfolgung des Lysegrades über die Feststoff- und Proteinkonzentration zusätzlich die Veränderung der optischen Dichte in den Schüttelkolben bestimmt.

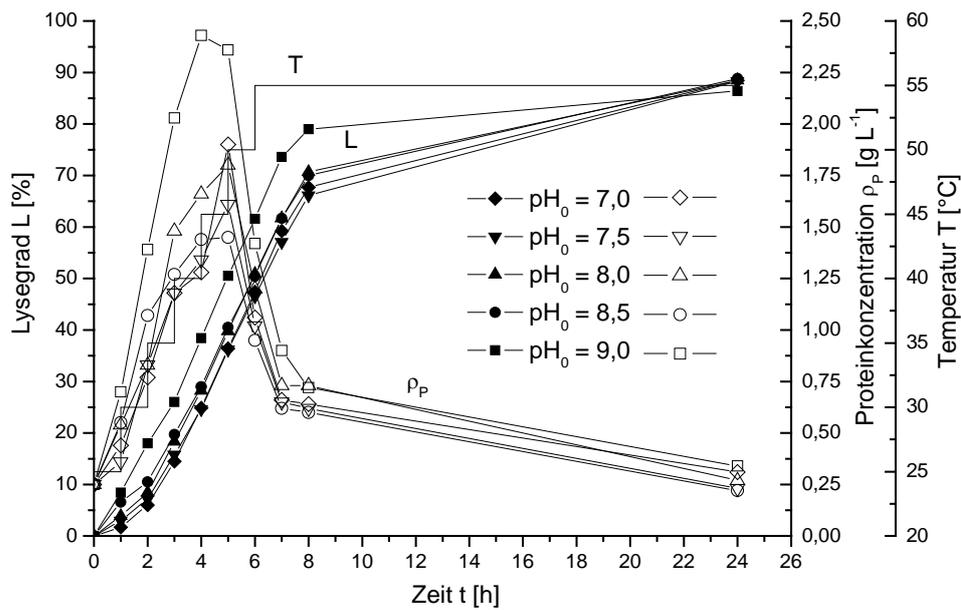


Abbildung 7.3: Autolyse von *Bacillus licheniformis* bei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten (Biotrockenmassekonzentration $24,1 \text{ g L}^{-1}$)

Der Lysegrad nahm in allen Fällen im Verlauf der Zeit zu. In den ersten acht Stunden stieg er jedoch am deutlichsten auf Werte zwischen 66 % bis 79 %. Eine leichte Tendenz zu höheren Lysegraden bei alkalischen pH-Werten war zu erkennen. Nach 24 Stunden wurden Lysegrade zwischen 86 % und 89 % erreicht. Durch Heranziehen der Daten der optischen Dichte konnten sogar Lysegrade von bis zu 98 % verzeichnet werden. Die Proteinkonzentration in der flüssigen Phase erreichte zwischen der vierten und fünften Stunde ihr Maximum. Ab diesem Zeitpunkt, was einer Temperatur von 45 °C entsprach, überwog der Abbau der Proteine bei gleichzeitig weiter steigendem Lysegrad. Die über die ungewaschene Biomasse mit in die Lyseansätze eingetragene alkalische Protease des *Bacillus*-Stammes, bei dem es sich um einen in der Vergangenheit zur industriellen Herstellung der Protease Subtilisin Carlsberg genutzten Stamm handelte, wird den Abbau der Proteine und damit das Lyseergebnis positiv beeinflusst haben. Der sich in den ersten acht Stunden deutlich abzeichnende erhöhte Lysegrad bei einem Ausgangs-pH-Wert von 9,0, konnte nicht in einen höheren Endlysegrad umgesetzt werden. Dieser lag sogar etwas niedriger als die der anderen Ansätze. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Proteinfreisetzung, des maximalen Lysegrades und des Ausgangs-pH-Werts ließ sich nicht feststellen.

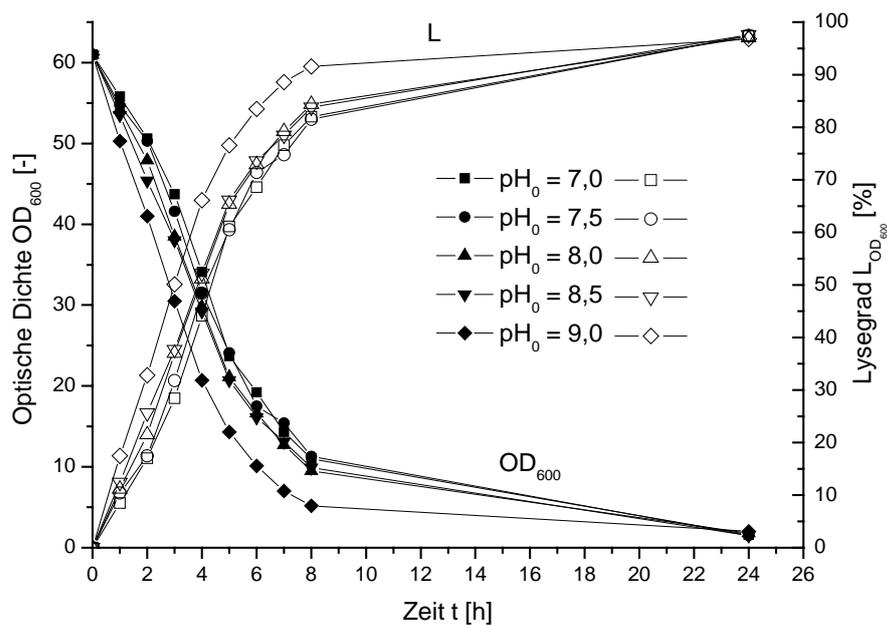


Abbildung 7.4: Autolyse von *Bacillus licheniformis* bei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten (Biotrockenmassekonzentration $24,1 \text{ g L}^{-1}$)

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, *Bacillus licheniformis*-Zellen unter den gewählten Prozessbedingungen effektiv aufzuschließen und deren Proteine abzubauen.

7.2.3 Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH - Teilversuch 1

In dem hier betrachteten Fall wurde eine Kombination aus mechanischem Aufschluss (eine Passage bei 800 bar) und Autolyse gewählt. Durch den vorangestellten mechanischen Aufschluss sollten die autolytisch wirkenden Enzyme der Zelle freigesetzt und damit die Autolyse, die als ein sehr langsamer Prozess beschrieben wird (Kelly, 1986), beschleunigt werden. Es wurden fünf Schüttelkolben in einem pH-Bereich von 7,0 bis 9,0 untersucht. Die Biotrockenmassekonzentration betrug $30,5 \text{ g L}^{-1}$. Das Temperaturprogramm entsprach dem in **Kapitel 7.2.2** vorgestellten.

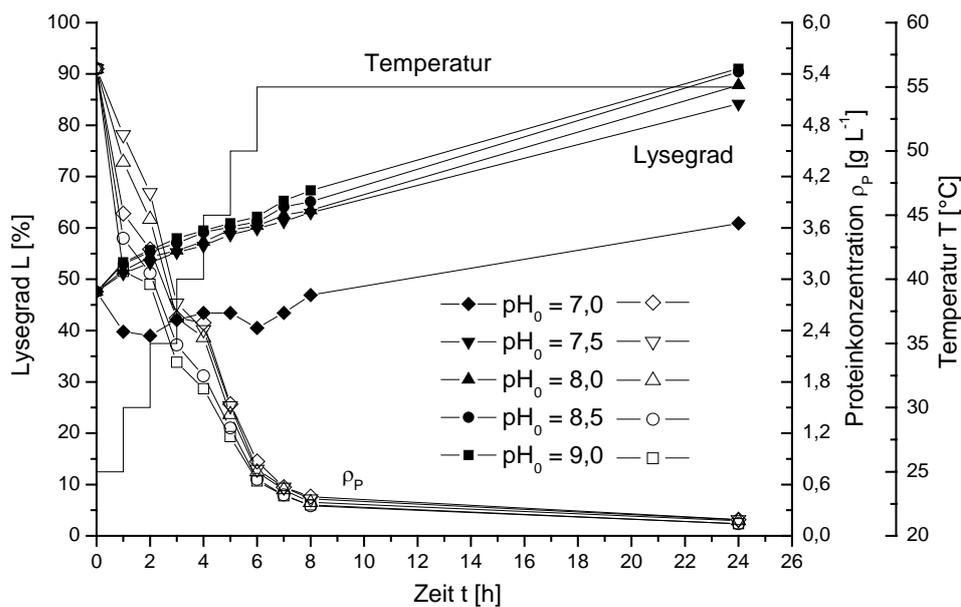


Abbildung 7.5: Autolyse von *Bacillus licheniformis* bei verschiedenen Ausgangs-pH-Werten nach einer Passage durch den Hochdruckhomogenisator bei 800 bar (Biotrockenmassekonzentration $30,5 \text{ g L}^{-1}$)

Wie zu erwarten nahm der Lysegrad durch den mechanischen Aufschluss auf etwa 48 % zu (**Abbildung 7.5**). Dieser Wert wurde bereits bei der Abstimmung der Aufschlussparameter erzielt (**Kapitel 7.2.1**). Durch die Zerstörung der Kompartimentierung der Zellen lag die anfängliche Proteinkonzentration mit $5,5 \text{ g L}^{-1}$ deutlich höher als bei dem vorher vorgestellten Autolyseversuch intakter Zellen. Nach der pH-Einstellung und Starten des Temperaturprogramms nahm der Lysegrad in vier der fünf Schüttelkolben zu und die Proteinkonzentration ab. Die Lysegrade lagen nach acht Stunden mit Werten zwischen 47 % und 67 % zum größten Teil niedriger als bei der Autolyse intakter Zellen zum gleichen Zeitpunkt (66 % bis 79 %) und erreichten nach 24 Stunden Werte zwischen 84 % und 91 %. Der Lyseverlauf bei einem Ausgangs-pH von 7,0 zeigte ein anderes Bild. Dort konnten Lysegradabnahmen und -zunahmen beobachtet werden. Der maximale Lysegrad lag dort mit 61 % deutlich niedriger als bei den anderen Schüttelkolben.

Dieser Versuch offenbarte im Gegensatz zur Autolyse intakter Zellen eine wenn auch nur geringe pH-Abhängigkeit der Lyse. Je höher der pH desto höher lag der Lysegrad. Jedoch konnte trotz des vorangestellten Zellaufschlusses weder eine Verbesserung der Lysegeschwindigkeit erreicht noch die Lysegrade wesentlich gesteigert werden.

7.2.4 Autolyse nach Hochdruckaufschluss unter Variation des pH - Teilversuch 2

Dieser Versuch sollte nochmals klären, inwieweit ein intensiverer Zellaufschluss die Autolyse der *Bacillus licheniformis*-Zellen positiv beeinflusst.

Es wurden nun anstatt einer Passage bei 800 bar drei Passagen bei 400 bar durchgeführt. Dies führte zu einem vergleichbaren Lysegrad von 48 % (**Abbildung 7.6**). Die freigesetzte Proteinkonzentration lag mit $6,9 \text{ g L}^{-1}$ jedoch höher als bei nur einer Passage bei 800 bar. Das Temperaturprogramm wurde soweit geändert, dass die einzelnen Temperaturen anstelle von einer Stunde nur 45 Minuten gehalten wurden. Die Biotrockenmassekonzentration betrug $24,1 \text{ g L}^{-1}$.

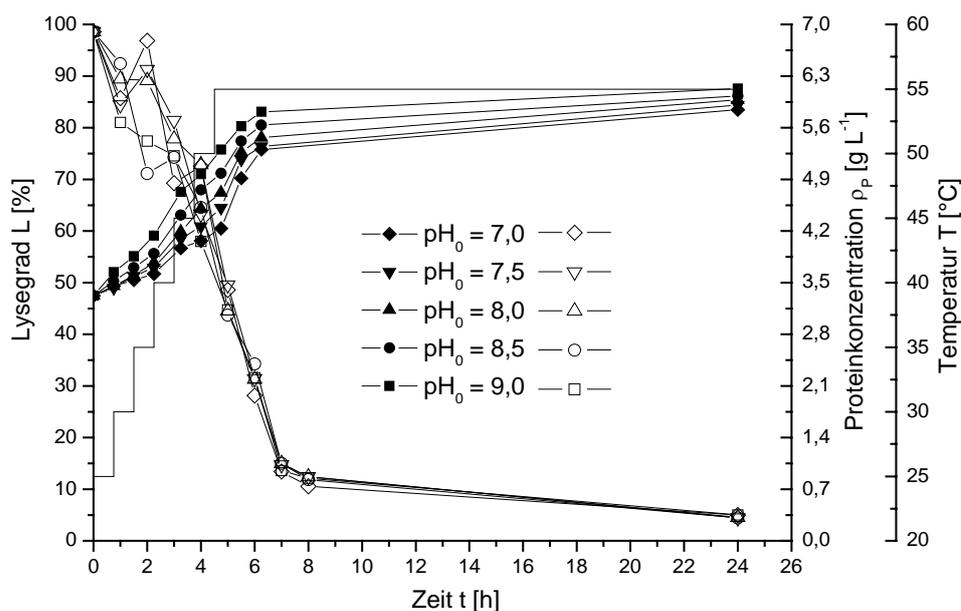


Abbildung 7.6: Autolyse von *Bacillus licheniformis* bei verschiedenen Ausgangs-pH nach drei Passagen durch den Hochdruckhomogenisator bei 400 bar (Biotrockenmassekonzentration $24,1 \text{ g L}^{-1}$)

Durch diese Versuchsanordnung konnte die Lysegeschwindigkeit erhöht werden. Nach 6,25 Stunden, was acht Stunden bei den vorherigen Versuchen entsprach, wurden bereits Lysegrade zwischen 76 % und 83 % erzielt. Die erreichten Lysegrade nach 24 Stunden lagen zwischen 84 % und 88 % und waren damit vergleichbar mit denen der beiden vorangegangenen

nen Versuche. Die bereits beobachtete pH-Abhängigkeit bei einem der Autolyse vorausgehenden Hochdruckaufschluss bestätigte sich.

7.2.5 Alkalische Hydrolyse ganzer Zellen

In Gegenwart von starken Laugen lassen sich zahlreiche chemische Bindungsarten hydrolytisch spalten.

Innerhalb dieses Versuches wurden die Schüttelkolben mit der resuspendierten Biomasse für sechs Stunden in siedendes Wasser (100 °C) gestellt. Eine stündliche Probennahme sollte den Verlauf des Aufschlusses aufzeigen. Schon während der Zugabe der Natronlauge kam es durch die Verseifung der Phospholipide der Zellmembran (Belter *et al.*, 1988) zur Freisetzung des Cytoplasmainhaltes und damit zur Lyse der Zellen, was durch eine plötzliche Viskositätszunahme zu beobachten war.

Für diesen Lyseversuch wurde im Unterschied zu den bereits vorgestellten Versuchen Biomasse aus einer Fermentation auf dem KF-Medium verwendet. Damit gelang auch ein Teil der nicht verwerteten Bestandteile des Sojamehls, des Caseinats, des Stärkehydrolysats und des Maisquellwassers in die Lyseansätze. Deshalb wird im Folgenden nicht von Biotrockenmassekonzentration sondern von der Trockenmassekonzentration gesprochen. **Abbildung 7.7** zeigt die Ergebnisse dieses Lyseversuches. Fünf Hydrolyseansätze fanden unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH}_0 = 12,5 / 12,0 / 11,5 / 11,0 / 10,5 / 10,0$) statt. Die anfängliche Trockenmassekonzentration lag bei $32,4 \text{ g L}^{-1}$.

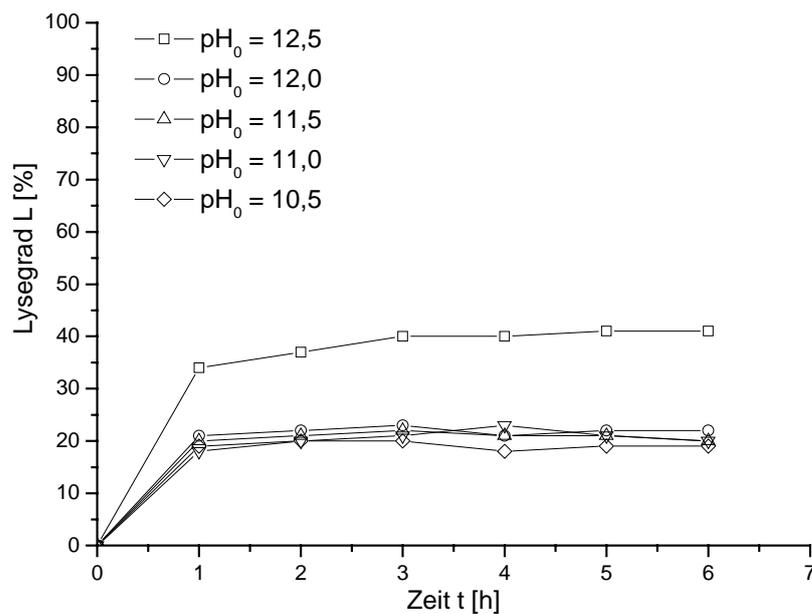


Abbildung 7.7: Alkalische Hydrolyse von *Bacillus licheniformis* P300 unter Variation des Ausgangs-pH (Trockenmassekonzentration 32,4 g L⁻¹)

Innerhalb der ersten Stunde kam es in allen Ansätzen zu einem sprunghaften Anstieg des Lysegrades. Im pH-Bereich zwischen 10,0 und 12,0 waren jedoch nur minimale Unterschiede zu verzeichnen. Es wurden in diesem Bereich nach einer Stunde Lysegrade zwischen 18 % und 21 % erreicht. Erst ein pH von 12,5 zeigte mit 34 % einen deutlichen höheren Lysegrad. In den darauf folgenden fünf Stunden verbesserte sich der Lysegrad bei einem pH von 12,5 auf 41 %, wohingegen die anderen Ansätze nur geringfügige Veränderungen aufwiesen. Die Lysegrade lagen im Vergleich zu den Ergebnissen die bereits mit den Gram-negativen Stämmen *Klebsiella planticola* (maximaler Lysegrad 65 %) und *Escherichia coli* B-3996 (maximaler Lysegrad 75 %) erzielt wurden deutlich niedriger. Zum einen kann dies an der stärkeren Zellwand Gram-positiver Bakterien gelegen haben. Zum anderen täuschte der nicht durch die Zellen verursachte Feststoffanteil in den Lyseansätzen einen niedrigeren Lysegrad vor, indem dieser Anteil durch die gewählten alkalischen Bedingungen nicht hydrolysiert wurde. Das Mikroskopbild zeigte in allen Schüttelkolben eine starke Reduzierung der Zellkonzentration bis zur vollständigen Auflösung der Zellen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die auf die Zellen bezogenen Lysegrade deutlich höher ausfielen als die experimentell bestimmten.

Die Proteinkonzentration lag nach dem Resuspendieren der Biomasse und nach der pH-Einstellung bei $0,15 \text{ g L}^{-1}$ (**Abbildung 7.8**). Diese niedrige Konzentration an gelöstem Protein deutete auf eine nur geringe Lyse der Zellen durch den Einfrier- und Auftauprozess hin. Die über die Biomasse mit eingetragene Proteinmenge war zu vernachlässigen, da ein Proteingel zum Zeitpunkt der Zellernte nur wenige schwache Banden zeigte und die Proteinkonzentration unter $0,8 \text{ g L}^{-1}$ lag. Außerdem dürfte die der Biomasse anhaftende Protease ihr übriges dazu beigetragen haben, vorhandene Proteine während des Resuspendierens abzubauen. Die Protease wird erst durch das Erhitzen auf 100 °C denaturiert worden sein und somit ihre Aktivität verloren haben.

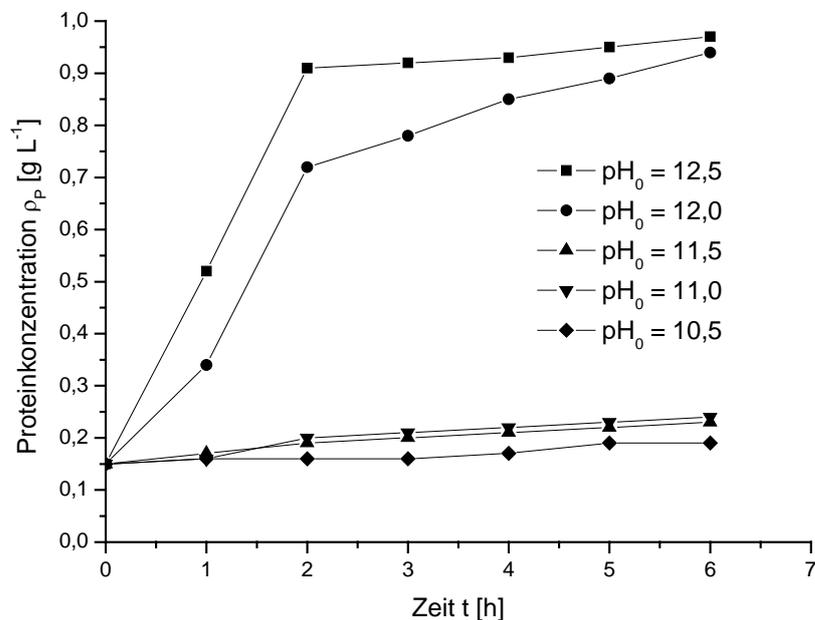


Abbildung 7.8: Alkalische Hydrolyse von *Bacillus licheniformis* P300 unter Variation des Ausgangs-pH (Trockenmassekonzentration $32,4 \text{ g L}^{-1}$)

Auffällig war die in Blick auf die bereits erzielten Ergebnisse mit zwei Gram-negativen Stämmen unerwartet niedrige Proteinkonzentration der Lysate von unter 1 g L^{-1} . Entweder präzipitierten die Proteine während der Lyse oder sie wurden durch die Protease gespalten, wobei die Reaktionsbedingungen (pH 12,5 und 100 °C) gegen eine enzymatische Aktivität sprachen. Eine weitere Ursache der messbar niedrigen Proteinkonzentration konnte sein, dass die Proteine alkalihydrolytisch in kleinere Fragmente zerlegt wurden und damit mit dem modifizierten Bradford-Assay nicht mehr nachweisbar waren. Mit dem Bradford Test können

erst Proteine mit einer Molmasse von über 3 kDa nachgewiesen werden, so dass entstandene kleinere Proteine, Oligo- und Dipeptide nicht erfasst wurden.

7.2.6 Zusammenfassende Betrachtung der Lyseversuche

Abbildung 7.9 gibt in grafischer Übersicht die verschiedenen mit *Bacillus licheniformis* durchgeführten Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab wieder. Die maximal erreichten Lysegrade sind mit in das Schema aufgenommen worden.

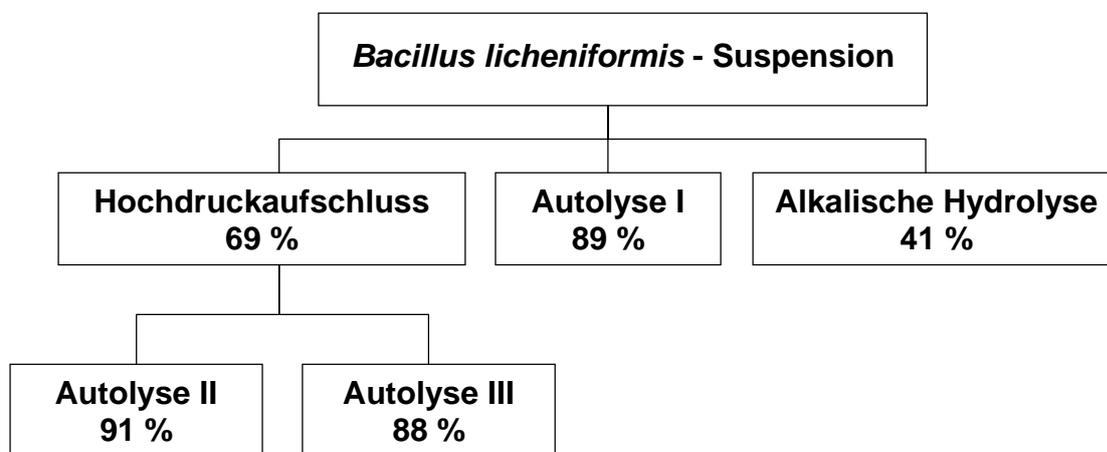


Abbildung 7.9: Schüttelkolbenversuche mit *Bacillus licheniformis* mit Angabe der maximal erreichten Lysegrade. Die Biomasse für die Lyseversuche wurde durch Fermentationen auf HSG-Medium im Rührkesselreaktor gewonnen. Für die alkalische Hydrolyse wurde Biomasse aus einer Fermentation auf KF-Medium genutzt.

Durch eine einfache Autolyse, die durch das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturen vollzogen wurde, konnte ein Lysegrad von maximal 89 % (Autolyse I) erreicht werden. Mit der Kombination von Hochdruckaufschluss und Autolyse wurden ähnlich hohe Lysegrade erzielt. Eine Passage bei 800 bar führte bei anschließender Autolyse zu einem maximalen Lysegrad von 91 % (Autolyse II) und drei Passagen bei 400 bar bei anschließender Autolyse zu einem maximalen Lysegrad von 88 % (Autolyse III). Die Proteinkonzentration konnte in allen Fällen auf unter $0,5 \text{ g L}^{-1}$ gesenkt werden.

Die alkalische Hydrolyse der *Bacillus licheniformis*-Zellen, die durch Kultivierung auf KF-Medium gewonnen wurden, führte zu einem maximalen Lysegrad von 41 % und einer Prote-

inkonzentration von unter 1 g L^{-1} . Auffällig war die in Blick auf die bereits erzielten Ergebnisse mit zwei Gram-negativen Stämmen unerwartet niedrige Proteinkonzentration der Lyseate. Ziel der alkalischen Hydrolyse war es, durch die Wahl der Lysebedingungen zwar einen Zellaufschluss zu erreichen, jedoch ein Abbau der Proteine zu verhindern. Dadurch sollte sie während der Hitzesterilisation präzipitieren und als feste Stickstoffquelle zur Verfügung stehen.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden mit drei der vier vorgestellten Möglichkeiten Lyseate aus *Bacillus licheniformis*-Biomasse aus Fermentationen auf KF-Medium hergestellt. Diese sollten dann auf ihre Eignung als Mediumsbestandteil untersucht werden.

7.3 Kultivierungen auf dem Produktionsmedium

In diesem Kapitel werden die Fermentationen auf dem komplexen Produktionsmedium - im Folgenden KF-Medium genannt - vorgestellt. Ziel dieser Fermentationen war es, das vorliegende System bestehend aus dem *Bacillus licheniformis*-Stamm und dem komplexen KF-Medium zu charakterisieren. Dabei sollten Daten gewonnen werden, die später als Vergleichsgrundlage für Kultivierungen mit Lysat dienen.

Das KF-Medium (**Tabelle 3.6**) setzte sich aus komplexen Substraten und anorganischen Salzen zusammen, die unterschiedliche Funktionen während der Kultivierung erfüllten.

Die hydrolysierte Maisstärke diente als zentrale Kohlenstoffquelle. Stärke besteht aus den Polysacchariden Amylose und Amylopektin (Baltes, 2000). Während die helixartige gewundene Amylose aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten besteht, finden sich im Amylopektin zusätzlich α -1,6-glykosidische Verknüpfungen, die zu einem verzweigten Aufbau des Moleküls führen. Die eingesetzte α -Amylase (Novozymes, Termamyl[®] 120 L, E.C. 3.2.1.1) katalysiert die Spaltung von α -1,4-glykosidischen Bindungen im Inneren des Stärkemoleküls. Durch die enzymatische Hydrolyse wurden sowohl aus dem Amylopektin als auch aus der Amylose Zuckerreste unterschiedlicher Kettenlänge freigesetzt. Das erhaltene Spaltungsmuster setzte sich aus Glucose, Maltose oder höherkettigen verzweigten und unverzweigten Oligomeren und Polymeren der Glucose zusammen.

Das Natriumcaseinat (aufgeschlossenes bovines Milcheiweiß, Proteingehalt ca. 90 %) und das Sojamehl (Proteingehalt ca. 52 %) wurden hauptsächlich als organische Stickstoffquelle genutzt. Beide Substrate spielten durch ihre chemischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle bei der Expression und Sekretion der Protease. Wichtige Faktoren waren die Löslichkeit und ihr Verhalten bei der Hitzesterilisation. Dadurch, dass ein Anteil der Proteine zu Beginn der Fermentation nicht gelöst vorlag und ein anderer bei der Hitzesterilisation präzipitierte, lag die Stickstoffquelle auch in fester Form vor. Um während der Kultivierung nicht in eine Stickstofflimitierung zu geraten, mussten die Zellen Proteasen freisetzen, die die Proteine abbauten und damit in Lösung brachten. Verfahrenstechnisch führte die hohe anfängliche Proteinkonzentration zu einer sehr starken Schaumbildung, die erst nach Abbau der gelösten Proteine nachließ.

Das Maisquellwasser diente als Mineralstoff-, Vitamin- und Stickstoffquelle. Das Ammoniumdihydrogenphosphat wurde als anorganische Stickstoff- und Phosphorquelle genutzt. Schließlich dienten die weiteren Substanzen als Mineralstoff- und Spurenelementlieferanten.

Der hohe Feststoffanteil des Mediums wurde hauptsächlich durch die vier komplexen Bestandteile hervorgerufen. Außerdem kam es durch die 60-minütige Hitzesterilisation zu einer Flockenbildung, die durch die Präzipitation der Proteine des Sojamehls und des Caseinats verursacht wurde. Während der Kultivierung kam es durch den Abbau der unlöslichen Proteinpräzipitate und der Biomassebildung zu wechselnden Feststoffanteilen.

Zunächst erfolgt die ausführliche Auswertung für eine auf dem KF-Medium durchgeführte Kultivierung. Danach wird die Reproduzierbarkeit anhand wichtiger Prozessgrößen durch Vergleich mit weiteren Fermentationen belegt. Im weiteren Verlauf der Auswertung werden alle Fermentationen durch ein großes F mit darauf folgender Zahl abgekürzt. Die Zahl gibt dabei die laufende Nummer der durchgeführten Fermentation an und ermöglicht eine zweifelsfreie Zuordnung der Kultivierung.

Eine wichtige Voraussetzung für die Produktion der alkalischen Protease war eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff (van Putten *et al.*, 1996; Calik *et al.*, 2000; Calik *et al.*, 2002). Daher soll zunächst ein kurzer Blick auf den Verlauf der Sauerstoffsättigung geworfen werden. **Abbildung 7.10** zeigt, dass durch die Erhöhung der Rührerdrehfrequenz und den voreingestellten Gasvolumenstrom von 8 L min^{-1} , eine Sauerstofflimitierung während der Kultivierung vermieden werden konnte. Der Sollwert von 60 % wurde zwar unterschritten, jedoch wurden Werte von unter 50 % nicht erreicht. Der Entwicklung der Zellzahldichte lässt erkennen, dass der Sauerstoffbedarf in der Phase des Wachstums am höchsten war.

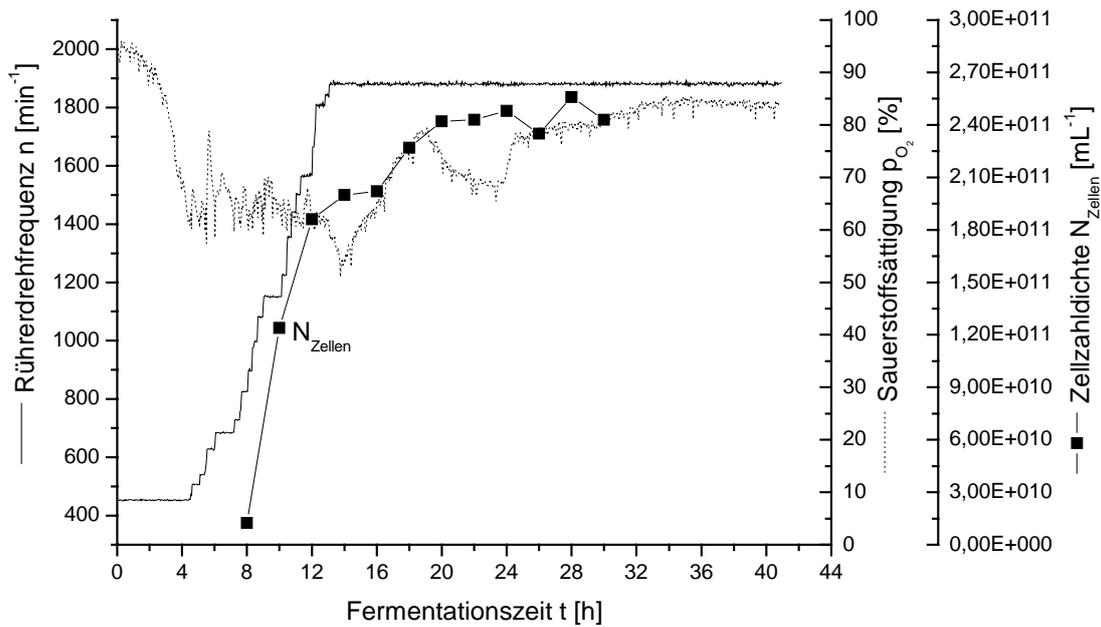


Abbildung 7.10: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F116)

Zwischen der achten und sechzehnten Stunde kam es zu einem starken Anstieg der optischen Dichte (**Abbildung 7.11**). Deren Verlauf konnte aufgrund des hohen sich im Lauf der Zeit verändernden Feststoffanteils des Mediums die tatsächlichen Veränderungen der Zelldichte nicht exakt wiedergeben. Ein erneuter Blick auf **Abbildung 7.10** zeigt jedoch, dass die Zellzählung mittels Thomakammer zu einem ähnlichen Ergebnis führte. Dort konnte die größte Zunahme der Zellzahl zwischen der achten und zwanzigsten Stunde beobachtet werden. Die Zunahmen beider Größen gingen mit dem Verbrauch der primären Kohlenstoffquellen einher. In den ersten acht Stunden wurde die Glucose, die über das Stärkehydrolysat ins Medium eingebracht wurde, verstoffwechselt. Die Konzentration der reduzierenden Zucker, als Summe aller reduzierender Zucker also auch der Glucose, nahm ab der zweiten Stunde ab, sank aber bis zum Ende der Kultivierung nicht bis auf Null. Der erneute Anstieg der Glucosekonzentration ließ sich mit dem fortschreitenden Abbau der Stärkebestandteile, der mit der Freisetzung von Glucose einherging, erklären. Neben dem Verbrauch der Kohlenstoffquelle während des Wachstums reduzierte sich auch die Konzentration an löslichem Protein also der organischen Stickstoffquelle.

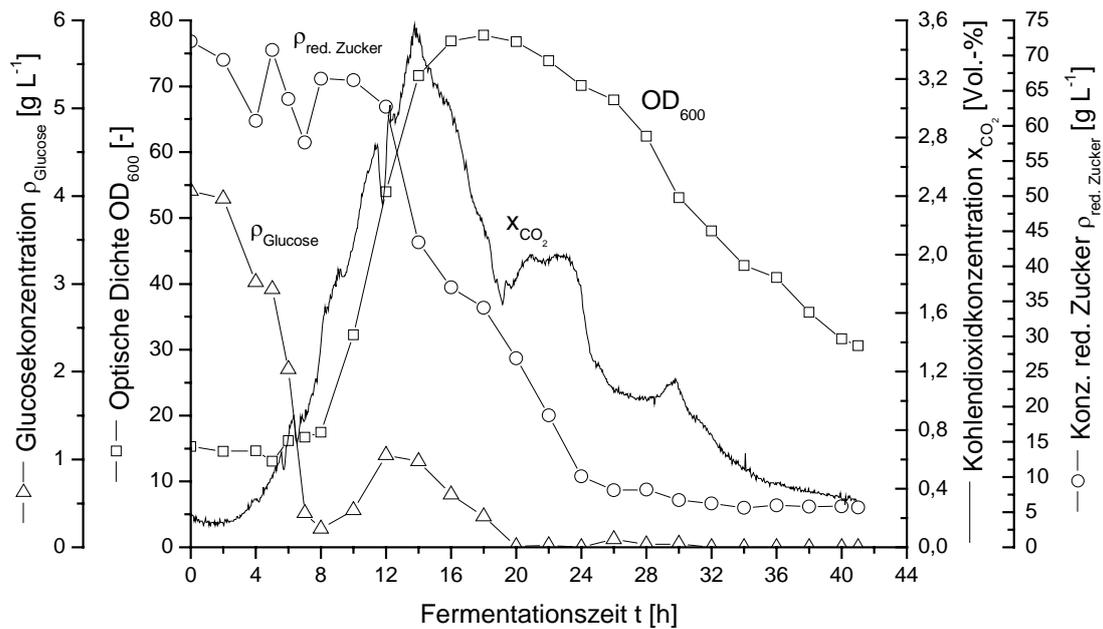


Abbildung 7.11: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F116)

Die Kohlendioxidkonzentration in der Abluft spiegelt die Vorgänge innerhalb der ersten zwölf Stunden im Hinblick auf die Verstoffwechslung der Glucose- und Proteinkonzentration wider. Der Verbrauch der anfänglich vorliegenden Glucosekonzentration nach sieben Stunden führte zu einem Abfall der Kohlendioxidkonzentration. Der erneute Anstieg und Abfall nach zwölf Stunden korrelierte mit dem Verbrauch der gelösten Proteine. Es zeigte sich, dass dieser Zusammenhang zwischen CO_2 -Muster und den beiden Substratkonzentrationen auch bei den anderen Fermentationen (F117 und F121) auf dem KF-Medium auftrat.

Durch die Zunahme der Zellzahl stieg die Kohlendioxidkonzentration in der Abluft stark an. Erst nachdem die Zunahme der Zellzahl beendet war, begann der CO_2 -Ausstoß wieder zu sinken.

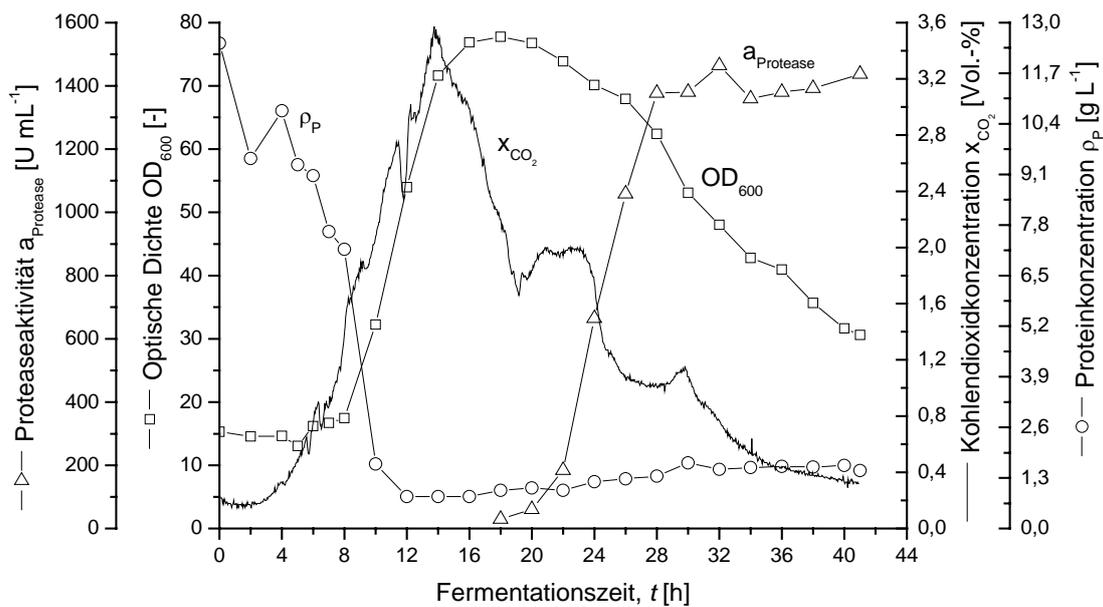


Abbildung 7.12: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F116)

Es ließ sich feststellen, dass die Proteaseexpression und -sekretion weitgehend getrennt von der Wachstumsphase und dem Verbrauch der primären Kohlenstoffquelle verlief. Zu Beginn wurde vermutlich nur wenig Protease ins Medium abgegeben, da mit dem Ammoniumdihydrogenphosphat und den gelösten Proteinen eine leicht zu verwertende und ausreichend vorhandene Stickstoffquelle existierte. Erst nach einer deutlichen Reduzierung der löslichen Proteine auf Werte unter 1 g L^{-1} konnte ein nennenswerter Anstieg in der Proteaseaktivität verzeichnet werden (**Abbildung 7.12**). Dieser zog sich über die gesamte zweite Hälfte der Kultivierung hin. Nach Verbrauch der gelösten Proteine machten sich die Zellen durch die Expression und Sekretion der Protease eine neue Stickstoffquelle, die in Form der präzipitierten Proteine vorlag, verfügbar. Dadurch wurde eine Stickstofflimitierung verhindert. In dem Zeitraum der Proteasebildung kam es zu einer geringen Reduzierung der Konzentration an reduzierenden Zuckern. Sowohl die Zellzahl als auch die optische Dichte sowie die Kohlendioxidkonzentration in der Abluft nahmen während dieser Produktionsphase deutlich ab, während die Sauerstoffkonzentration wieder auf ihren Anfangswert stieg. Bei dem zum Ende der Fermentation zu erkennenden Anstieg der zu messenden Proteinkonzentration handelte es sich um die sekretierte Protease.

Das in **Abbildung 7.13** gezeigte Proteingel verdeutlicht die geschilderten Vorgänge. Die zweite (Startzeitpunkt) und dritte Bahn (sechs Stunden) zeigen einen hohen Proteingehalt mit einer breiten Größenverteilung. Sechs Stunden später ($t = 12$ h) waren kaum noch Proteine zu erkennen. Dies spiegelte sich auch in der gemessenen niedrigen Proteinkonzentration zu diesem Zeitpunkt wider (**Abbildung 7.12**). Ab der 18. Stunde nahm durch die verstärkte Expression der Protease und das damit verbundene in Lösung gehen von Proteinen die Bandenanzahl wieder zu. Eine Bande bei 27 kDa trat besonders deutlich hervor. Bei ihr handelte es sich um die alkalische Protease. Das Molmasse von Subtilisins Carlsberg wird mit 27,3 kDa angegeben (Novozymes).

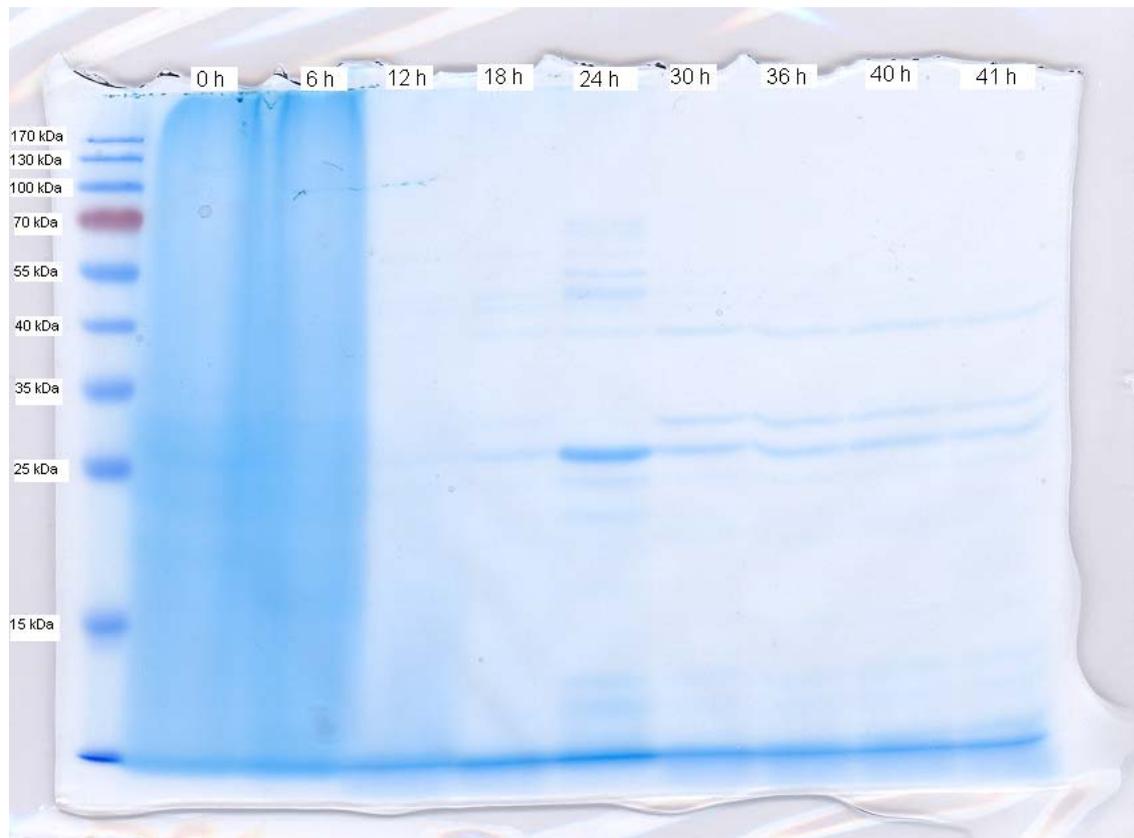


Abbildung 7.13: Diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel. Auftragung der feststofffreien Überstände der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf KF-Medium (F116) (Belegung: Spur 1: Proteinmarker; Spur 2; 0 h, Spur 3: 6 h, Spur 4: 12 h, Spur 5: 18 h, Spur 6: 24 h, Spur 7: 30 h, Spur 8: 36 h, Spur 9: 40 h, Spur 10: 41 h)

Bei der am Ende der Kultivierung durch Zentrifugation durchgeführten Zellernte wurden neben der Biomasse auch die festen unverwerteten Bestandteile des Mediums mit abgetrennt. Es kam zwar zu einer deutlichen Schichtung der verschiedenen Feststofffraktionen, jedoch konnte keine vollständige Abtrennung der Biomasse von den Reststoffen erreicht werden. Die Lagerung des Pellets erfolgte bei -20 °C.

Es wurden zwei weitere Fermentationen auf dem KF-Medium durchgeführt und ausgewertet (F117 und F121). **Abbildung 7.14** und **Abbildung 7.15** zeigen die Ergebnisse für F117 und **Abbildung 7.16** und **Abbildung 7.17** für F121.

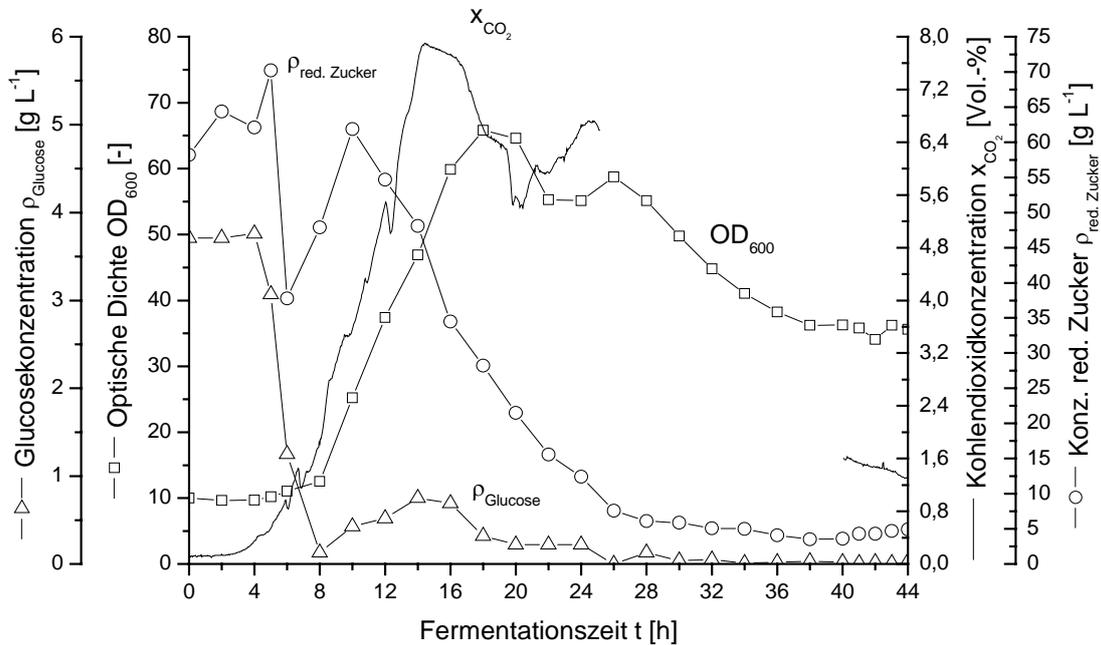


Abbildung 7.14: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F117)

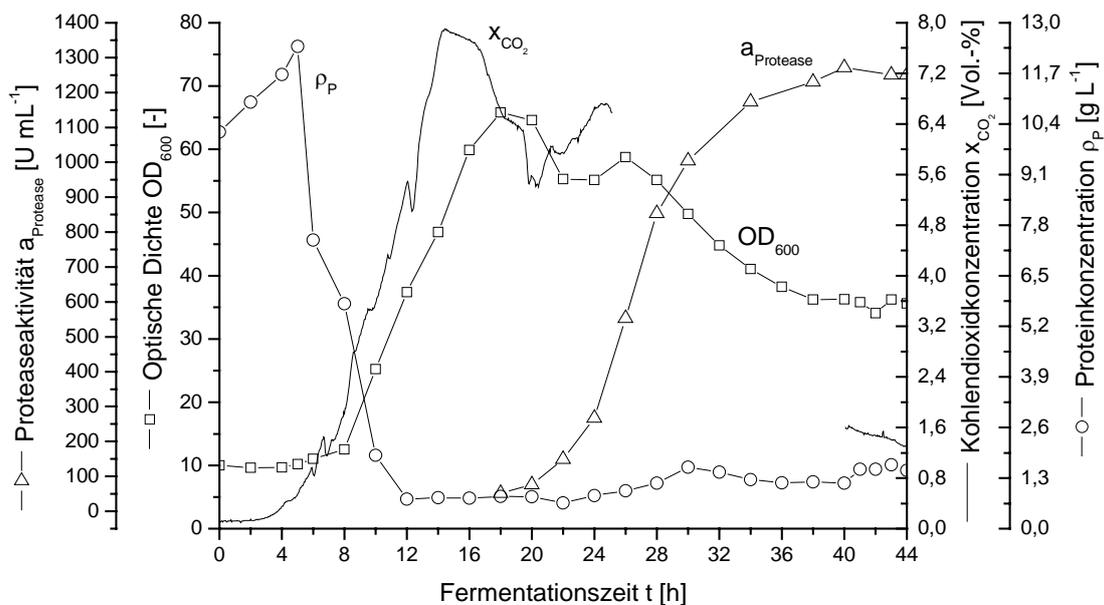


Abbildung 7.15: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F117)

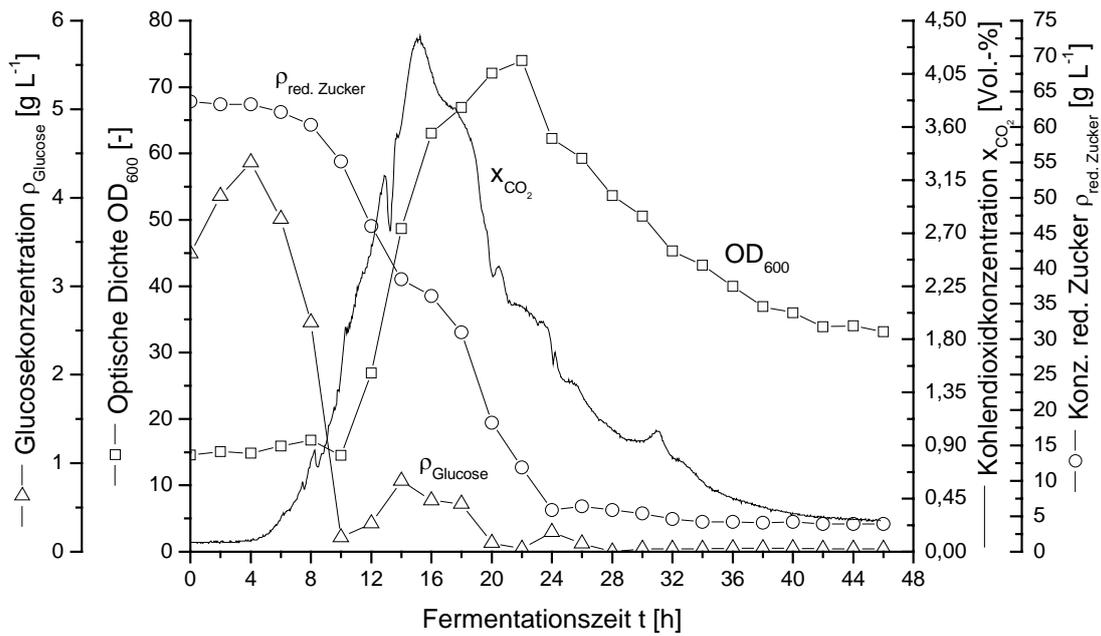


Abbildung 7.16: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F121)

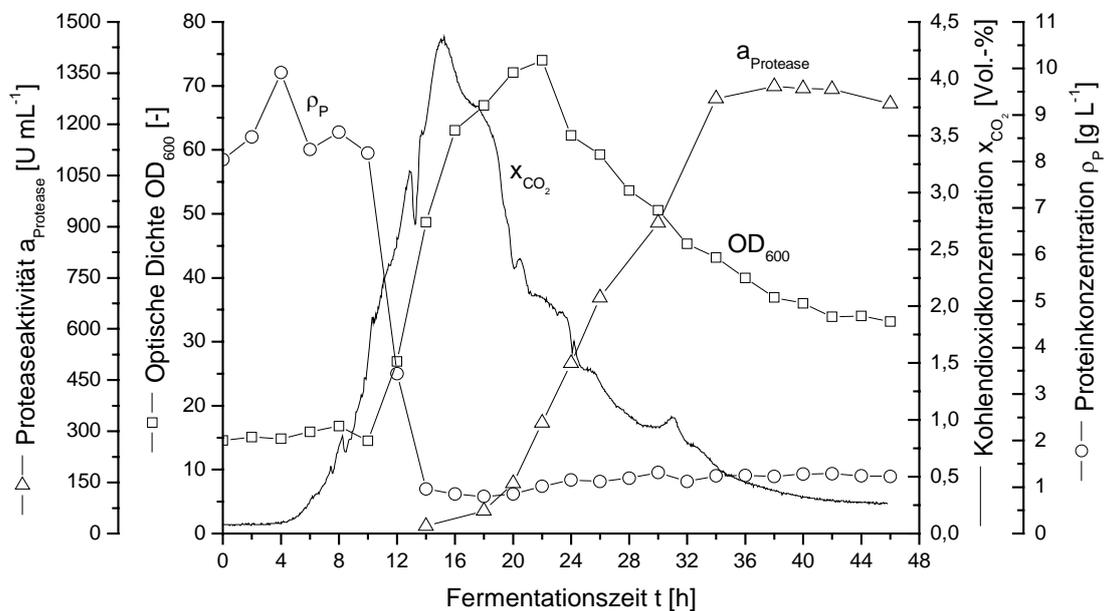


Abbildung 7.17: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F121)

Für die Kultivierung F121 wurde die Verteilung des Stickstoffs und des Kohlenstoffs zwischen den Phasen im Verlauf der Fermentation bestimmt. **Abbildung 7.18** und **Abbildung**

7.19 zeigen die Ergebnisse. Während sich der Stickstoff zwischen den beiden Phasen fest und flüssig verteilte, konnte der Kohlenstoff auch in Form von Kohlendioxid in die gasförmige Phase übertreten. Generell zeigte sowohl die Summierung des Stickstoffs als auch die des Kohlenstoffs zu den verschiedenen Zeitpunkten der Probennahme eine geringe Abweichung von der anfänglich vorgelegten Masse, was auf eine exakte Bilanzierung schließen ließ.

Zunächst werden die Veränderungen in der Verteilung des Stickstoffs erläutert. Zu Beginn der Kultivierung lagen ca. 65 % des Stickstoffs in der flüssigen und ca. 35 % in der festen Phase vor. An diesem Verhältnis änderte sich die ersten sechs Stunden nichts. **Abbildung 7.17** zeigt, dass in den ersten vier Stunden die gelöste Proteinkonzentration um 2 g L^{-1} anstieg. Daraus folgt unter Berücksichtigung des Arbeitsvolumens (5,1 Liter) und des prozentualen Stickstoffgehaltes von Proteinen (16 %), dass der Stickstoffgehalt in der flüssigen Phase um etwa 1,6 g hätte zunehmen und in der festen Phase um den gleichen Betrag abnehmen müssen. Jedoch waren solche Veränderungen nicht zu verzeichnen.

Ab der sechsten Stunde sank der Anteil des Stickstoffs in der festen Phase. Innerhalb dieses Zeitraums kam es zu einer Zunahme der Zellzahldichte (**Abbildung 7.22**) und zu einem Anstieg der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft (**Abbildung 7.17**). Der Wechsel des Stickstoffs in die flüssige Phase muss durch das in Lösung gehen von stickstoffhaltigen Verbindungen u. a. durch proteolytischen Abbau der präzipitierten Proteine verursacht worden sein. Da gleichzeitig die Zellzahldichte anstieg und damit ein Teil des Stickstoffs in die Biomasse integriert wurde, muss der proteolytische Abbau überwogen haben. Ab der zehnten Stunde nahm der Stickstoffgehalt in der flüssigen Phase deutlich ab, dies stand in Übereinstimmung mit der starken Zunahme der Zellzahldichte ab diesem Zeitpunkt. Der gelöste Stickstoff wurde für die Biomassebildung benötigt und wechselte damit in die feste Phase. Die Abnahme des Stickstoffgehaltes in der flüssigen Phase endete erst nach 22 Stunden. Danach stieg dieser bis zum Ende der Kultivierung an. Die Ursache für diese Entwicklungen lag in der Expression und Sekretion der Protease. Diese begann vermutlich bereits ab der sechsten Stunde (experimentell nachgewiesen erst nach 14 Stunden) und führte dazu, dass stickstoffhaltige Verbindungen in Lösung gingen. Da zu Beginn das Zellwachstum dominierte und die Proteaseaktivität noch gering war, sank - in der Summe - der Stickstoffgehalt in der flüssigen Phase, obwohl durch den enzymatischen Abbau laufend Stickstoff in Lösung gegangen war. Mit der Zeit sank die Abnahme des Stickstoffgehaltes in der flüssigen Phase durch Verlangsamung des Wachstums und einer erhöhten Proteaseaktivität im Medium. Nach 22 Stunden, nachdem die

Zellzahldichte ihr Maximum erreicht hatte, also der Bedarf an stickstoffhaltigen Verbindungen zu sinken begann, kehrte sich der Trend um und die hohe Proteaseaktivität führte zu einem Anstieg des gelösten Stickstoffs. Bis zum Ende der Fermentation nahm daraufhin der Stickstoffgehalt in der flüssigen Phase zu und parallel dazu in der festen Phase ab. Die Protease setzte weiterhin Stickstoff aus den festen Quellen frei, dieser wurde aber nicht mehr vollständig durch die Zellen aufgenommen. Der Anstieg des Stickstoffgehaltes in der flüssigen Phase wurde zum Teil auch durch die Protease selbst verursacht. Außerdem trug die zunehmende Zellyse ihren Teil dazu bei.

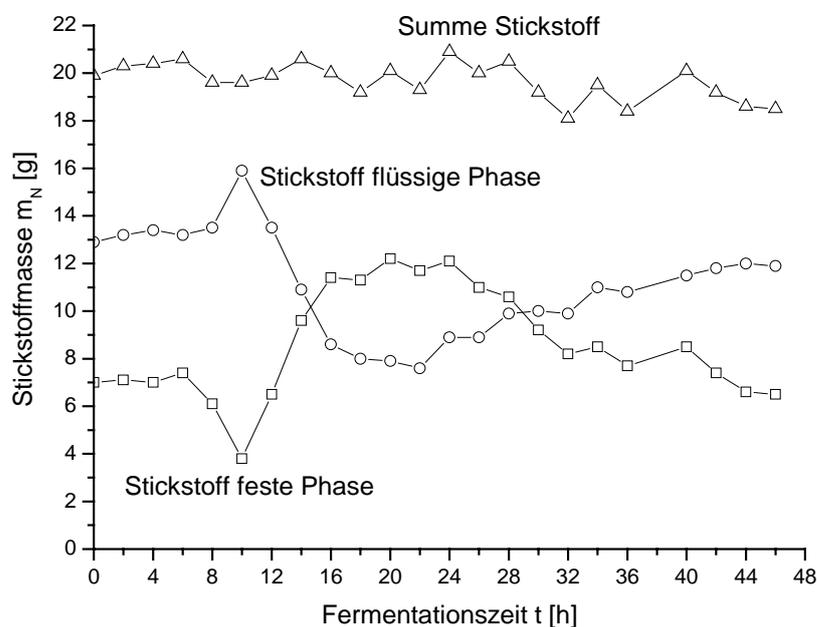


Abbildung 7.18: Verteilung des Stickstoffs während der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf KF-Medium (F121)

Die Veränderungen in der Verteilung des Kohlenstoffs zeigen **Abbildung 7.19**. Die Abnahme des Kohlenstoffs in der flüssigen Phase stand in Übereinstimmung mit der abnehmenden Konzentration der Hauptkohlenstoffquelle Stärke. Durch das Wachstum der Zellen wurde ein Teil des Kohlenstoffs in Form von Kohlendioxid aus dem Reaktor entfernt. Der Anstieg des Kohlenstoffs in der festen Phase bis zur 22. Stunde zeigt die steigende Biomassekonzentration an. Dem Anstieg entgegen wirkte mit steigender Proteaseaktivität der zunehmende Abbau des Sojamehls und des Caseinats. Ab der 22. Stunde sank der Kohlenstoffgehalt in der festen Phase. Die Ursache hierfür war zum einen der enzymatische Abbau der festen organischen Stickstoffquellen (Caseinat und Sojamehl) und Kohlenstoffquellen (reduzierende Zucker) und zum

anderen die beginnende Zellyse. Beide Gründe müssten im Gegenzug den Kohlenstoffgehalt in der flüssigen Phase erhöhen. Jedoch benötigten die Zellen zur Deckung ihres Erhaltungsstoffwechsels und der Proteaseexpression und -sekretion weiterhin Substrate, was sich z. B. an der leicht abnehmenden Konzentration reduzierender Zucker zeigte. Auch über die Abluft ging Kohlenstoff in Form von Kohlendioxid aus der flüssigen Phase verloren. Ab der 22. Stunde wurde also insgesamt eine Art stationärer Zustand erreicht, so dass trotz abnehmenden Kohlenstoffgehaltes in der festen Phase, der Kohlenstoffgehalt in der flüssigen Phase konstant blieb.

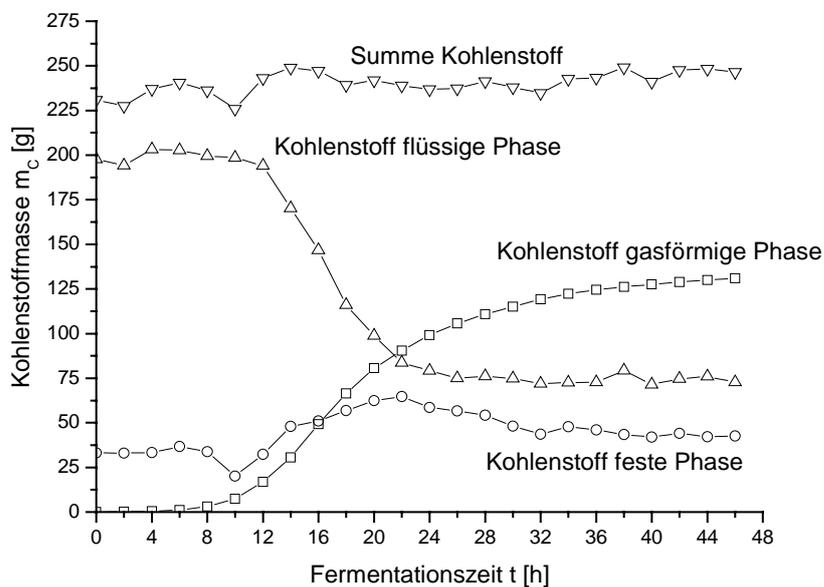


Abbildung 7.19: Verteilung des Kohlenstoffs während der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf KF-Medium (F121)

Abbildung 7.20 zeigen den Verlauf der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft für die drei vorgestellten Kultivierungen. Auffallend war der starke Unterschied im maximalen Kohlendioxidstoß, der sich zwischen F116 und F117 am stärksten bemerkbar machte. Der Grund lag in einer fehlerhaften Gasvolumenstromregelung, so dass die volumenbezogene Kohlendioxidkonzentration bei einem im Vergleich zu den anderen Fermentationen niedrigeren Gasvolumenstrom zu hoch ausfiel. Zusätzlich fiel die Datenaufzeichnung für mehrere Stunden aus. Trotz des zu geringen Gasvolumenstroms kam es jedoch während F117 zu keiner Sauerstofflimitierung (Daten nicht gezeigt).

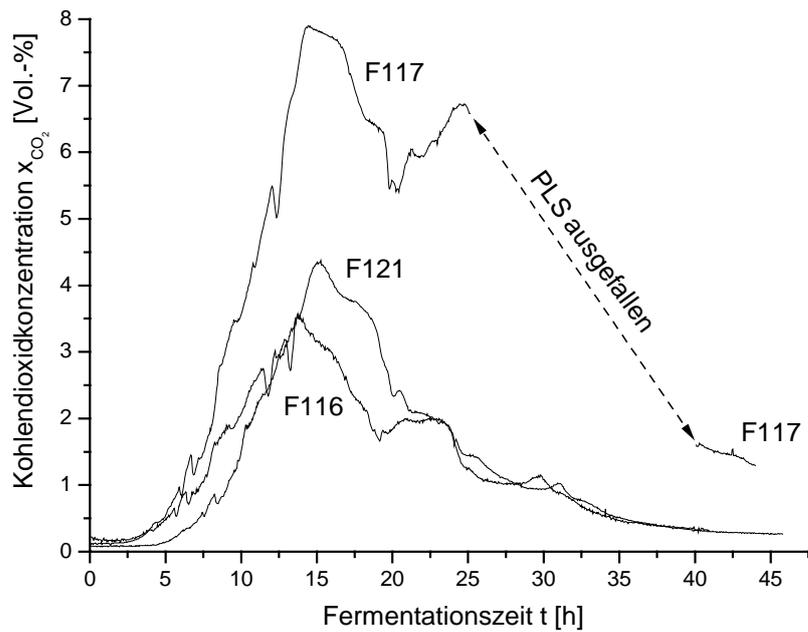


Abbildung 7.20: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium

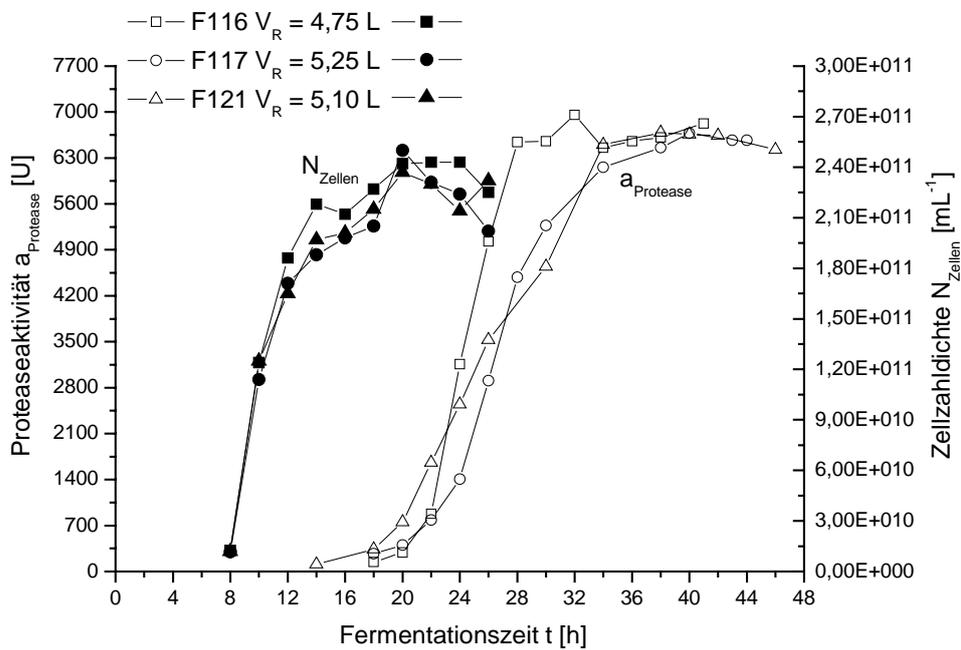


Abbildung 7.21: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium

Die Zellzahldichte und die absolute Proteaseaktivität als wichtigste Prozessgröße sind in **Abbildung 7.21** angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die absolute Proteaseaktivität

aufgetragen. Die erreichten Aktivitäten lagen zwischen 6680 U und 6960 U (**Tabelle 7.2**). Dadurch, dass die Zeitpunkte der maximalen Proteaseaktivität durch unterschiedliche Adaptionsphasen variierten, fielen auch die Produktivitäten teilweise unterschiedlich aus.

Tabelle 7.2: Maximal erreichte Proteaseaktivität und Produktivität bei der satzweisen Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium

Fermentation	Zeitpunkt der maximalen Proteaseaktivität t [h]	Proteaseaktivität a_{Protease} [U]	Produktivität P [U h ⁻¹]
F116	32	6960	217,5
F117	40	6680	167,0
F121	38	6690	176,1

7.4 Bilanzierungen für die Fermentationen von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem KF-Medium

Das Ziel der Bilanzierung lag darin, die Verteilung des Kohlenstoffs und Stickstoffs zu Beginn der Fermentation und zum Zeitpunkt der Zellernte festzustellen. Dadurch sollte auch eine Vergleichsmöglichkeit für die späteren Fermentationen mit Lysat geschaffen werden.

Der Kohlenstoffbilanzierung lag die Annahme zu Grunde, dass sich der zu Beginn der Kultivierung vorliegende Kohlenstoff anteilig aus dem der hydrolysierten Stärke, dem des Caseinats, dem des Sojamehls und dem des Maisquellwassers zusammensetzte. Am Kultivierungsende befand sich der Kohlenstoff entweder in der Biomasse, in Form der Protease in der flüssigen Phase oder er war dem Fermenter über die Abluft in Form von Kohlendioxid entwichen. Außerdem lag ein Teil des Kohlenstoffes als unverwerteter Rest (feste und flüssige Phase) oder als Stoffwechselendprodukt (flüssige Phase) im Medium vor. Nachfolgende Gleichung verdeutlicht den Sachverhalt:

$$m_{C, St\ddot{a}} + m_{C, Cas} + m_{C, SM} + m_{C, MQW} \rightarrow$$

$$m_{C, CO_2} + \boxed{m_{C, X} + m_{C, Rest, s}} + \boxed{m_{C, Rest, l} + m_{C, SEP} + m_{C, Prot}}$$

feste Phase flüssige Phase

Der zum Startzeitpunkt vorliegende Stickstoff setzte sich anteilig aus dem des Ammoniumdihydrogenphosphats, dem des Sojamehls, dem des Caseinats und dem des Maisquellwassers zusammen. Der Stickstoff verteilte sich am Ende der Kultivierung auf die gebildete Biomasse, auf die Protease, auf Stoffwechselendprodukte (flüssige Phase) und auf nicht verwertbare stickstoffhaltige Verbindungen (feste und flüssige Phase). Dadurch, dass dem Fermenter kein Stickstoff über die Abluft entzogen wurde, vereinfachte sich die Gleichung zu folgendem Ausdruck:

$$m_{N, ADHP} + m_{N, SM} + m_{N, Cas} + m_{N, MQW} \rightarrow$$

$$\boxed{m_{N, X} + m_{N, Rest, s}} + \boxed{m_{N, Rest, l} + m_{N, SEP} + m_{N, Prot}}$$

feste Phase flüssige Phase

Innerhalb der Phasen fest und flüssig wurde weder bei der Betrachtung des Kohlenstoffs noch bei der des Stickstoffs eine Differenzierung zwischen Biomasse und dem festen Restanteil

(Restanteil Medium, fest) sowie zwischen Stoffwechsellendprodukten, Protease und dem gelöstem Restanteil im Medium (Restanteil Medium, flüssig) vorgenommen.

Für die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffmassen in der Kultivierungssuspension wurden je zwei Proben direkt vor dem Animpfen und zum Zeitpunkt der Zellernte entnommen und durch Zentrifugation geklärt. Bei den Proben sind sowohl im Pellet (Biomasse und Restanteil Medium, fest) als auch im Überstand (Stoffwechsellendprodukte, Protease und Restanteil Medium, flüssig) der Gehalt bestimmt worden. Die Überstände wurden für die Analyse gefriergetrocknet. Die Trocknung der Zellpellets erfolgte hingegen bei 60 °C im Vakuumtrockenschrank.

Die Bilanzierung erfolgt nun für drei auf dem komplexen KF-Medium durchgeführten Fermentationen.

Startbedingungen (t = 0 h) für die Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium in einem Rührkesselreaktor

Rechnerisch ergaben sich für den **Kohlenstoff** bei einem Arbeitsvolumen von 4 L folgende Startbedingungen:

Einwaage Caseinat	: 104,0 g	Einwaage Sojamehl	: 76,0 g
Anteil Kohlenstoff	: 49,6 %	Anteil Kohlenstoff	: 43,2 %
Masse Kohlenstoff	: 51,6 g	Masse Kohlenstoff	: 32,8 g
Einwaage Stärke	: 360,0 g	Einwaage Maisquellwasser	: 28,0 g
Anteil Kohlenstoff	: 40,0 %	Anteil Kohlenstoff	: 40,7 %
Masse Kohlenstoff	: 144,0 g	Masse Kohlenstoff	: 5,7 g

Da es sich bei dem Maisquellwasser um eine Suspension handelte, wurde bei der Berechnung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes dessen Feststoffkonzentration berücksichtigt. Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der Substrate wurde durch Elementaranalyse gewonnen.

Theoretisch befanden sich damit 234,1 g Kohlenstoff vor dem Animpfen im Fermenter. Dieser Wert wurde analytisch überprüft. **Tabelle 7.3** zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 7.3: Theoretische und analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium und einem Arbeitsvolumen von 4 L

Fermentation	F116	F117	F121
Kohlenstoff, analytisch	244,2 g (104,3 %)	230,6 g (98,5 %)	230,9 g (98,6 %)
→ davon Kohlenstoff im Überstand	211,8 g (86,7 %)	205,6 g (89,2 %)	197,7 g (84,5 %)
→ davon Kohlenstoff im Pellet	32,4 g (13,3 %)	24,9 g (10,8 %)	33,2 g (14,2 %)
Kohlenstoff, rechnerisch	234,1 g (100 %)		
Differenz (analytisch - rechnerisch)	10,1 g (4,2 %)	-3,5 g (-1,5 %)	-3,2 g (-1,4 %)

Wie aus **Tabelle 7.3** ersichtlich, zeigte der Vergleich der analytisch und rechnerisch ermittelten Werte eine gute Übereinstimmung. Außerdem geht aus ihr hervor, dass der größte Anteil des Kohlenstoffs mit Werten zwischen 84,5 % und 89,2 % in gelöster Form und nur ein kleiner Teil in der festen Phase vorlag.

Nach der Betrachtung des Kohlenstoffs soll nun ein Blick auf den Stickstoff geworfen werden. Die Auswertung erfolgte analog zu der des Kohlenstoffs. Rechnerisch ergaben sich für den **Stickstoff** bei einem Arbeitsvolumen von 4 L folgende Startbedingungen:

Einwaage Caseinat : 104,0 g

Einwaage Sojamehl : 76,0 g

Anteil Stickstoff : 14,4 %

Anteil Stickstoff : 8,1 %

Masse Stickstoff : 15,0 g

Masse Stickstoff : 6,2 g

Einwaage Maisquellwasser : 28,0 g

Einwaage Ammoniumdihydrogenphosphat: 2,0 g

Anteil Stickstoff : 10,2 %

Anteil Stickstoff : 12,2 %

Masse Stickstoff : 1,4 g

Masse Stickstoff : 0,24 g

Theoretisch befanden sich 22,8 g Stickstoff vor dem Animpfen im Fermenter. Dieser Wert wurde analytisch wie bereits für den Kohlenstoff überprüft. **Tabelle 7.4** zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 7.4: Theoretische und analytisch ermittelte Stickstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium und einem Arbeitsvolumen von 4 L

Fermentation	F116	F117	F121
Stickstoff, analytisch	24,1 g (105,7 %)	20,8 g (91,2 %)	19,9 g (87,3 %)
→ davon Stickstoff im Überstand	17,0 g (70,5 %)	15,1 g (72,6 %)	12,9 g (64,8 %)
→ davon Stickstoff im Pellet	6,1 g (25,3 %)	5,7 g (27,4 %)	7,0 g (35,2 %)
Stickstoff, rechnerisch	22,8 g (100 %)		
Differenz (analytisch - rechnerisch)	1,3 g (5,3 %)	-2,0 g (-8,8 %)	-2,9 g (-12,7 %)

Auch die Stickstoffbilanzierung offenbarte eine nur geringe Abweichung zwischen theoretischer und analytisch nachgewiesener Masse. Im Gegensatz zum Kohlenstoff lag zu Beginn ein deutlich höherer Stickstoffanteil in fester Form vor (**Tabelle 7.4**).

Bedingungen für die Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium in einem Rührkesselreaktor zum Zeitpunkt der Zellernte ($t = t_{\max}$)

Am Ende der Kultivierungen wurden der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt in den beiden nach der Zentrifugation erhaltenen Fraktionen (flüssig und fest) bestimmt. Außerdem wurde über das CO₂-Signal die Menge an Kohlenstoff berechnet, die während der Kultivierung über die Abluft entwich.

Tabelle 7.5 zeigt die Ergebnisse. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Kohlenstoffmassen (**Tabelle 7.3**) jeder Fermentation.

Es zeigte sich, dass zwischen 25,3 % und 26,1 % des anfänglich im Medium vorliegenden Kohlenstoffs sich im Überstand wiederfand. Zwei Quellen für diesen Kohlenstoff ließen sich eindeutig bestimmen. Zum einen handelte es sich um die reduzierenden Zucker, die am Ende der Kultivierung nicht vollständig verstoffwechselt wurden und zum anderen um die Protease.

Das bereits in **Kapitel 7.3** dargestellte SDS-Gel ließ am Ende der Kultivierung nur sehr schwache Proteinbanden erkennen, so dass diese Gruppe an Biomolekülen nur eine untergeordnete Rolle spielte.

Ein erneuter Blick auf die Verteilung des Kohlenstoffs zeigt, dass zwischen 25,1 % und 25,6 % des Kohlenstoffs im Pellet vorlag. Dabei handelte es sich um die gebildete Biomasse und die nicht verwerteten Reste des Mediums (Reste der Stärke, des Sojamehls, des Caseinats und Maisquellwassers).

Die Bilanzierung des Kohlenstoffs in der Abluft ließ erkennen, dass ca. 50 % des ursprünglichen Kohlenstoffs den Fermenter in Form von Kohlendioxid entwich. Da der Gasvolumenstrom während der Fermentation mit der Nummer F117 aufgrund einer fehlerhaften Regelung niedriger ausfiel als die geforderten 8 L min^{-1} , führte die Berechnung der Kohlenstoffmasse zu falschen Ergebnissen, so dass die Auswertung leider unvollständig bleiben musste.

Die Summierung des Kohlenstoffs führte bei Fermentation F116 zu einer sehr geringen Abweichung.

Tabelle 7.5: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium und einem Arbeitsvolumen von 4 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Kohlenstoffmassen aus **Tabelle 7.3**

Fermentation	F116	F117	F121
Kohlenstoff, Überstand	61,9 g (25,3 %)	60,2 g (26,1 %)	72,8 g (31,5 %)
Kohlenstoff, Pellet	62,6 g (25,6 %)	57,9 g (25,1 %)	42,7 g (18,5 %)
Kohlendioxid Abluft	119,8 g (49,1 %)	250,6 g (108,7 %)	131,0 g (56,7 %)
Summe C, analytisch	244,3 g (100 %)	368,7 g (159,9 %)	246,5 g (106,8 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	0,1 g (0 %)	138,1 g (59,9 %)	15,6 g (6,8 %)

Die Ergebnisse der Bilanzierung des Stickstoffs zeigen **Tabelle 7.6**. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen (**Tabelle 7.4**) jeder Fermentation.

Tabelle 7.6: Verteilung des Stickstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium und einem Arbeitsvolumen von 4 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen aus **Tabelle 7.4**

Fermentation	F116	F117	F121
Stickstoff, Überstand	11,4 g (47,3 %)	11,9 g (57,1 %)	11,9 g (59,8 %)
Stickstoff, Pellet	7,5 g (31,1 %)	7,4 g (35,6 %)	6,5 g (32,7 %)
Summe N, analytisch	18,9 g (78,4 %)	19,3 g (92,7 %)	18,4 g (92,5 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-5,2 g (-21,6 %)	-1,5 g (-7,3 %)	-1,5 g (-7,5 %)

Zwischen 49,4 % und 57,1 % des Stickstoffs befanden sich zum Zeitpunkt der Zellernte in der flüssigen Fraktion der Suspension. Die Protease konnte hier als Quelle genannt werden. In der festen Phase lagen zwischen 32,5 % und 35,6 % vor. Hier handelte es sich hauptsächlich um die Biomasse und die nicht verwerteten Bestandteile des Sojamehl und des Caseinats. Bei der Summierung ergab sich bei F116 eine große Abweichung vom Anfangswert. Hier wird es sich wahrscheinlich um Analysefehler gehandelt haben.

Fazit

Durch die Bilanzierungen konnte der Weg des Kohlenstoffs und Stickstoffs während der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium nachgezeichnet werden.

Abbildung 7.22 zeigt in der graphischen Darstellung die Quelle und die Verteilung des Kohlenstoffs und Stickstoffs zu Beginn der Kultivierung. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte aus den drei ausgewerteten Fermentationen. Der zu Beginn vorgelegte Kohlenstoff (235,2 g) lag zu 12,8 % in der festen Phase und zu 87,2 % in der flüssigen Phase vor. Quellen

des Kohlenstoffs waren die Maisstärke (61,2 %), das Natriumcaseinat (21,9 %), das Sojamehl (13,9 %) und das Maisquellwasser (2,4 %). Die anfänglich vorgelegten 21,6 g Stickstoff verteilten sich zu 30,7 % in der festen und zu 69,5 % in der flüssigen Phase. Dazu trugen das Caseinat mit 69,0 %, das Sojamehl mit 28,7 %, das Maisquellwasser mit 6,5 % und das Ammoniumdihydrogenphosphat mit 1,1 % bei.

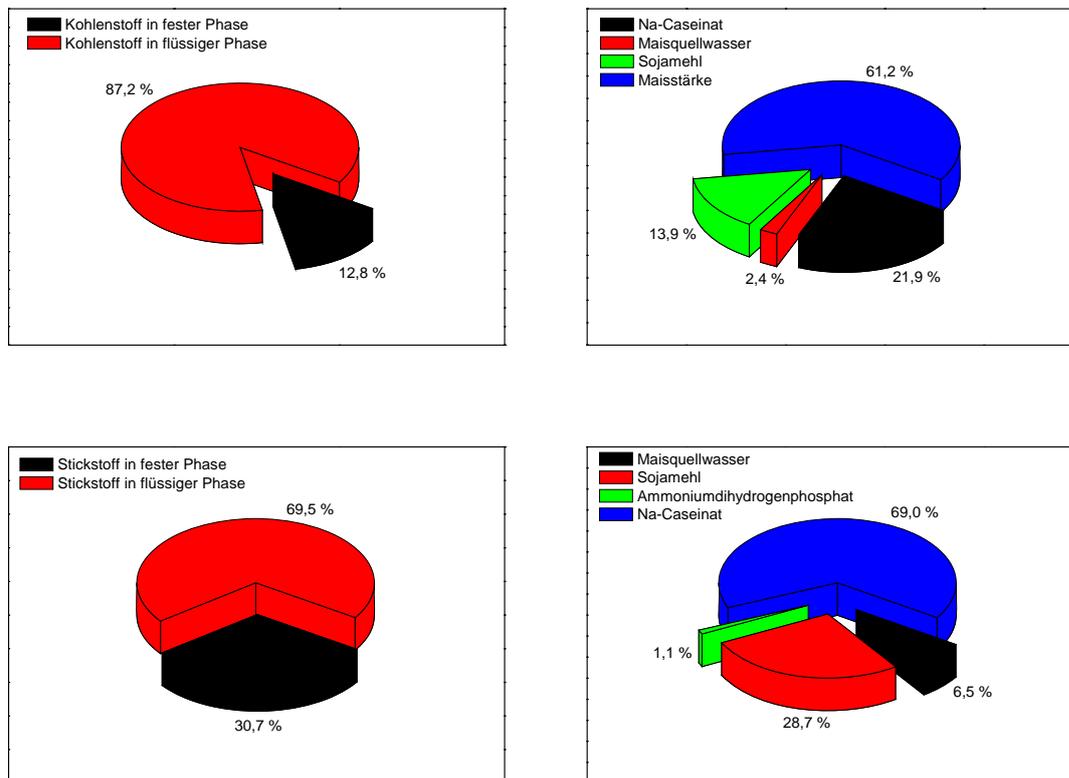


Abbildung 7.22: Verteilung des Kohlenstoffs und des Stickstoffs zu Beginn bei der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium in einem Rührkesselreaktor

Abbildung 7.23 zeigt die Verteilung für den Kohlenstoff und Stickstoff zum Zeitpunkt der Zellernte. Am Ende der Fermentation fand sich der Kohlenstoff zu 23,1 % in der festen Phase, zu 27,6 % in der flüssigen Phase und zu 52,9 % in der Abluft. Der Stickstoff lag zu 58,4 % in der flüssigen Phase und zu 34,2 % in der festen Phase vor.

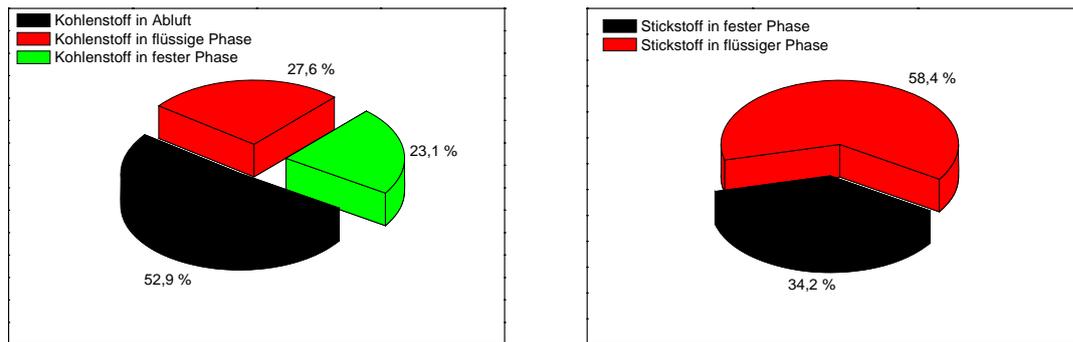


Abbildung 7.23: Verteilung des Kohlenstoffs und des Stickstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium in einem Rührkesselreaktor

7.5 Lysatherstellung und -analytik

Die in diesem Kapitel gemachten Aussagen zeigen die Ergebnisse der Charakterisierung der Lysate für die Kultivierungen. Gewonnen wurden die Lysate durch unterschiedliche Verfahren. **Tabelle 7.7** gibt einen Überblick über die Herkunft der eingesetzten Biomasse, die Art der Lyse und die Nummer der Fermentation, in der das Lysat eingesetzt worden ist. Außerdem wird angegeben, welcher Teil des Mediums durch das jeweilige Lysat ersetzt wurde und ob eine fest-flüssig Trennung nach der Lyse erfolgte.

Tabelle 7.7: Übersicht über die Herkunft der für die Lysatherstellung herangezogenen Biomasse, die Art der Lyse, die Angabe der Fermentation, in der das Lysat als Medienbestandteil eingesetzt wurde, die Angabe der ersetzen Komponente im Medium und die Angabe, ob eine fest-flüssig Trennung durchgeführt wurde

Quelle Lysat	Art der Lyse	Einsatz Lysat	Ersatz in 4 L KF-Medium	fest-flüssig Trennung
F114	Autolyse	F118	Ersatz der Hälfte des Sojamehls	ja
F116	Hochdruckaufschluss plus Autolyse (3 Passagen bei 400 bar)	F119	Ersatz der Hälfte des Sojamehls	ja
F117	Hochdruckaufschluss plus Autolyse (3 Passagen bei 400 bar)	F120	Ersatz des Maisquellwassers	ja
F121	Alkalische Hydrolyse	F122	Ersatz der Hälfte des Sojamehls	nein

Im Gegensatz zu den Lyseversuchen im Schüttelkolbenmaßstab (**Kapitel 7.2**), bei denen bis auf eine Ausnahme Biomasse aus Kultivierungen auf HSG-Medium eingesetzt wurde, kam nun für die Lysatherstellung Biomasse aus Kultivierungen auf dem komplexen KF-Medium zum Einsatz. Wie bereits in **Kapitel 7.3** angesprochen, wurde bei der am Ende der Kultivierung durchgeführten Zellernte neben der Biomasse auch ein Teil der festen unverwerteten Bestandteile des Mediums mit abgetrennt. Sie gelangten so nach dem Resuspendieren des Pellets mit in die Lyseansätze und nahmen an dem jeweiligen Lyseverfahren teil. Deshalb wird im Folgenden wieder nicht von Biotrockenmassekonzentration sondern von der Trockenmassekonzentration gesprochen. Nach beendeter Lyse wurden jedoch im Rahmen der fest-flüssig Trennung nicht in Lösung gegangene Bestandteile mit abgetrennt, so dass ein klares Lysat erhalten wurde, welches dann als Medienbestandteil genutzt wurde. Eine Ausnahme

stellte die Lysatherstellung durch alkalische Hydrolyse dar: hier wurde nach der Lyse keine Separation vorgenommen und der gesamte Lyseansatz dem Medium hinzugegeben.

Die eingesetzten Trockenmassen für die Lyse betragen für Kultivierung F118 $39,7 \text{ g L}^{-1}$, für Kultivierung F119 $37,0 \text{ g L}^{-1}$ und für Kultivierung F120 $35,0 \text{ g L}^{-1}$.

Abbildung 7.24 zeigt den Lysegrad und die Proteinkonzentration für die Autolyse und für die beiden Autolysen nach einem mechanischen Aufschluss als Funktion der Zeit. Ziel der drei Lysen war es einen möglichst großen Anteil der Zellinhaltsstoffe in Lösung zu bringen.

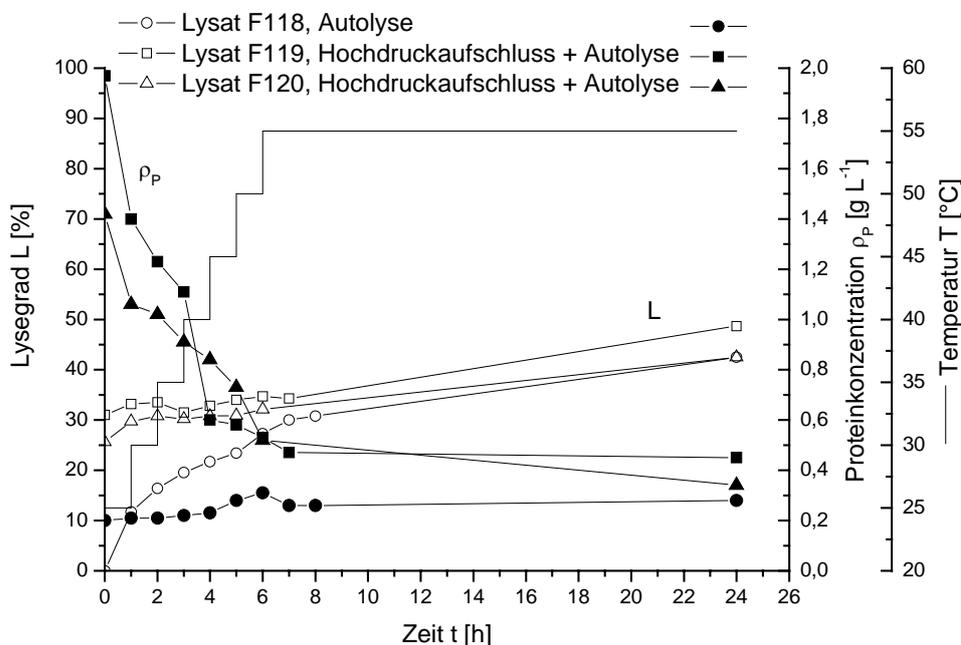


Abbildung 7.24: Autolyse von *Bacillus licheniformis*-Zellen mit (drei Passagen 400 bar) und ohne Hochdruckaufschluss

Die erreichten Lysegrade lagen für die Autolyse nach 24 Stunden bei 42,5 % und für die Autolyse mit einem vorgeschalteten Aufschluss (drei Passagen 400 bar) bei 42,5 % und 48,7 %. Die bei Verwendung von Biomasse auf HSG-Medium erzielten Lysegrade lagen für die Autolyse bei maximal 89 % und bei der Kombination mit einem Hochdruckaufschluss bei maximal 88 %. Die Unterschiede ließen sich wie bereits in **Kapitel 7.2.5** angesprochen, mit den unverwerteten Bestandteilen des Mediums, die sich durch die alkalische Hydrolyse nicht lysieren ließen und somit nicht in Lösung gingen, erklären. Die mikroskopische Betrachtung der

Lyseansätze zeigte eine deutliche Reduzierung der Zellzahl, so dass der auf die Zellen bezogene Lysegrad höher liegen musste.

Das Lysat für die Fermentation F122 wurde durch alkalische Hydrolyse gewonnen. Dazu wurde das Pellet nach dem Resuspendieren (Trockenmassekonzentration $31,9 \text{ g L}^{-1}$) und der pH-Einstellung auf 12,5 für eine Stunde bei 100 °C inkubiert. Nach der Haltezeit wurde das Lysat im Ganzen dem Fermenter als Medienbestandteil hinzugegeben. Der Lysegrad betrug 42,4 % und die Proteinkonzentration lag bei $0,9 \text{ g L}^{-1}$. Beide Werte bestätigten somit die Ergebnisse der Schüttelkolbenversuche.

Tabelle 7.8 und **Tabelle 7.9** geben die Ergebnisse der Analysen wieder. In der ersten Spalte „Fermentation“ ist angegeben für welche Fermentation das Lysat eingesetzt wurde. Das Volumen der Lysate sowie der Lysegrad, der durch die Lyse erzielt werden konnte, finden sich in der zweiten und dritten Spalte.

Die Feststoffkonzentrationen lagen zwischen $31,9 - 37,0 \text{ g L}^{-1}$ und die Lysatvolumina zwischen $0,67 - 1,00 \text{ L}$. Die unterschiedlichen Feststoffkonzentrationen ergaben sich aus den verschiedenen Mengen an eingesetzter Biofeuchtmasse, den ihnen anhaftenden Restmediumsbestandteilen und den unterschiedlichen Lysegraden.

Tabelle 7.8: Ergebnisse der Lysatcharakterisierung (Teil 1). Die Lysate wurden aus *Bacillus licheniformis*-Biomasse gewonnen

Fermentation	Lysatvolumen $V_{\text{Lysat}} [\text{L}]$	Lysegrad L [%]	Feststoffkonzentration $\rho [\text{g L}^{-1}]$	DNA-Gehalt des Feststoffanteils $x_{\text{DNA}} [\% \text{TS}]$
F118	1,0	42,5	32,2	0,28
F119	1,0	48,7	37,0	0,45
F120	1,0	42,5	33,6	0,34
F122	0,67	5,9	31,9	0,32

Tabelle 7.9: Ergebnisse der Lysatcharakterisierung (Teil 2). Die Lysate wurden aus *Bacillus licheniformis*-Biomasse gewonnen

Fermentation	Kohlenstoff- gehalt des Feststoffanteils x_C [%TS]	Stickstoff- gehalt des Feststoffanteils x_N [%TS]	Protein- konzentration ρ_P [g L ⁻¹]	Aminosäuregehalt x_{AS} [%TS]
F118	38,7	9,1	0,28 (0,87 %TS)	30,1
F119	43,4	6,7	0,45 (1,22 %TS)	18,5
F120	42,5	6,8	0,34 (1,01 %TS)	18,1
F122	38,2	8,5	0,90 (2,82 %TS)	20,4
Sojamehl	43,2	8,1	-	-
Na-Caseinat	49,6	14,4	-	-
Maisstärke	40,0	0,1	-	-
Maisquellwasser	40,7	10,2	-	-

Der DNA-Gehalt der Lysate lag zwischen 0,28 - 0,45 %TS. Der durchschnittliche DNA-Gehalt einer Bakterienzelle wird mit 3 - 4 %TS angegeben (Storhas, 2003; Schlegel, 1992). Daraus folgt, dass ein Großteil der genomischen DNA der Zellen während der Lyse degradiert oder im Falle der alkalischen Hydrolyse ausgefällt wurde. Dies konnte zum einen durch die Scherbeanspruchung im Aufschlussventil des Hochdruckhomogenisators oder durch einen enzymatischen Abbau während der Autolyse verursacht worden sein. Bei der alkalischen Hydrolyse der Zellen deutete der geringe Gehalt an genomischer DNA auf eine Präzipitation hin, da unter basischen Bedingungen im Vergleich zur RNA keine Fragmentierung auftritt.

Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der *Bacillus licheniformis*-Lysate lag zwischen 38,2 - 43,4 %TS bzw. zwischen 6,7 - 9,1 %TS. Im Vergleich zu den später zu ersetzenden Komponenten Sojamehl und Maisquellwasser wiesen die Lysate damit eine sehr ähnliche Zusammensetzung in Bezug auf den Kohlenstoff und Stickstoff auf.

Die Proteinkonzentration der Lysate lag aufgrund des verwendeten Subtilisin-Produzenten erwartungsgemäß niedrig.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalytik sind in **Abbildung 7.25** und **Abbildung 7.26** dargestellt. Da es sich bei der Aminosäure *L*-Prolin um ein sekundäres Amin handelt, kann es mit der gewählten Methode zur Vorsäulenderivatisierung nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion der Aminosäure *L*-Cystein mit *o*-Phthaldialdehyd führt hingegen zu sehr schwach fluoreszierenden Derivaten, die quantitativ nicht detektierbar sind (Büntemeyer, 2000).

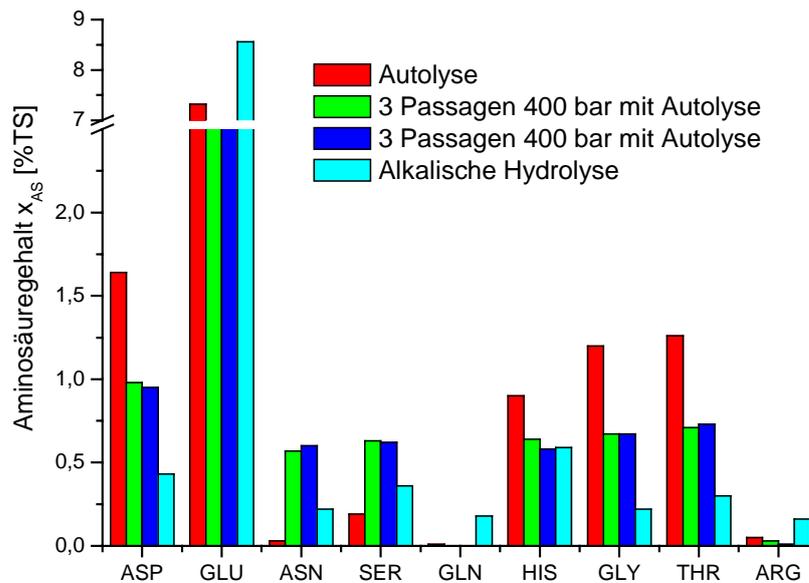


Abbildung 7.25: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Bacillus licheniformis*-Lysate (Teil 1). Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Asp: Asparaginsäure; Glu: Glutaminsäure; Asn: Asparagin; Ser: Serin; Gln: Glutamin; His: Histidin; Gly: Glycin; Thr: Threonin; Arg: Arginin

Die Summierung der Aminosäuregehalte ergab, dass beim durch Autolyse gewonnenen Lysat 30,1 % des Trockenstoffs aus Aminosäuren bestand. Durch den Hochdruckaufschluss mit anschließender Autolysephase wurden Lysate mit 18,1 %TS und 18,5 %TS Aminosäuren erhalten. Die alkalische Hydrolyse führte zu einem Aminosäuregehalt von 20,4 %TS. Die in allen Lysaten am häufigsten auftretende Aminosäure war die Glutaminsäure. Daneben traten in einigen Lysaten Asparaginsäure, Alanin, Valin, Leucin und Lysin in einer Konzentration von über 1,5 %TS auf.

Die durch den Hochdruckaufschluss mit anschließender Autolyse gewonnenen Lysate wiesen ein sehr ähnliches Spektrum an Aminosäuren auf. Mit Blick auf die anderen im Rahmen der

Lysatanalytik bestimmten Parameter zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Lysatqualität bei diesem Herstellungsverfahren. Im Hinblick auf einen industriellen Einsatz ist eine gleichbleibende Medienzusammensetzung wünschenswert (Storhas, 2003).

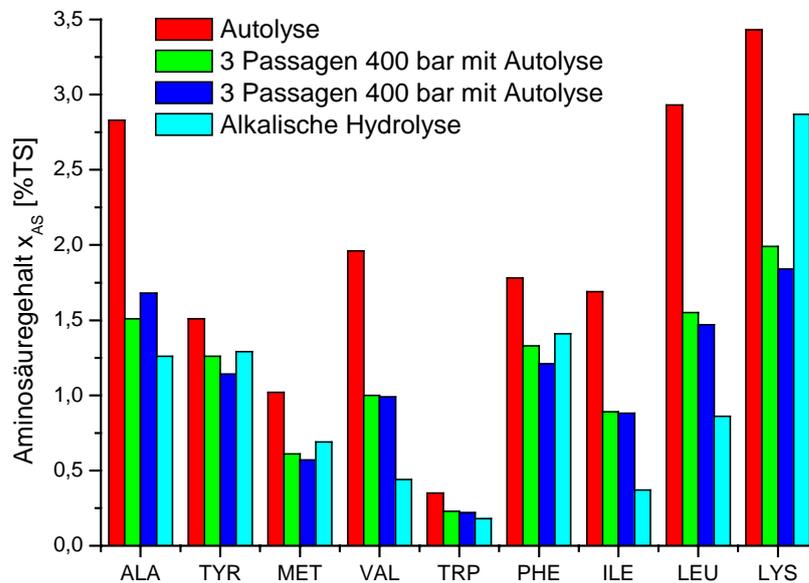


Abbildung 7.26: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Bacillus licheniformis*-Lysate (Teil 2). Angegeben sind die Gehalte der Aminosäuren in Prozent des Trockenstoffs: Ala: Alanin; Tyr: Tyrosin; Met: Methionin; Val: Valin; Trp: Tryptophan; Phe: Phenylalanin; Ile: Isoleucin; Leu: Leucin; Lys: Lysin

Das durch die Autolyse gewonnene Lysat enthielt mit 30,1 % die meisten Aminosäuren. Durch den leicht alkalischen pH und das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturen konnten innerhalb der 24-stündigen Inkubation die verschiedenen an der Autolyse beteiligten Enzyme insbesondere die alkalische Protease optimal wirken. Der Vergleich mit den durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss mit anschließender Autolyse gewonnenen Lysate zeigte einen etwa 12 % höheren Aminosäuregehalt. Der Lysegrad hingegen war weitgehend identisch. Gründe für die unterschiedlichen Aminosäuregehalte könnte ein Aktivitätsverlust der Protease durch den Hochdruckaufschluss sein.

Die sich bereits bei den Lyseversuchen im Schüttelkolbenmaßstab gezeigte niedrige Proteinkonzentration bei der alkalischen Hydrolyse bestätigte sich und erklärte damit auch den Aminosäuregehalt von 20,4 %TS.

Der bei der Zellernte mit abgetrennte unverwertete feste Restanteil wird auf die Lysatqualität Einfluss haben. Proteinhaltige Anteile des Sojamehls und des Caseinats erhöhen den Aminosäuregehalt des Lysats, während diese Anteile von der alkalischen Hydrolyse unberührt bleiben. Ein Einfluss auf den Hochdruckaufschluss oder auf die an der Autolyse beteiligten Enzyme ist denkbar. Jedoch war es möglich durch eine fest-flüssig Trennung nach der Lyse in jedem Fall ein klares Lysat zu erhalten.

Mit Hilfe der gewählten Analysen konnten die Lysate gut charakterisiert werden. Im nächsten Kapitel werden sie auf ihre Eignung als Medienbestandteil untersucht.

7.6 Kultivierungen mit Lysat

7.6.1 Ersatz des Maisquellwassers durch Zelllysate

Ziel dieser Fermentation war es das Maisquellwasser des komplexen KF-Mediums durch ein *Bacillus licheniformis*-Zelllysate zu ersetzen. Das Lysate wurde durch einen mechanischen Hochdruckaufschluss (drei Passagen bei 400 bar) und einer anschließenden 24-stündigen Autolysephase gewonnen (**Kapitel 7.2.3**). Nach beendeter Lyse wurde das Lysate durch einen Zentrifugationsschritt geklärt und das erhaltene klare Lysate als Ersatz für das Maisquellwasser im KF-Medium eingesetzt. Die Charakterisierung und Herstellung des Lysates lässt sich in **Kapitel 7.5** nachlesen.

Die Auswertung der Fermentation F120 findet analog zu den unter **Kapitel 7.3** vorgestellten Fermentationen auf dem KF-Medium statt. Ein Vergleich mit diesen findet an geeigneten Stellen statt. Auch diese Fermentation ließ sich in eine Phase des Wachstums und eine der Produktbildung teilen.

Begonnen wird mit der Betrachtung der ersten Phase der Fermentation, in der die Biomassebildung im Vordergrund stand. **Abbildung 7.27** zeigt den Verlauf der Zellzahldichte im Vergleich zu den Kultivierungen auf dem KF-Medium. Die maximal erreichte Zellzahldichte lag mit $2,58 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ auf gleichem Niveau. Dadurch, dass weder die Hauptkohlenquelle noch die wichtigsten Stickstoffquellen mengenmäßig reduziert wurden, war dies zu erwarten. In Bezug auf das Wachstum scheint das Zelllysate alle benötigten Komponenten bereit zu stellen und zu keiner Verminderung der Biomassebildung zu führen.

Durch Regelung der Sauerstoffsättigung über die Erhöhung der Rührerdrehfrequenz und den voreingestellten Gasvolumenstrom von 8 L min^{-1} konnte während der Fermentation eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet werden (Daten nicht gezeigt).

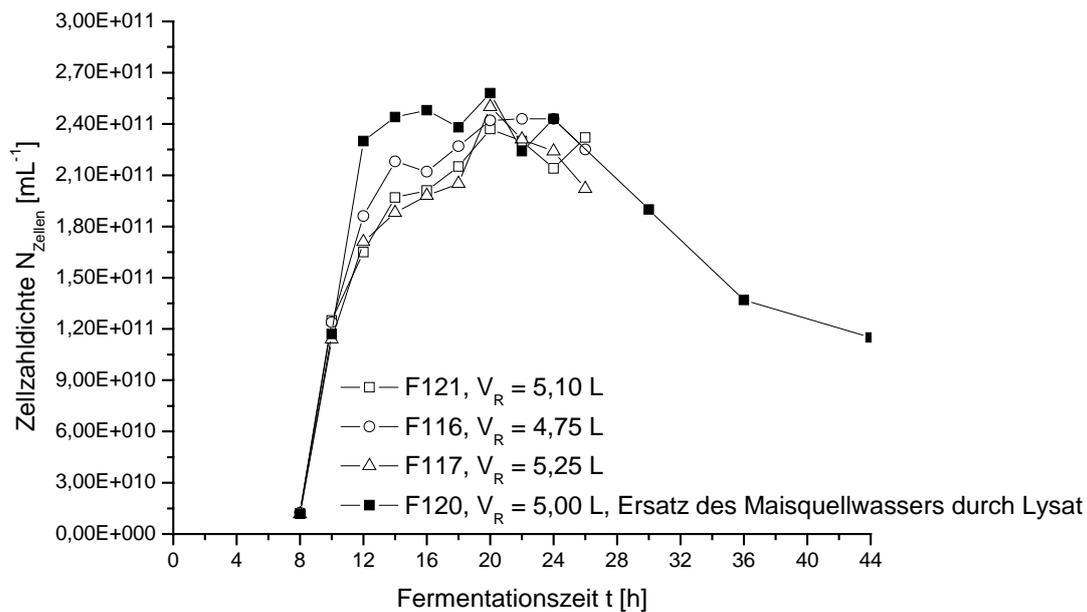


Abbildung 7.27: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit Maisquellwasser (F116, F117 und F121) und Ersatz des Maisquellwassers durch Lysat (F120)

Die Biomassebildung, die über die Zellzahldichte und indirekt über die Kohlendioxidkonzentration verfolgt wurde, begann nach etwa zwei Stunden und war nach 12 Stunden weitgehend abgeschlossen. Anhand des Kohlendioxidsignals und der Sauerstoffsättigung ließen sich in Kombination mit den Größen der Substratanalytik die Vorgänge während der Wachstumsphase erklären. Während des Wachstums kam es durch die Verstoffwechslung des Stärkehydrolysats als Kohlenstoffquelle zu einem starken Anstieg der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft. Dabei wurde zunächst die durch die enzymatische Hydrolyse der Stärke ins Medium gebrachte Glucose verstoffwechselt (**Abbildung 7.28**). Da die Glucose zu den reduzierenden Zuckern gehört, sank auch die Konzentration an diesen Zuckern. Nach etwa sechs Stunden war die Glucose verbraucht. Dies führte zu einem kurzen Abfall der Kohlendioxidkonzentration und einer ansteigenden Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium, was beides auf eine Reduzierung der Stoffwechselaktivität hindeutete. Im weiteren Verlauf stieg die Glucosekonzentration in Folge der Freisetzung durch die Hydrolyse der Stärkebruchstücke wieder an. Am Ende der Wachstumsphase reduzierte sich ihre Konzentration vollständig. Die Konzentration an reduzierenden Zuckern sank, wie bereits bei den Kultivierungen mit KF-Medium beobachtet, bis zum Ende der Kultivierung nicht vollständig.

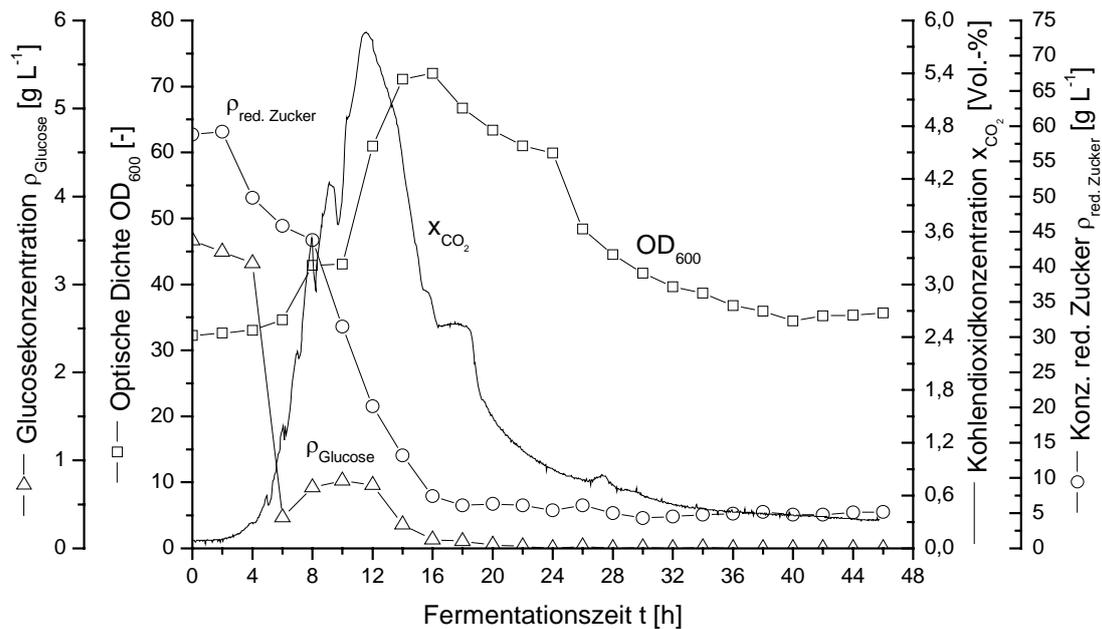


Abbildung 7.28: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Ersatz des Maisquellwassers durch Lysat (F120)

In der Wachstumsphase kam es nicht nur zur Reduzierung der Hauptkohlenstoffquelle sondern auch der organischen Stickstoffquelle, die in Form der gelösten Proteine vorlag. Nach etwa 12 Stunden wurde das Wachstum eingestellt. Die Kohlendioxidkonzentration sank stark und die gelöste Sauerstoffkonzentration stieg an. Der Übergang in die stationäre Phase bezüglich des Wachstums ging nicht einher mit dem vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle. Im Folgenden traten die Zellen in die Produktionsphase ein.

Ausgelöst durch einen beginnenden Stickstoffmangel versuchten die Zellen durch Freisetzung der Protease eine neue Stickstoffquelle nutzbar zu machen. Während der Produktionsphase sank die Konzentration an reduzierenden Zuckern nur geringfügig. In der flüssigen Phase konnte ein Anstieg der Proteinkonzentration festgestellt werden (**Abbildung 7.29**). Hierbei wird es sich um die Protease gehandelt haben. Gekennzeichnet wurde die zweite Hälfte der Fermentation darüber hinaus durch die Abnahme der optischen Dichte, der Zellzahldichte und der Kohlendioxidkonzentration in der Abluft.

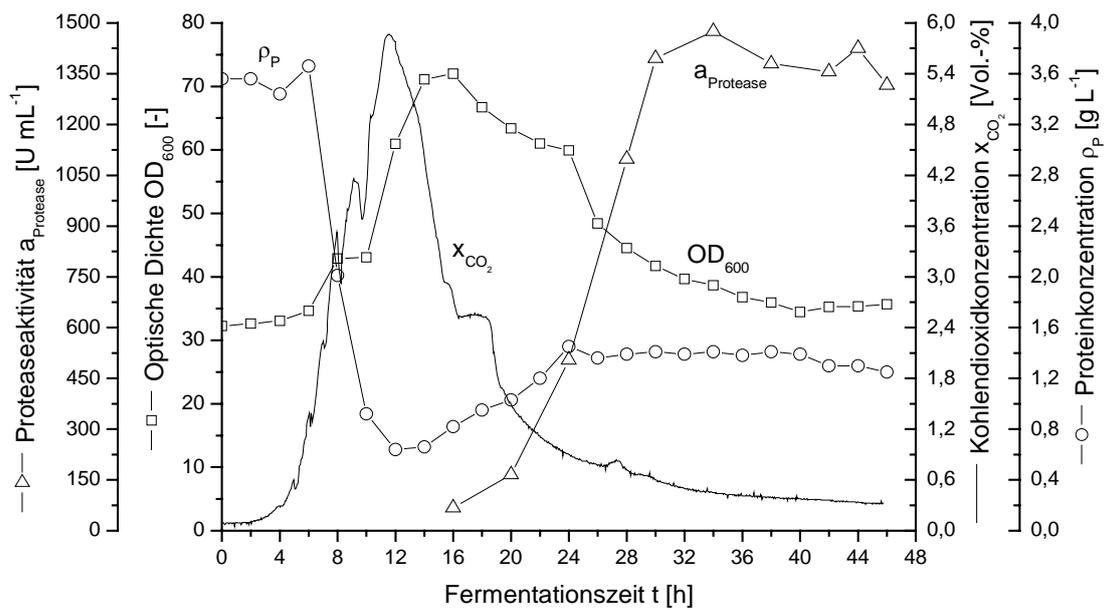


Abbildung 7.29: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Ersatz des Maisquellwassers durch Lysat (F120)

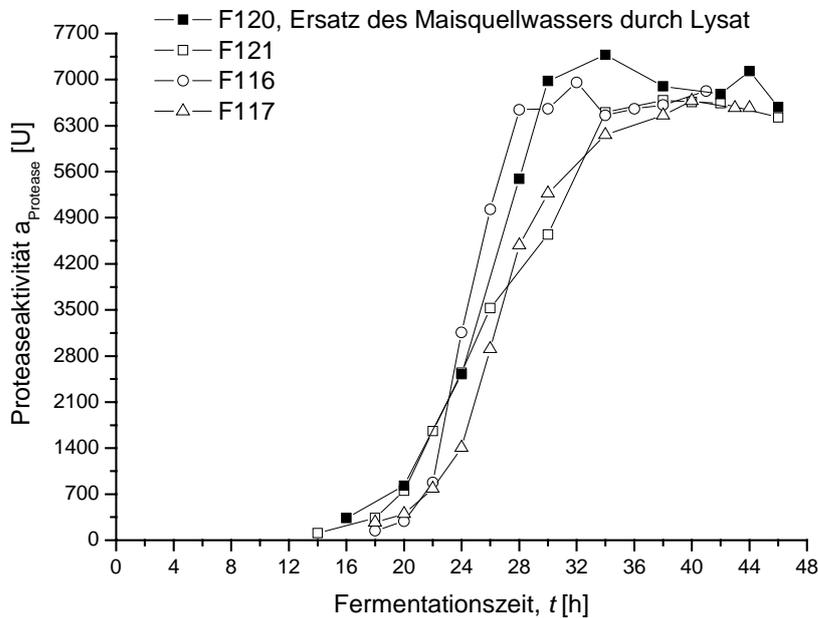


Abbildung 7.30: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit Maisquellwasser (F116, F117 und F121) und Ersatz des Maisquellwassers durch Lysat (F120)

Aus **Abbildung 7.30** lässt sich entnehmen, dass die Proteasebildung durch die Verwendung von Zelllysat nicht negativ beeinflusst wurde. Die erreichte maximale Aktivität lag mit 7376 U mL^{-1} nach 34 Stunden deutlich höher, was in Übereinstimmung mit der erhöhten Zellzahl stand (**Abbildung 7.27**) und zu einer Produktivität von $216,9 \text{ U h}^{-1}$ führte. Die erreichten Aktivitäten auf dem KF-Medium lagen zwischen 6680 U und 6960 U , was Produktivitäten zwischen $167,0 \text{ U h}^{-1}$ und $217,5 \text{ U h}^{-1}$ entsprach.

Die nachfolgenden vier Tabellen zeigen die Ergebnisse der Kohlenstoff- und Stickstoffbilanzierung in der gewohnten Form. In der jeweils dritten Spalte sind die Mittelwerte aus den in **Kapitel 7.4** bilanzierten Kultivierungen auf dem KF-Medium angegeben.

Tabelle 7.10: Theoretische und analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit und ohne Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L

Fermentation	KF-Medium mit Lysat (F120)	KF-Medium ohne Lysat
Kohlenstoff, analytisch	240,5 g (99,3 %)	235,2 g (100,5 %)
→ davon Kohlenstoff im Überstand	206,8 g (86,0 %)	205,0 g (86,8 %)
→ davon Kohlenstoff im Pellet	33,7 g (14,0 %)	30,2 g (12,8 %)
Kohlenstoff, rechnerisch	242,3 g (100 %)	234,1 g (100 %)
Differenz (analytisch - rechnerisch)	-1,8 g (-0,7 %)	1,1 g (0,4 %)

Tabelle 7.11: Theoretische und analytisch ermittelte Stickstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit und ohne Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L

Fermentation	KF-Medium mit Lysat (F120)	KF-Medium ohne Lysat
Stickstoff, analytisch	23,0 g (97,5 %)	21,6 g (94,7 %)
→ davon Stickstoff im Überstand	15,6 g (67,8 %)	15,0 g (69,3 %)
→ davon Stickstoff im Pellet	7,5 g (32,6 %)	6,3 g (29,3 %)
Stickstoff, rechnerisch	23,6 g (100 %)	22,8 g (100 %)
Differenz (analytisch - rechnerisch)	-0,6 g (-2,5 %)	-1,2 g (-5,4 %)

Die Bilanzierung zeigte keine großen Abweichungen in der Verteilung des Kohlenstoffs und Stickstoffs zu den bestimmten Zeitpunkten. Darüber hinaus wurde durch das Lysat der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt im Medium kaum erhöht.

Tabelle 7.12: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit und ohne Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Kohlenstoffmassen aus **Tabelle 7.10**

Fermentation	KF-Medium mit Lysat (F120)	KF-Medium ohne Lysat
Kohlenstoff, Überstand	80,8 g (33,6 %)	67,2 g (28,4 %)
Kohlenstoff, Pellet	45,4 g (18,9 %)	52,7 g (22,1 %)
Kohlendioxid Abluft	147,0 g (61,1 %)	125,4 g (52,9 %)
Summe C, analytisch	273,2 g (113,6 %)	245,4 g (103,4 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	32,7 g (13,6 %)	7,9 g (3,4 %)

Tabelle 7.13: Verteilung des Stickstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit und ohne Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen aus **Tabelle 7.11**

Fermentation	KF-Medium mit Lysat (F120)	KF-Medium ohne Lysat
Stickstoff, Überstand	13,1 g (57,0 %)	11,7 g (54,7 %)
Stickstoff, Pellet	6,0 g (26,1 %)	7,1 g (33,1 %)
Summe N, analytisch	19,1 g (83,0 %)	18,9 g (87,9 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-4,0 g (-17,0 %)	-2,7 g (-12,1 %)

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Ersatz des Maisquellwassers in der hier durchgeführten Form durch ein *Bacillus*-Zelllysat möglich ist. Es konnten keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum und auf die Produktbildung beobachtet werden.

7.6.2 Teilersatz des Sojapeptons

Ziel dieser Fermentationen war es die Hälfte des Sojamehls des komplexen KF-Mediums bei einem Arbeitsvolumen von 4 L durch *Bacillus licheniformis*-Zelllysate zu ersetzen. Die Lysate wurden auf drei unterschiedliche Arten hergestellt:

- Autolyse,
- Hochdruckaufschluss mit anschließender Autolyse und
- alkalische Hydrolyse.

Nach beendeter Lyse wurde in den ersten beiden Verfahren das Lysat durch einen Zentrifugationsschritt geklärt und das erhaltene klare Lysat als Teilersatz für das Sojamehl im KF-Medium eingesetzt. Bei der alkalischen Hydrolyse erfolgte keine fest-flüssig Trennung. In diesem Fall diente der komplette Ansatz als Mediumbestandteil. Die Charakterisierung und Herstellung der drei Lysate lässt sich in **Kapitel 7.5** nachlesen.

Die drei durchgeführten Fermentationen mit der Bezeichnung F118, F119 und F122 unterschieden sich also lediglich in der Lysatherstellung. Es wurde jeweils die Hälfte des Sojamehls durch das Lysat ersetzt. Die Fermentationsparameter entsprachen denen auf dem KF-Medium.

Die Auswertung beginnt mit der Betrachtung der Zellzahldichte. **Abbildung 7.31** zeigt die Entwicklung der Zellzahldichte für die Fermentationen auf dem KF-Medium mit und ohne Lysateinsatz. Die maximale Zellzahldichte wurde nach 20 Stunden bis 22 Stunden erreicht und lag zwischen $2,0 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$ und $2,5 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$. Eine verminderte Biomassebildung konnte damit bei Einsatz der drei Lysate nicht festgestellt werden.

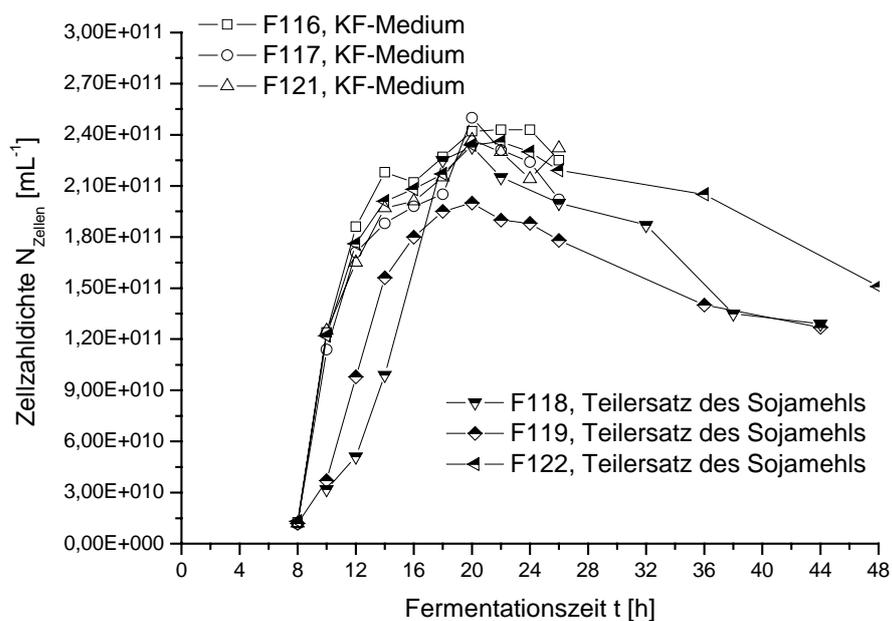


Abbildung 7.31: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F116, F117 und F121) und bei Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F118, F119 und F122)

Die wichtigste Prozessgröße zeigt **Abbildung 7.32**. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die absolute Proteaseaktivität aufgetragen. **Tabelle 7.14** sind die maximal erreichten Aktivitäten zu entnehmen.

Tabelle 7.14: Maximal erreichte Proteaseaktivität bei der satzweisen Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium bei Teilersatz des Sojamehls durch verschiedene Lysate

Art der Lyse	Fermentation	Proteaseaktivität a_{Protease} [U]	Produktivität P [U h ⁻¹]
Autolyse	F118	6565	182,4
Hochdruckaufschluss mit Autolyse (drei Passagen bei 400 bar)	F119	5610	127,5
Alkalische Hydrolyse	F122	6906	191,8
KF-Medium	F116, F117 und F121	6680 - 6960	167,0 - 217,5

Bei Verwendung von Lysat als Teilersatz für das Sojamehl gab es bezüglich der Proteaseaktivität unterschiedliche Ergebnisse (**Tabelle 7.14**). Während der Kultivierung F118 führte die Reduzierung des Anteils an Sojamehl und die Lysatzugabe (autolytisch gewonnenes Lysat) mit 6560 U zu einem vergleichbaren Ergebnis. Bei der Kultivierung F119, bei der ein durch einen Hochdruckaufschluss und anschließender Autolyse gewonnenem Lysat zum Einsatz kam, sank die maximal erreichte Proteaseaktivität auf 5610 U. Durch die Verwendung des Lysates für F122 wurde eine Aktivität von 6906 U erreicht.

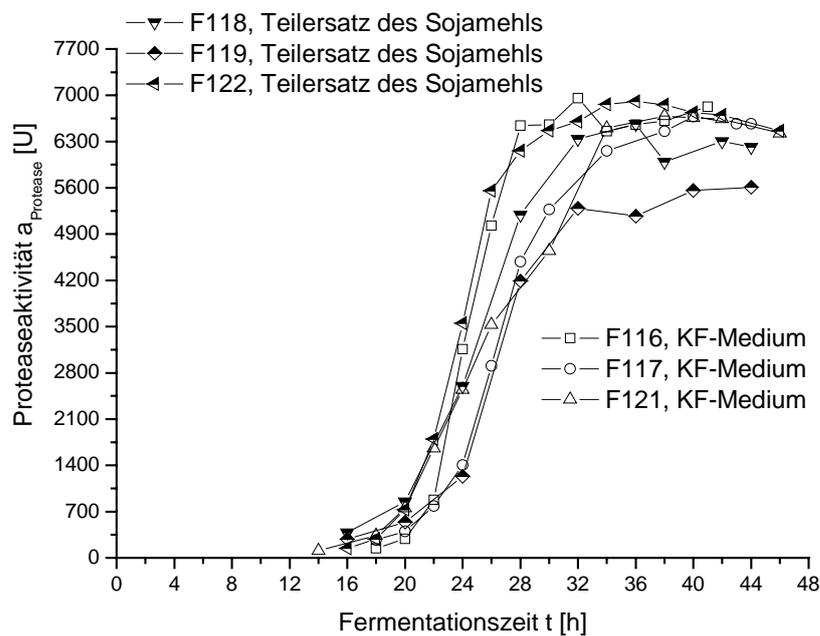


Abbildung 7.32: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium (F116, F117 und F121) und bei Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F118, F119 und F122)

Im Folgenden sind zu den drei durchgeführten Fermentationen mit Lysat (F118, F119 und F122) je zwei Abbildungen mit der grafischen Auftragung der wichtigsten Messgrößen aufgeführt.

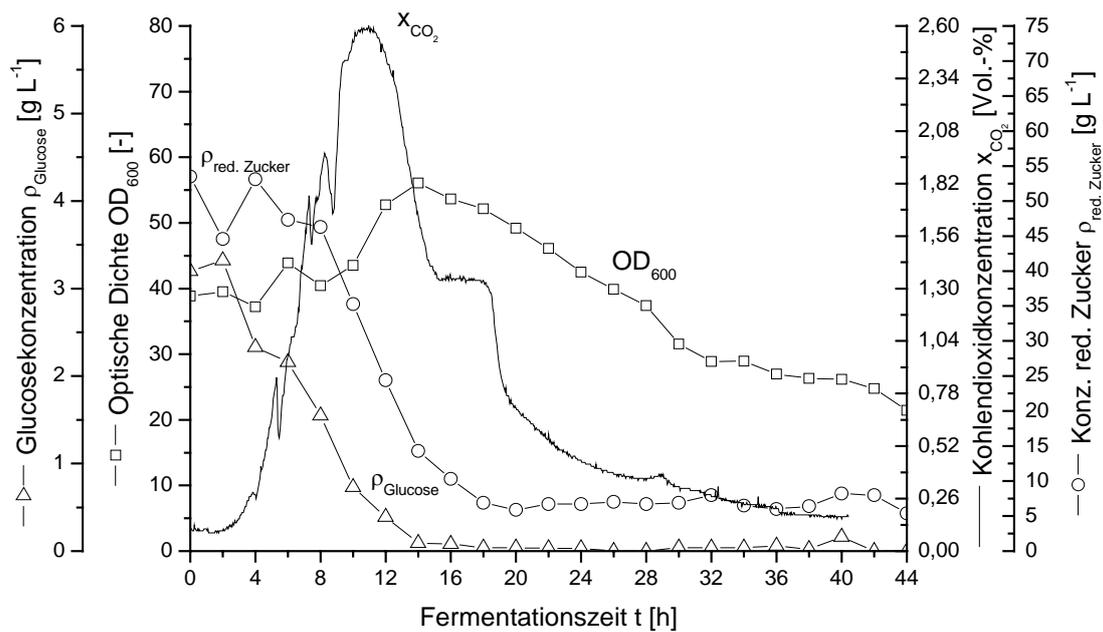


Abbildung 7.33: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F118)

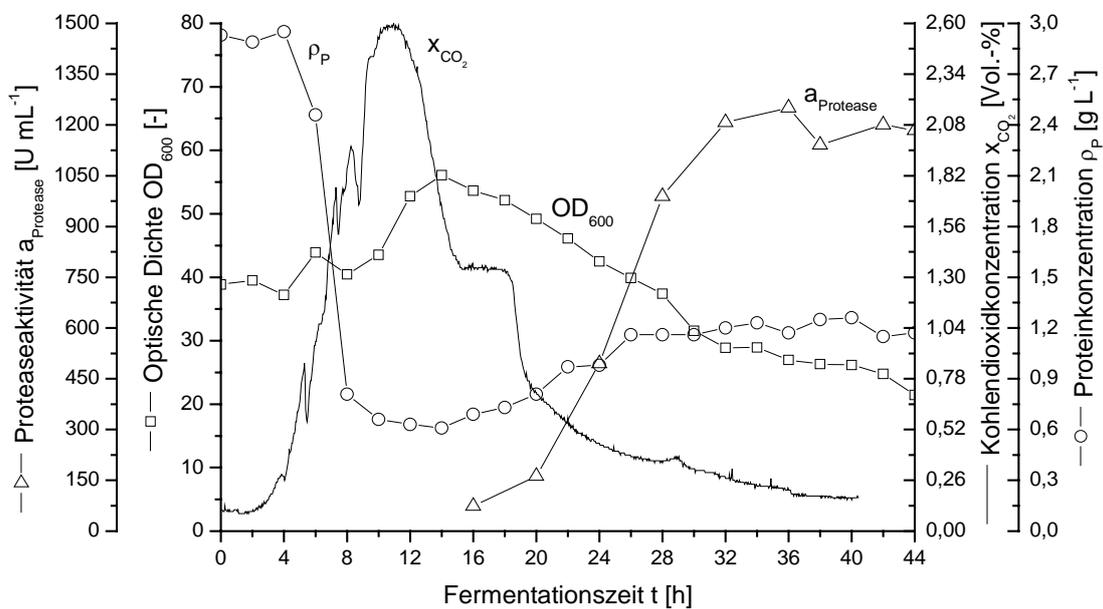


Abbildung 7.34: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F118)

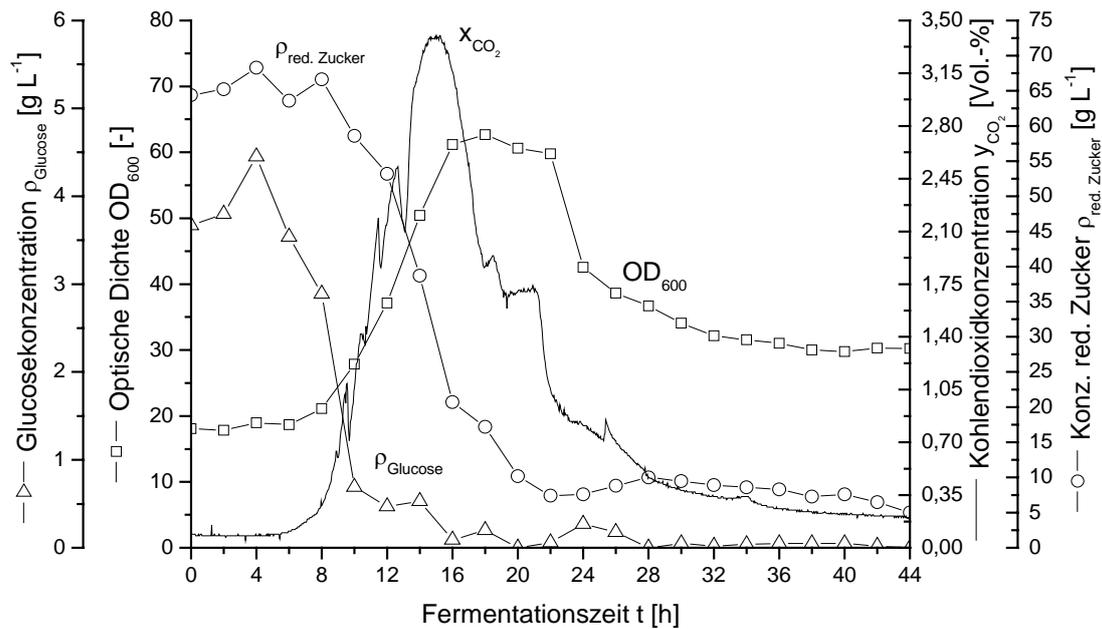


Abbildung 7.35: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F119)

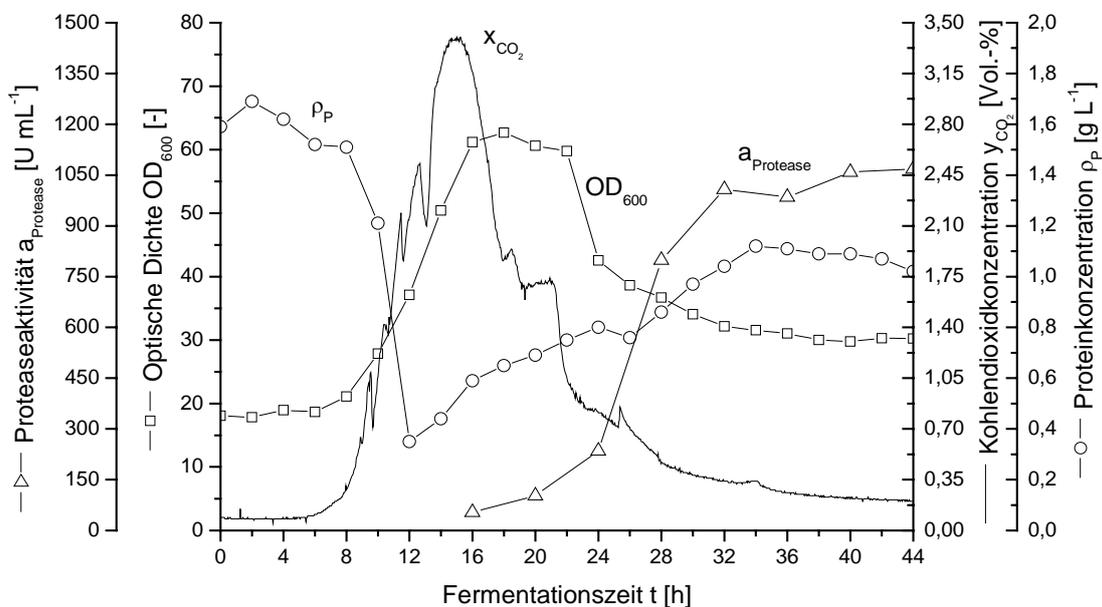


Abbildung 7.36: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F119)

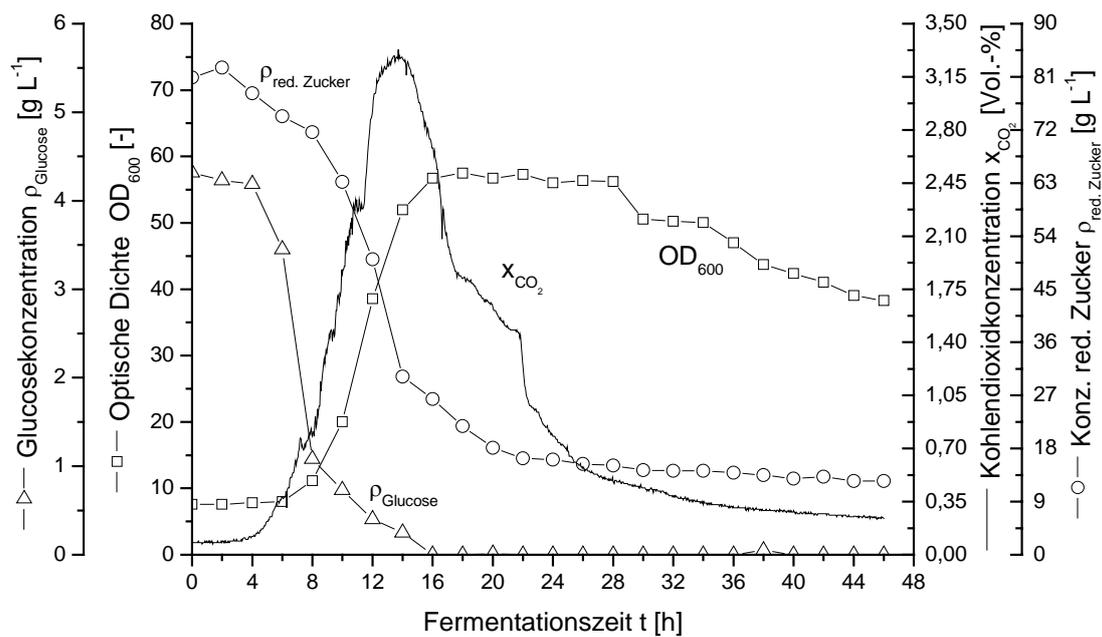


Abbildung 7.37: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F122)

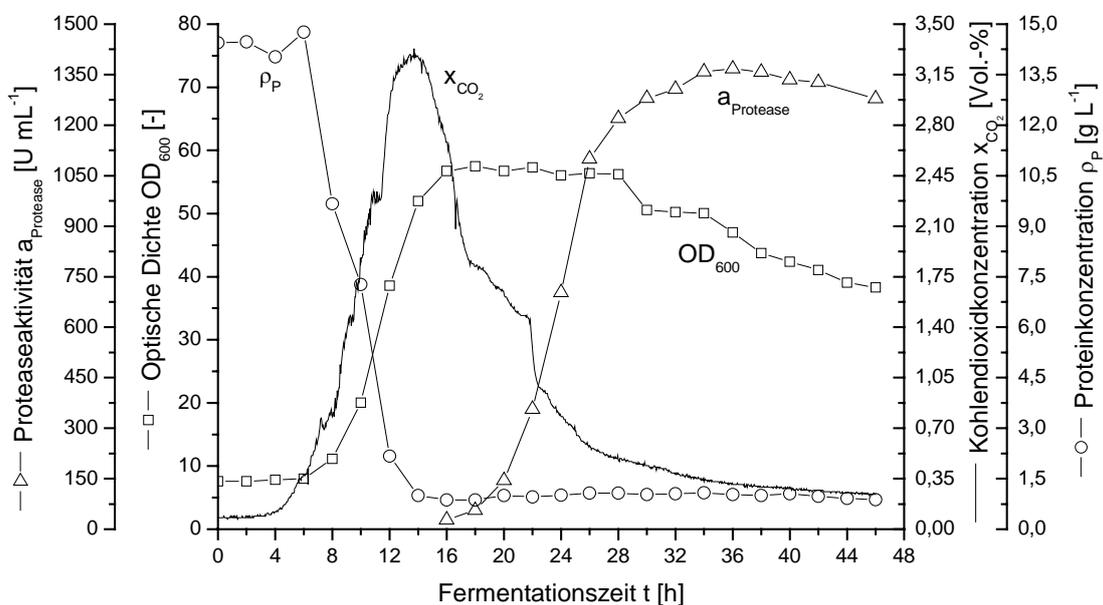


Abbildung 7.38: Satzweise Fermentation von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium, Teilersatz des Sojamehls durch Lysat (F122)

Die Bilanzierungen für die drei Fermentationen mit Lysat erfolgten nach dem bereits in **Kapitel 7.4** vorgestellten Schema für die Kultivierungen auf dem KF-Medium. **Tabelle 7.15** zeigt nochmals die Art der Lyse und die Nummer der Fermentation, in der das Lysat eingesetzt wurde.

Tabelle 7.15: Übersicht über die Art der Lyse, die Angabe der Fermentation, in der das Lysat als Mediumbestandteil eingesetzt wurde und Angabe der ersetzten Komponente im Medium

Art der Lyse	Einsatz des Lysates
Autolyse	F118
Hochdruckaufschluss mit Autolyse (drei Passagen bei 400 bar)	F119
Alkalische Hydrolyse	F122

Tabelle 7.13 zeigt die Verhältnisse für den Kohlenstoff und **Tabelle 7.14** die Verhältnisse für den Stickstoff jeweils zu Beginn der Kultivierung. Im Vergleich zum KF-Medium ohne Lysat konnten für die Fermentationen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der anfänglich vorgelegten Kohlenstoff- und Stickstoffmassen erkannt werden. In Bezug auf diese beiden Größen konnte somit auf gleiche Startbedingungen geschlossen werden.

Die Verteilung der Elemente zwischen den Phasen zeigte für F118 und F119 keine Unterschiede im Vergleich zum KF-Medium. F122 zeigte hingegen ein anderes Bild. Sowohl der prozentuale Anteil des Kohlenstoffs als auch der des Stickstoffs in der festen Phase lag unter 10 % und damit deutlich niedriger als auf dem KF-Medium. Wie sich zeigte, hatte dies aber keinen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung.

Tabelle 7.16: Theoretische und analytisch ermittelte Kohlenstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L

Fermentation	F118	F119	F122	KF-Medium ohne Lysat
Kohlenstoff, analytisch	235,4 g (102,2 %)	229,7 g (98,2 %)	225,0 g (100,1 %)	235,2 g (100,5 %)
→ davon Kohlenstoff im Überstand	209,6 g (89,0 %)	205,9 g (89,6 %)	208,4 g (92,6 %)	205,0 g (86,8 %)
→ davon Kohlenstoff im Pellet	25,8 g (11 %)	23,8 g (10,4 %)	16,7 g (7,4 %)	30,2 g (12,8 %)
Kohlenstoff, rechnerisch	230,0 g (100 %)	234,0 g (100 %)	224,7 g (100 %)	234,1 g (100 %)
Differenz (analytisch - rechnerisch)	5,4 g (2,2 %)	-4,3 g (-1,8 %)	0,4 g (0,1 %)	1,1 g (0,4 %)

Tabelle 7.17: Theoretische und analytisch ermittelte Stickstoffmasse (absolut und relativ) vor dem Animpfen bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L

Fermentation	F118	F119	F122	KF-Medium ohne Lysat
Stickstoff, analytisch	22,5 g (100 %)	22,3 g (100,9 %)	20,5 g (96,7 %)	21,6 g (94,7 %)
→ davon Stickstoff im Überstand	16,6 g (73,8 %)	17,5 g (78,5 %)	18,6 g (90,7 %)	15,0 g (69,3 %)
→ davon Stickstoff im Pellet	6,0 g (26,7 %)	4,7 g (21,1 %)	2,0 g (9,8 %)	6,3 g (29,3 %)
Stickstoff, rechnerisch	22,5 g (100 %)	22,1 g (100 %)	21,2 g (100 %)	22,8 g (100 %)
Differenz (analytisch - rechnerisch)	0,0 g (0 %)	0,2 g (0,9 %)	-0,7 g (-3,3 %)	-1,2 g (-5,4 %)

Tabelle 7.18 und **Tabelle 7.19** sind die Verhältnisse am Ende der Kultivierung zu entnehmen. Teilweise ergaben sich große Abweichungen bei der Summierung der Gehalte und dem Vergleich mit den anfänglich vorgelegten Massen, was eine Beurteilung schwierig gestaltete.

Tabelle 7.18: Verteilung des Kohlenstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Kohlenstoffmassen aus **Tabelle 7.16**

Fermentation	F118	F119	F122	KF-Medium ohne Lysat
Kohlenstoff, Überstand	72,9 g (31,0 %)	92,5 g (40,3 %)	72,3 g (32,1 %)	67,2 g (28,4 %)
Kohlenstoff, Pellet	41,3 g (17,5 %)	51,6 g (22,5 %)	30,5 g (13,6 %)	52,7 g (22,1 %)
Kohlendioxid Abluft	70,7 g (30,0 %)	83,1 g (36,2 %)	93,2 g (41,4 %)	125,4 g (52,9 %)
Summe C, analytisch	185,0 g (78,6 %)	227,1 g (98,9 %)	196,0 g (87,1 %)	245,4 g (103,4 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-50,4 g (-21,4 %)	-2,5 g (-1,1 %)	-29,1 g (-12,9 %)	7,9 g (3,4 %)

Tabelle 7.19: Verteilung des Stickstoffs zum Zeitpunkt der Zellernte bei der satzweisen Kultivierung von *Bacillus licheniformis* P300 auf dem komplexen KF-Medium mit Lysat und einem Arbeitsvolumen von 4 L. Die in Klammern gesetzten Prozentangaben beziehen sich auf die anfänglich analytisch ermittelten Stickstoffmassen aus **Tabelle 7.17**

Fermentation	F118	F119	F122	KF-Medium ohne Lysat
Stickstoff, Überstand	13,6 g (60,4 %)	14,3 g (64,1 %)	11,7 g (57,1 %)	11,7 g (54,7 %)
Stickstoff, Pellet	5,4 g (24,0 %)	6,3 g (28,3 %)	6,5 g (31,7 %)	7,1 g (33,1 %)
Summe N, analytisch	19,0 g (84,4 %)	20,6 g (92,4 %)	18,2 g (88,8 %)	18,9 g (87,9 %)
Differenz zur vorgelegten Masse zum Startzeitpunkt (Ende - Anfang)	-3,5 g (-15,6 %)	-1,7 g (-7,6 %)	-2,3 g (-11,2 %)	-2,7 g (-12,1 %)

7.7 Zusammenfassung

Der für die Arbeiten herangezogene *Bacillus licheniformis* P300 Stamm ist ein Organismus zur Produktion der alkalischen Protease Subtilisin Carlsberg.

Begonnen wurden die Arbeiten mit der Gewinnung von *Bacillus licheniformis*-Biomasse für die Lyseversuche im Schüttelkolbenmaßstab. Dazu wurden zwei Kultivierungen auf HSG-Medium im Rührkesselreaktor durchgeführt.

Die Lyseversuche zeigten, dass es möglich ist, die Zellen unter den gewählten Prozessbedingungen effektiv aufzuschließen. So konnte bereits durch das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturen in einem Bereich von 25 °C bis 55 °C Lysegrade von bis zu 89 % erzielt werden. Dabei konnte die Proteinkonzentration auf unter 0,5 g L⁻¹ gesenkt werden. Bei der alkalischen Hydrolyse wurde Biomasse aus Fermentationen auf KF-Medium verwendet. Hierbei wurde durch die unvollständige Trennung von Biomasse und nicht verwerteten Bestandteilen bei der Zellernte ein Teil dieser Komponenten mit in die Lyseansätze eingetragen. Da die unverwerteten Bestandteile durch die gewählten Bedingungen nicht hydrolysiert wurden und damit nicht in Lösung gegangen waren, kam es zu Lysegraden von maximal 41 %. Mikroskopische Betrachtungen deuteten jedoch auf höhere Lysegrade bezüglich der Zellen hin. Durch eine Zentrifugationsschritt ließen sich jedoch klare Lysate gewinnen.

Zahlreiche Fermentationen des *Bacillus licheniformis*-Stammes auf dem komplexen Produktionsmedium (KF-Medium) führten zu einer Vielzahl von Daten mit deren Hilfe das System ausreichend charakterisiert werden konnte. Die Kultivierungen zeigten eine deutliche Teilung in eine Phase des Wachstums mit nur geringer Proteaseaktivität und eine Phase der Produktbildung. Die erreichten absoluten Proteaseaktivitäten lagen zwischen 6680 U und 6960 U. Mit Hilfe von Bilanzierungen des Kohlenstoffs und Stickstoffs konnte deren Verteilung zwischen den Phasen während der gesamten Fermentation gezeigt werden. Der zu Beginn vorgelegte Kohlenstoff lag zu 12,8 % in der festen Phase vor. Quellen des Kohlenstoffs waren die Maisstärke (61,2 %), das Natriumcaseinat (21,9 %), das Sojamehl (13,9 %) und das Maisquellwasser (2,4 %). Der anfänglich vorgelegte Stickstoff verteilte sich zu 30,7 % in der festen und zu 69,5 % in der flüssigen Phase. Dazu trugen das Caseinat mit 69,0 %, das Sojamehl mit 28,7 %, das Maisquellwasser mit 6,5 % und das Ammoniumdihydrogenphosphat mit 1,1 % bei. Am Ende der Fermentation fand sich der Kohlenstoff zu 23,1 % in der festen Phase, zu

27,6 % in der flüssigen Phase und zu 52,9 % in der Abluft. Der Stickstoff lag zu 58,4 % in der flüssigen Phase und zu 34,2 % in der festen Phase vor.

Die Lysatherstellung für Wachstumsversuche wurde mit Biomasse durchgeführt, die aus Kultivierungen auf KF-Medium gewonnen wurde. Die im Schüttelkolbenmaßstab erreichten Lysegrade konnten aufgrund der bereits erwähnten Problematik unlöslicher KF-Mediumsbestandteile nicht erzielt werden. Dennoch konnten die Zellen effektiv aufgeschlossen werden. Vier Lysate wurden mittels unterschiedlicher Verfahren gewonnen und als Mediumsbestandteil eingesetzt.

Durch eine eingehende Lysanalytik konnten die Lysate charakterisiert werden. Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der *Bacillus licheniformis*-Lysate lag zwischen 38,2 - 43,4 %TS bzw. zwischen 6,7 - 9,1 %TS. Der DNA-Gehalt lag zwischen 0,28 - 0,45 %TS. Die Summierung der Aminosäuregehalte ergab, dass beim durch Autolyse gewonnenen Lysat 30,1 % des Trockenstoffs aus Aminosäuren bestand. Durch den Hochdruckaufschluss mit anschließender Autolysephase wurden Lysate mit 18,1 %TS und 18,5 %TS Aminosäuren erhalten. Die alkalische Hydrolyse führte zu einem Aminosäuregehalt von 20,4 %TS. Die Proteinkonzentration lag zwischen 0,87 - 2,82 %TS.

Schließlich konnte durch den Einsatz der Lysate als Ersatz für unterschiedliche Mediumsbestandteile gezeigt werden, dass der Austausch des Maisquellwassers durch ein autolytisch gewonnenes Zelllysat ohne negativen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung möglich ist. Die erreichte absolute Proteaseaktivität lag bei 7376 U sogar geringfügig über den Ergebnissen der Referenzkultivierungen. Weitere Fermentationen gaben Hinweise darauf, dass auch der Ersatz der Hälfte des Sojamehls durchführbar ist. Es zeigten sich Unterschiede in der erreichten Proteaseaktivität bei Einsatz von Lysaten, die durch verschiedene Verfahren gewonnen wurde. In keiner der vier betrachteten Fälle kam es zu negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen. Die höchsten Aktivitäten ließen sich mit einem durch alkalische Hydrolyse gewonnenem Lysat erzielen.

Die Arbeiten mit dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus licheniformis* P300 zeigten an einem weiteren industrienahen Beispiel die Möglichkeit eines alternativen Einsatzes bakteriellen Biomasseabfalls. Es konnte gezeigt werden, dass durch einfache im großen Maßstab

durchführbare Verfahren Lysate hergestellt werden können, die sich als Ersatz für konventionelle Substrate ohne negative Auswirkungen auf wichtige Prozessgrößen eignen.

8 Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, alternative Wege für die bei der fermentativen Gewinnung von Bulk-Produkten anfallenden Biomasseströme zu entwickeln. Dazu wurde ein in der Arbeitsgruppe seit Jahren verfolgter Ansatz aufgegriffen: Die anfallende Biomasse wurde aufgeschlossen und als Medienbestandteil in den Fermentationsprozess zurückgeführt. Für die Untersuchungen standen drei Organismen, darunter zwei industriell relevante, zur Verfügung. Begonnen wurde mit einem *Klebsiella planticola*-Stamm. Für weitere Untersuchungen kam mit dem *Escherichia coli*-Stamm B-3996 ein *L*-Threoninproduzent zum Einsatz. Als drittes wurde mit dem *Bacillus licheniformis*-Stamm P300, ein Vertreter der Gram-positiven Bakterien, gearbeitet. Mit ihm wurde ein Hochleistungsstamm zur Produktion der alkalischen Protease Subtilisin Carlsberg genutzt.

Die im kleinen Maßstab durchgeführten Lyseversuche führten zur Entwicklung geeigneter Verfahren zur Behandlung der anfallenden Biomasseabfälle. Die entwickelten Aufschlussverfahren stellten einen Kompromiss aus verfahrenstechnischen Ansprüchen, Ökonomie und Lysequalität dar. Für die *Klebsiella planticola* und die *Escherichia coli*-Zellen wurde ein aus einem mechanischen Hochdruckaufschluss (je drei Passagen bei 600 bar bzw. 800 bar) und einer nachgeschalteten enzymatischen Behandlung (55 °C, pH 8,5) mit einer alkalischen Protease zusammengesetztes Verfahren entwickelt. Die erreichten Lysegrade lagen bei 77 % bzw. 75 %. Der Einsatz der technischen Proteaselösung konnte auf unter 1 Liter pro Tonne Biotrockenmasse gesenkt werden. Die Lyseversuche der *Bacillus licheniformis*-Zellen zeigten u. a., dass durch das sukzessive Durchlaufen verschiedener Temperaturen in einem Bereich von 25 °C bis 55°C Lysegrade von bis zu 89 % erzielt werden konnten.

Mit Hilfe der Lysatanalytik konnte das jeweilige Lysat ausreichend charakterisiert werden. Durch die bis zu neun Messgrößen umfassende Analytik konnte eine gleichbleibende Lysatqualität gezeigt werden.

Der Ersatz des Hefeextraktes in einem halbsynthetischen Medium durch ein *Klebsiella*-Lysat konnte erfolgreich umgesetzt werden. Neun zyklische Rückführungen zeigten keinen negativen Einfluss auf das Wachstum. Eine deutliche höhere Biomassenbildung war mit Zunahme der Zykluszahl zu verzeichnen. Dies bietet gerade für eine biomasseabhängige Produktbil-

dung interessante Möglichkeiten, da ein Mehr an Biomasse auch zur Bildung größerer Produktmengen führen kann.

Fermentationen des *Escherichia coli*-Stammes auf dem Medium A1-160 mit Hefeextrakt als komplexe Komponente führten zu Produktivitäten in Bezug auf das Threonin von $0,95 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der Ersatz der ursprünglich durch den Hefeextrakt in das Medium eingetragene Stickstoff- und Kohlenstoffmasse durch Lysat führte zu keinen negativen Auswirkungen auf Wachstum und Produktbildung. Die in Bezug auf das Threonin erzielten Produktivitäten lagen durchschnittlich bei $0,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die bestimmten Ertragskoeffizienten zeigten im Vergleich zu denen auf Originalmedium keine signifikanten Unterschiede.

Die Fermentationen des *Bacillus licheniformis*-Stammes auf einem komplexen Produktionsmedium führten zu einer durchschnittlichen absoluten Proteaseaktivität von 6777 U mL^{-1} und einer Produktivität von 187 U h^{-1} . Durch den Einsatz von *Bacillus*-Lysaten als Ersatz für unterschiedliche Medienbestandteile konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Maisquellwassers durch ein autolytisch gewonnenes Zelllysat ohne negativen Einfluss auf das Wachstum und die Produktbildung möglich ist. Die erreichte absolute Proteaseaktivität lag bei 7376 U , die Produktivität bei 217 U h^{-1} . Weitere Fermentationen gaben Hinweise darauf, dass auch der Ersatz der Hälfte des Sojamehls durchführbar ist. In keinen der betrachteten Fällen kam es zu negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen. Die höchsten Aktivitäten ließen sich mit einem durch alkalische Hydrolyse gewonnenem Lysat erzielen. Hier lag die absolute Proteaseaktivität bei 6906 U und die Produktivität bei 192 U h^{-1} .

Durch die Arbeiten an den drei untersuchten Beispielsystemen konnte eindrucksvoll und erfolgreich die Möglichkeit einer alternativen Verwendung bakterieller Biomasse gezeigt werden. Es konnte dargestellt werden, dass durch einfache im großen Maßstab durchführbare Verfahren Lysate hergestellt werden können, die sich als Ersatz für konventionelle Substrate ohne negative Auswirkungen auf wichtige Prozessgrößen eignen. Die Durchführbarkeit einer Rückführung von bakterieller Biomasse in den ursprünglichen Fermentationsprozess konnte mit Hilfe dieser Arbeit belegt werden. Der Verzicht auf konventionelle Extrakte führte zu einer Senkung des Rohstoffbedarfs und zu einer Reduzierung der bakteriellen Abfallmenge. Die ökonomische Beurteilung der Verfahren sowie die Übertragung der Ergebnisse auf andere Produktgruppen, bei denen durch die fermentative Gewinnung große Mengen an Biomasseabfall anfallen, obliegen nun der Industrie.

9 Literaturverzeichnis

I. AGERKVIST & S. O. ENFORS: Characterization of *E. coli* cell disintegrates from bead mill and high pressure homogenizers. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1083-1089, 1990

B. A. ANDREWS & J. A. ASENJO: Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends Biotechnol.*, **5**, 273-277, 1987

ANKERFARM; DE 1 467 764, 1968

P. ARGOS: A sensitive procedure to compare amino acid sequences. *J. Mol. Biol.*, **193**, 385-396, 1987

I. ASHIE, T. L. SORENSEN & P. M. NIELSEN: Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *J. Food Sci.*, **67** (6), 2138-2142, 2002

B. ATKINSON & F. Mavituna: Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Stockton Press, 1991

M. I. AUSTERMUHLE, J. A. HALL & A. L. DAVIDSON: Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport. *J. Biol. Chem.*, **279** (27), 28243-28250, 2004

P. S. R. BABU & T. PANDA: Effect of recycling of fermentation broth for the production of penicillin amidase. *Process Biochem.*, **26**, 7-14, 1991

M. J. BAILEY: A note on the use of dinitrosalicylic acid reagent for determining the products of enzymatic reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 494-496, 1988

N. F. BAKER; GB 649 818, 1951

W. BALTES: Lebensmittelchemie. Springer Verlag, 2000

W. BALTES: Über Zusammensetzung und Nachweis von Hefeextrakten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **145** (3), 149-155, 1970

A. J. BARRETT: Classification of peptidases. *Methods Enzymol.*, **244**, 1-15, 1994

P. A. BELTER, E. L. CUSSLER & W. S. HU: Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology. Wiley Verlag, 77-97, 1988

J. A. BENCKISER; DE 1 000 572, 1957

J. A. BENCKISER; DE 1 103 735, 1961

A. BERG, M. PETERS, P. DEIBERT, D. KÖNIG & H. BIRNESSER: Bromelain - Übersicht und Diskussion zur therapeutischen Anwendung und seiner Bedeutung in der Sportmedizin und Sporttraumatologie. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, **56** (1), 12-19

H. DILLER: Hefeextrakte, ihre Herstellung, Untersuchung und Beurteilung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **83** (3), 206-218, 1942

A. BÖHM: Untersuchungen zur Proteolyse von para- κ -Casein: vom Modell zum Käse. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, 2003

E. BOY, C. RICHAUD & J. C. PATTE: Multiple regulation of DAP-decarboxylase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5** (4), 287-290, 1979

E. BOY & J. C. PATTE: Multivalent repression of aspartic semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **112** (1), 84-92, 1972

M. M. BRADFORD: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72** (1-2), 248-254, 1976

J. S. G. BROOKMAN: Mechanism of cell disintegration in a high pressure homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 371-383, 1974

H. BÜNTEMEYER: Off-line analysis in animal cell culture. In: Encyclopedia of cell technology (Hrsg.: R. E. Spier), Wiley, 2000

H. G. BÜSCHELBERGER & M. LONCIN: Untersuchungen zum mechanischen Aufschluss von Mikroorganismen in Hochdruck-Homogenisatoren. *Chem. Ing. Tech.*, **61** (5), 420-421, 1989

H. G. CALAMITA & R. J. DOYLE: Control of autolysis in bacteria. *Chemtracts - Biochemistry and molecular Biology*, **15**, 117-126, 2002

P. CALIK, E. BILIR, G. CALIK & T. H. ÖZDAMAR: Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **31**, 685-697, 2002

P. CALIK, G. CALIK & T. H. ÖZDAMAR: Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **69** (3), 301-311, 2000

R. CHAMBERT & M. F. PETIT-GLATRON: Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate folding rate of secreted proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 43-47, 1999

J. M. CHIPLONKAR, S. V. GANGODKAR, U. V. WAGH, G. D. GHADE, M. V. RELE & M. C. SRINIVASON: Applications of alkaline protease from *Conidiobolus* in animal cell culture. *Biotechnol. Lett.*, **7** (9), 665-668, 1985

H. CHMIEL (Hrsg.): Bioprozesstechnik. Spektrum Akademischer Verlag, 2005

M. CLEMSON & W. J. KELLY: Optimizing alkaline lysis for DNA plasmid recovery. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **37**, 235-244, 2003

V. G. DEBABOV: The threonine story. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **79**, 113-136, 2003

V. G. DEBABOV; US 5 175 107, 1992

V. G. DEBABOV; US 5 538 873, 1996

DECHEMA e. V.: Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland. Positionspapier der DECHEMA e. V., November 2004

R. E. DERIAZ, M. E. STACEY, E. G. TEECE & L. F. WIGGINS: The disc reaction for 2-desoxypentoses. *J. Chem. Soc.*, 1222-1232, 1949

Z. DISCHE: Color reactions of nucleic acid components. In: *The Nucleic Acid* (Hrsg.: E. Chargaff & J. N. Davidson), **1**, Academic Press, 1955

P. M. Doran: *Bioprocess engineering principles*. Academic Press, 1995

R. M. EGAN & A. T. PHILLIPS: Requirements for induction of biodegradative threonine dehydratase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **132** (2), 370-376, 1977

C. R. ENGLER & C. W. ROBINSON: Disruption of *Candida utilis* cells in high pressure flow devices. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 765-780, 1981

J. FALBE & M. REGITZ (Hrsg.): *Römpp Lexikon Biotechnologie*, Thieme Verlag, 1992

N. FUJIWARA, K. YAMAMOTO & A. MASUI: Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used x-ray film. *J. Ferment. Bioengineer.*, **72** (4), 306-308, 1991

M. GERIGK, R. BUJNICKI, E. GANPO-NKWENKWA, J. BONGAERTSG. SPRENGER & R. TAKORS: Process control for enhanced *L*-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnol. Bioeng.*, **80**, 746-754, 2002

Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Beseitigung von Abfällen (Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz - KrW-/AbfG), 27. September 1994, letzte Änderung 25.01.2004

- J. M. GHUYSEN: Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.*, **32** (4), 425-464, 1968
- G. GRELLER: Molekulare und biochemische Charakterisierung des Trehalose/Maltose-Transportsystems des hyperthermophilen Archaeons *Thermococcus litoralis*. Dissertation, Universität Konstanz, Fakultät für Biologie, 2001
- R. GUPTA, Q. K. BEG & P. LORENZ: Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 15-32, 2002
- K. HAN, H. C. LIM & J. HONG: Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 663-671, 1992
- S. T. L. HARRISON: Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Adv.*, **9**, 217-240, 1991
- B. S. HARTLEY: Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **29**, 45-72, 1960
- R. HARTMANN, S. B. BOOK-HENNIG & U. SCHWARZ: Murein hydrolases in the envelope of *Escherichia coli*. *Eur. J. of Biochem.*, **41**, 203-208, 1974
- H. HARZ, K. BURGDORF & J. V. HÖLTJE: Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **190** (1), 120-128, 1990
- G. HEDENSKOG, H. MOGREN & L. ENEBO: A method for obtaining protein concentrates from microorganism. *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 947-959, 1970
- T. HERMANN & M. RIEPING; US 6 562 601, 2003
- T. HERMANN: Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.*, **104**, 155-172, 2003

- P. J. HETHERINGTON, M. FOLLOWS, P. DUNNILL & M. D. LILLY: Release of protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial homogeniser. *Transactions of the Institution of chemical Engineers and the chemical Engineer*, **49** (2), 142-148, 1971
- J. V. HÖLTJE & E. I. TUOMANEN: The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 441-454, 1991
- T. R. HOPKINS: Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. In: Purification and analysis of recombinant proteins (Hrsg.: R. Seetharam & S. K. Sharma), Marcel Dekker, 1991
- T. Y. HSIAO & C. E. GLATZ: Water reuse in the *L*-lysine fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 341-347, 1996
- T. Y. HSIAO, B. A. GLATZ & C. E. GLATZ: Broth recycle in a yeast fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1228-1234, 1994
- D. E. HUGHES, J. W. T. WIMPENNY & D. LLOYD: The disintegration of microorganisms. In: *Methods of Microbiology* (Hrsg.: J. R. Norris & D. W. Ribbons), Academic Press, 1971
- H. L. HYYRYLÄINEN, M. VITIKAINEN, J. THWAITE, H. WU, M. SARVAS, C. R. HARWOOD, V. P. KONTINEN & K. STEPHENSON: D-alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane / cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **275** (35), 26696-26703, 2000
- L. O. INGRAM: Mechanism of lysis of *Escherichia coli* by ethanol and other chaotropic agents. *J. Bacteriol.*, **146** (1), 331-336, 1981
- M. IKEDA: Amino acid processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **79**, 1-35, 2003

- J. M. IZCO, P. TORRE & Y. BARCINA: Ripening of ossau-iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS-method. *Food Control*, **11**, 7-11, 2000
- S. JAHNKE: Mechanischer Nasszellaufschluss mit Hochdruckhomogenisatoren. Niro Soavi Deutschland, 2000
- M. JURK: Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren. In: Bioanalytik (Hrsg.: F. Lottspeich & H. Zorbas), Spektrum Akademischer Verlag, 1998
- J. Kellermann: Aminosäurenanalytik. In: Bioanalytik (Hrsg.: F. Lottspeich & H. Zorbas), Spektrum Akademischer Verlag, 1998a
- J. Kellermann: Spaltung von Proteinen. In: Bioanalytik (Hrsg.: F. Lottspeich & H. Zorbas), Spektrum Akademischer Verlag, 1998b
- M. KELLY: Yeast extract. In: Industrial Enzymology - The Application of Enzymes in Industry (Hrsg.: T. Godfrey & J. Reichelt), Stockton Press, 1986
- K. KIDA, S. MORIMURA, J. NODA, Y. NISHIDA, T. IMAI & M. OTAGIRI: Enzymatic hydrolysis of the horn and hoof of cow and buffalo. *J. Ferment. Bioeng.*, **80** (5), 478-484, 1995
- H. J. KIM & I. A. TAUB: Specific degradation of myosin in meat by bromelain. *Food Chem.*, **40**, 337-343, 1991
- W. KIM, K. CHOI, Y. KIM, H. PARK, J. CHOI, Y. LEE, H. OH, I. KWON & S. LEE: Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (7), 2482-2488, 1996
- M. KIRCHER & W. PFEFFERLE: The fermentative production of *L*-lysine as an animal feed additive. *Chemosphere*, **43**, 27-31, 2001

- A. R. KLEINIG & A. P. J. MIDDELBERG: On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chem. Eng. Sci.*, **5** (5), 891-898, 1998
- A. R. KLEINIG, C. J. MANSELL, Q. D. NGUYEN, A. BADALYAN & A. P. J. MIDDELBERG: Influence of broth dilution on the disruption of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.*, **9** (10), 759-762, 1995
- G. L. KLEMAN & W. R. STROHL: Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3952-3958, 1994
- J. D. KORNDER: Streptomycin revisited: molecular action in the microbial cell. *Med. Hypotheses*, **58** (1), 34-46, 2002
- R. KREUTZFELDT, K. KÜHN & R. HÖHL; DE 1 247 549, 1968
- C. G. KUMAR & H. TAKAGI: Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, **17**, 561-594, 1999
- I. KUSUMOTO: Industrial production of *L*-glutamine. *J. Nutr.*, **131**, 2552-2555, 2001
- M. LEDUC & J. VAN HEIJENOORT: Autolysis of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **142** (1), 52-59, 1980
- M. LEDUC, R. KASRA & J. VAN HEIJENOORT: Induction and control of the autolytic system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **152** (1), 26-34, 1982
- R. LOPEZ, C. RONDA-LAIN, A. TAPIA, S. B. WAKS & A. TOMASZ: Suppression of the lytic and bactericidal effects of cell wall inhibitory antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10** (4), 697-706, 1976
- X. LU, Y. LI, Z. DUAN, Z. SHI & Z. MAO: A novel, repeated fed-batch, ethanol production system with extremely long term stability achieved by fully recycling fermented supernatants. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1819-1826, 2003

R. A. MAJEWSKI & M. M. DOMACH: Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 732-738, 1992

K. H. MANGOLD, W. GRAU & W. LOHMANN: Ausgewählte Gesichtspunkte bei der Gestaltung von technischen Fermentationsanlagen. In: Industrielle Enzyme (Hrsg. H. Ruttloff), Industrielle Enzyme. Behr's Verlag, 1994

R. MATISSEK, F. M. SCHNEPEL & G. STEINER: Lebensmittelanalytik. Springer Verlag, 1992

N. D. MEADOW, D. K. FOX & S. ROSEMAN: The bacterial phosphoenol-pyruvate: glycose phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 497-542, 1990

N. D. MEADOW, R. S. SAVTCHENKO, A. NEZAMI & S. ROSEMAN: Transient state kinetics of Enzyme IICBGlc, a glucose transporter of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system of *Escherichia coli* - Equilibrium and second order rate constants for the glucose binding and phosphotransfer reactions. *J. Biol. Chem.*, **280** (51), 41872-41880, 2005

A. S. MENON & A. L. GOLDBERG: Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP. *J. Biol. Chem.*, **262** (31), 14929-14934, 1987

O. MENSING: Erhöhung der Ausbeute bei der Herstellung von Extrakten aus bakteriellen Biomasseabfällen. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, 1997

A. P. J. MIDDELBERG, B. K. O'NEILL & D. L. BOGLE: A novel technique for the measurement of disruption in high-pressure homogenization: Studies on *Escherichia coli* containing recombinant inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 363-370, 1991

A. P. J. MIDDELBERG: Process-scale disruption of microorganism. *Biotechnol. Adv.*, **13** (3), 491-551, 1995

A. P. J. MIDDELBERG: Microbial cell disruption by high-pressure homogenization. *Methods in Biotechnology*, **9**, 11-21, 2000

A. P. J. MIDDELBERG: Process-scale disruption of microorganism. *Biotechnol. Adv.*, **13** (3), 491-551, 1995

G. MIKSCH, R. NEITZEL, K. FRIEHS & E. FLASCHEL: High level expression of a recombinant protein in *Klebsiella planticola* owing to induced secretion into the culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 627-632, 1999

G. L. MILLER: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31** (3), 426-428, 1959

H. A. MORAIS, L. M. DE MARCO, M. OLIVEIRA & M. P. C. SILVESTRE: Casein hydrolysates using papain: Peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria*, **34** (1), 59-69, 2005

R. P. MUKHOPADHYAY & A. L. CHANDRA: Application of a streptomycete in the removal of waste keratinous materials. In: *Industrial biotechnology* (Hrsg.: V. S. Malik & P. Sridhar), International Science Publisher, 1992

K. MUTTZALL: Einführung in die Fermentationstechnik. Behr's Verlag, 1993

D. NELSON & M. COX (Hrsg.): *Lehninger Biochemie*. Springer Verlag, 2001

J. ADLER NISSEN: Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agricult. Food. Chem.*, **27** (6), 1256-1262, 1979

Novozymes, Enzymsicherheits- und Produktdatenblatt zur Alkalase 2.4 L FG, 2004

J. C. PATTE, P. TRUFFA-BACHI & G. N. COHEN: Threonine sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **128** (3), 426-430, 1966

J. C. PATTE, G. LE BRAS & G. N. COHEN: Regulation by methionine of synthesis of a third aspartokinase and of a second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta*, **136** (2), 245-250, 1967

P. PETERS-WENDISCH, C. PROTSCH, H. SERGER, H. SAHM, R. FAURIE & R. ULBER: Biotechnologische Innovationen in der Aminosäure-Darstellung. Transkript Sonderband Biokatalyse, 12-15, 2003

A. B. VAN PUTTEN, F. SPITZENBERGER, G. KRETZMER, B. HITZMANN, M. DORS, R. SIMUTIS & K. SCHÜGERL: Improvement of the production of subtilisin carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. *J. Biotechnol.*, **49**, 83-93, 1996

Qiagen® Plasmid Purification Handbook, Third Edition, 15-18, November 2005

M. B. RAO, A. P. TANKSALE, M. S. GHATGE & V. V. DESHPANDE: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62** (3), 597-635, 1998

N. D. RAWLINGS & A. J. BARRETT: Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.*, **290**, 205-218, 1993

J. M. RISSE: Aufarbeitung und Nutzung von Biomasseabfällen aus *Bacillus licheniformis*-Fermentationen. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, 1998

H. RUTTLOFF: Industriell bedeutsame Enzympräparate tierischer und pflanzlicher Herkunft. In: Industrielle Enzyme (Hrsg. H. Ruttloff), Behr's Verlag, 1994

T. SAUER, C. W. ROBINSON & B. R. GLICK: Disruption of native and recombinant *Escherichia coli* in high-pressure homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1330-1342, 1989

T. SAUTER: Die bakterielle Signalverarbeitung am Beispiel des Sucrose Phosphotransferase-systems in *Escherichia coli* - Modellierung und experimentelle Überprüfung. Dissertation, Universität Stuttgart, Fakultät für Maschinenbau, 2003

- I. SCHECHTER & A. BERGER: On the size of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27** (2), 157-162, 1967
- F. H. SCHIERL: Wiederverwertung mikrobieller Biomasseabfälle als Bestandteil von Nährlösungen für die Fermentation. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, 1995
- H. G. SCHLEGEL: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, 1992
- H. SCHÜTTE & M. R. KULA: Pilot- and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 599-620, 1990
- G. D. SHOCKMAN & J. F. BARRET: Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **37**, 501-527, 1983
- S. A. SHOJAOSADATI: The use of biomass and stillage recycle in conventional ethanol fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **67**, 362-366, 1996
- E. R. STADMAN, G. N. COHEN, G. LE BRAS & H. DE ROBICHON SZULMAJSTER: Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **236** (7), 2033-2038, 1961
- P. F. STANBURY & A. WHITAKER: Principles in fermentation technology. Pergamon Press, 1984
- M. STEPHAN, U. BESHAY; K. FRIEHS, E. FLASCHEL: Influence of medium composition on growth behaviour of *Dictyostelium discoideum* for cultivation on axenic media. *Process Biochem.*, **39** (3), 333-343, 2003
- W. STORHAS (Hrsg.): Bioverfahrensentwicklung. Wiley-VCH Verlag, 2003
- J. B. SUMNER & V. A. GRAHAM: Dinitrosalicylic acid: a reagent for the determination of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.*, **47**, 5-9, 1921

A. SVARACHORN, T. TSUCHIDO, A. SHINMYO & M. TAKANO: Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by low temperature. *J. Ferment. Bioeng.*, **71** (4), 281-283, 1991

M. SZCZSIUL & D. E. WAMPLER: Regulation of a metabolic system in vitro: synthesis of threonine from aspartic acid. *Biochemistry*, **15** (10), 2236-2244, 1976

H. UHLIG: Enzyme arbeiten für uns. Carl Hanser Verlag, 1991

H. E. UMBARGER & B. BROWN: Threonine deamination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Vol. **73**, 105-112, 1956

H. VARELA, M. D. FERRARI, L. BELOBRAJDIC, R. WEYRAUCH & L. LOPERENA: Short communication: Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12** (6), 643-645, 1996

H. E. WADE: GB 1258063, 1971

T. ZOR & Z. SELIGER: Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.*, **236** (2), 302-308, 1996

10 Anhang

10.1 Formelzeichen

a_{Protease}	[U ml ⁻¹]	Proteaseaktivitätskonzentration
A	[-]	Absorption
BTM	[g L ⁻¹]	Biotrockenmassekonzentration
c_{AS}	[mmol L ⁻¹]	Aminosäurekonzentration
f_V	[-]	Verdünnungsfaktor
L	[%]	Lysegrad
m	[g]	Masse
n	[min ⁻¹]	Rührerdrehfrequenz
N	[-]	Anzahl der Passagen durch den Hochdruckhomogenisator
N_{Zellen}	[mL ⁻¹]	Zellzahldichte
OD	[-]	Optische Dichte
OD_{max}	[-]	theoretisch erreichte maximale Zelldichte
$OD_{\text{max,real}}$	[-]	experimentell erreichte maximale Zelldichte
OD_{600}	[-]	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
p	[bar]	Druck
pO_2	[%]	relative Gelöstsauerstoffkonzentration
t	[h]	Zeit
t_d	[h]	Verdopplungszeit
V	[L]	Volumen
V_{Lysat}	[L]	Lysatvolumen
V_R	[L]	Reaktornutzvolumen
x_{AS}	[%TS]	Aminosäuregehalt bezogen auf Trockenmasse
x_N	[%TS]	Stickstoffgehalt bezogen auf Trockenmasse
x_C	[%TS]	Kohlenstoffgehalt bezogen auf Trockenmasse
x_{DNA}	[%TS]	DNA-Gehalt bezogen auf Trockenmasse
x_{CO_2}	[Vol.-%]	volumenbezogener Anteil an Kohlendioxid in der Abluft
$Y_{X/S}$	[-]	Ausbeutekoeffizient, Biomasse bezogen auf Substrat
$Y_{P/S}$	[-]	Ausbeutekoeffizient, Produkt bezogen auf Substrat
$Y_{P/X}$	[-]	Ausbeutekoeffizient, Produkt bezogen auf Biomasse

10.2 Griechische Formelzeichen

Φ	$[\text{V s}^{-1}]$	Peakfläche
λ	$[\text{nm}]$	Wellenlänge
μ	$[\text{h}^{-1}]$	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
μ_{max}	$[\text{h}^{-1}]$	maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
φ_0	$[-]$	relative Zelldichte zu Beginn der Kultivierung
τ	$[\text{h}]$	charakteristische Zeitkonstante
ρ_{Acetat}	$[\text{g L}^{-1}]$	Konzentration an Acetat
ρ_{Glycerin}	$[\text{g L}^{-1}]$	Konzentration an Glycerin
ρ_{P}	$[\text{g L}^{-1}]$	Proteinkonzentration
$\rho_{\text{red. Zucker}}$	$[\text{g L}^{-1}]$	Konzentration an reduzierenden Zuckern
$\rho_{\text{Saccharose}}$	$[\text{g L}^{-1}]$	Konzentration an Saccharose
ρ_{Threonin}	$[\text{g L}^{-1}]$	Konzentration an Threonin
ρ_{AS}	$[\text{g L}^{-1}]$	Konzentration an Aminosäuren
ρ_{X}	$[\text{g L}^{-1}]$	Feststoffkonzentration zum Zeitpunkt t
ρ_{X0}	$[\text{g L}^{-1}]$	Feststoffkonzentration zum Zeitpunkt t = 0

10.3 Indices

ADHP	Ammoniumdihydrogenphosphat
AMS	Ammoniumsulfat
AW	Ammoniakwasser
C	Kohlenstoff
Cas	Caseinat
E	Enzym
Glc	Glucose
HE	Hefeextrakt
Küv	Küvette
l	flüssig
Mal	Maltose
MQW	Maisquellwasser
N	Stickstoff

Prot	Protease
Rest	Restanteil Medium
s	fest
Sac	Saccharose
SEP	Stoffwechsellendprodukt
SM	Sojamehl
Stä	Stärke
Thr	Threonin
X	Biotrockenmasse

10.4 Abkürzungen

AAPF-pNA	suc- <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Phe- <i>p</i> -Nitroanilid
AGE	Agarosegelelektrophorese
AS	Aminosäuren
ATCC	American type culture collection
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
Disk	Diskontinuierlich
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E. C.	Enzyme Commission
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
HSG	Hefeextrakt, Sojapepton, Glycerin
IUBMB	International Union of Biochemistry and molecular Biology
LB	Luria-Bertani
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
N	Stickstoff

OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
PAGE	Polyacrylamidgel
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pO ₂	relative Gelöstsauerstoffkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RW	Referenzwert
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Sm	Gen für die Streptomycinresistenz
TB	Terrific-Broth
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
<i>thrA, thrB, thrC</i>	Gene des Threoninstoffwechsels
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
Tris	α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
VKPM	Nationale russische Stammsammlung für industrielle Mikroorganismen

10.5 Aminosäurenomenklatur nach IUPAC

Ala	A	<i>L</i> -Alanin
Arg	R	<i>L</i> -Arginin
Asn	N	<i>L</i> -Asparagin
Asp	D	<i>L</i> -Asparaginsäure
Cys	C	<i>L</i> -Cystein
Gln	Q	<i>L</i> -Glutamin
Glu	E	<i>L</i> -Glutaminsäure
Gly	G	<i>L</i> -Glycin
His	H	<i>L</i> -Histidin
Ile	I	<i>L</i> -Isoleucin
Leu	L	<i>L</i> -Leucin
Lys	K	<i>L</i> -Lysin
Met	M	<i>L</i> -Methionin

Phe	F	<i>L</i> -Phenylalanin
Pro	P	<i>L</i> -Prolin
Ser	S	<i>L</i> -Serin
Thr	T	<i>L</i> -Threonin
Trp	W	<i>L</i> -Tryptophan
Tyr	Y	<i>L</i> -Tyrosin
Val	V	<i>L</i> -Valin

10.6 Tabellen

Tabelle 10.1: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der *Klebsiella planticola*-Lysate für die 2. bis 9. zyklische Rückführung. (Angaben in Prozent des Trockenstoffs)

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	HIS	
2. Zyklus	3,06	3,37	0,24	0,04	0,22	0,75	
3. Zyklus	2,99	3,35	0,88	0,65	0,23	0,88	
4. Zyklus	2,66	2,89	1,20	0,85	0,81	0,89	
5. Zyklus	2,79	2,89	0,64	0,83	0,55	0,75	
6. Zyklus	2,70	2,95	1,17	1,54	0,47	0,60	
7. Zyklus	2,82	3,11	1,05	1,48	0,43	0,38	
8. Zyklus	2,58	2,75	1,02	1,33	0,73	0,69	
9. Zyklus	3,32	4,60	1,71	1,89	0,75	0,74	
	GLY	THR	ARG	ALA	TYR	MET	
2. Zyklus	1,84	1,65	2,24	2,70	1,64	1,05	
3. Zyklus	2,15	2,12	2,72	2,73	2,01	1,30	
4. Zyklus	2,04	2,09	2,81	2,49	1,78	1,23	
5. Zyklus	2,21	1,80	2,82	2,49	1,84	1,24	
6. Zyklus	2,46	2,38	3,11	2,51	2,10	1,35	
7. Zyklus	2,37	2,22	2,93	2,60	1,99	1,30	
8. Zyklus	2,03	2,08	2,78	2,36	1,90	1,24	
9. Zyklus	2,29	2,48	3,40	3,60	1,98	1,24	
	VAL	TRP	PHE	ILE	LEU	LYS	Summe
2. Zyklus	2,31	0,55	1,59	2,03	3,69	1,75	30,9
3. Zyklus	2,66	0,66	1,92	2,37	4,20	2,18	36,2
4. Zyklus	2,55	0,63	1,79	2,15	3,76	1,67	34,4
5. Zyklus	2,56	0,62	1,77	2,14	3,74	1,81	33,6
6. Zyklus	2,78	0,67	2,00	2,30	3,91	1,71	36,9
7. Zyklus	2,71	0,65	1,89	2,28	3,97	1,73	36,1
8. Zyklus	2,49	0,62	1,78	2,11	3,69	1,62	33,9
9. Zyklus	0,41	0,68	2,10	2,91	5,10	1,89	41,2

Tabelle 10.2: Ergebnisse der Aminosäureanalytik konventioneller Extrakte und Vergleich mit denen der *Klebsiella planticola*-Lysate (Angaben in Prozent des Trockenstoffs)

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	HIS
Sojapepton, UD-Chemie	0,18	0,28	0,17	0,25	0,01	0,04
Hefeextrakt, Ohly	1,97	3,91	1,51	1,92	0,16	0,62
Hefeextrakt, Biospringer	2,42	4,63	1,50	2,08	0,42	0,54
Caseinpepton, Carl Roth	0,10	0,46	0,21	0,23	0,23	0,19
<i>Klebsiella planticola</i>-Lysate	2,87	3,24	0,99	1,08	0,52	0,71
	GLY	THR	ARG	ALA	TYR	MET
Sojapepton, UD-Chemie	0,29	0,09	0,14	0,33	0,12	0,05
Hefeextrakt, Ohly	1,10	1,94	1,60	3,71	1,27	0,67
Hefeextrakt, Biospringer	1,31	2,00	1,66	3,43	0,64	0,77
Caseinpepton, Carl Roth	0,08	0,33	1,06	0,37	0,20	0,40
<i>Klebsiella planticola</i>-Lysate	2,17	2,10	2,85	2,69	1,90	1,24
	VAL	TRP	PHE	ILE	LEU	LYS
Sojapepton, UD-Chemie	0,10	0,07	0,15	0,13	0,51	0,44
Hefeextrakt, Ohly	2,56	0,61	1,99	1,96	3,71	2,68
Hefeextrakt, Biospringer	2,46	0,56	2,10	1,94	4,08	2,47
Caseinpepton, Carl Roth	0,64	0,41	1,27	0,41	2,49	1,29
<i>Klebsiella planticola</i>-Lysate	2,31	0,64	1,86	2,29	4,01	1,80

Asp: Asparaginsäure; Glu: Glutaminsäure; Asn; Asparagin; Ser: Serin; Gln: Glutamin; His: Histidin; Gly: Glycin; Thr: Threonin; Arg: Arginin; Ala: Alanin; Tyr: Tyrosin; Met: Methionin; Val: Valin; Trp: Tryptophan; Phe: Phenylalanin; Ile: Isoleucin; Leu: Leucin; Lys: Lysin

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Markus Blaesen
Anschrift: Stennerstraße 21, Apartment 421
33613 Bielefeld
Telefon: +49 521 97 17 801
E-Mail: mbl@fermtech.techfak.uni-bielefeld.de
Geburtsdatum/-ort: 11. Mai 1977 in Vechta

Schulische Laufbahn

1983 - 1987 Grundschule Eydelstedt
1987 - 1989 Orientierungsstufe Barnstorf
1989 - 1997 Gymnasium Graf Friederich Schule Diepholz

Zivildienst

1997 - 1998 DRK Rettungswache Diepholz

Studium

SS 99 - SS 02 FH Lippe und Höxter
Studium der Lebensmitteltechnologie
Schwerpunkt Biotechnologie
WS 02/03 - SS 03 Erlangung der Promotionsberechtigung an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld
10/03 - 12/06 Promotion an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld
in der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik mit dem Thema:
Untersuchungen zur Lyse und Rückführung bakterieller Biomasse als Medienbestandteil in den Fermentationsprozess

12 Publikationen

Veröffentlichungen

M. BLAESEN, K. FRIEHS & E. FLASCHEL: Produktintegrierter Umweltschutz am Beispiel der Rückführung bakterieller Biomasse. *Chem. Ing. Tech.*, **78** (3), 267-272, 2006

M. BLAESEN, E. FLASCHEL & K. FRIEHS: Sustainable Production: Recycling of bacterial biomass resulting from a fermentation process with *Klebsiella planticola*. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **20** (3), 263-268, 2006

Vorträge

M. BLAESEN, J. M. RISSE, K. FRIEHS & E. FLASCHEL: Untersuchungen zur Lyse und Rückführung bakterieller Biomasse in den Fermentationsprozess. Vorgetragen auf der GVC-VDI Tagung in Würzburg, 2006

Poster

M. BLAESEN, K. FRIEHS & E. FLASCHEL: Rückführung mikrobieller Biomasse des Gram-negativen Bakteriums *Klebsiella planticola* in den Fermentationsprozess als Mediumsbestandteil. Präsentiert auf der BioPerspectives mit 22. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen in Wiesbaden, 2004

M. BLAESEN, K. FRIEHS & E. FLASCHEL: Recycling of bacterial biomass in a process of *L*-threonine production by means of an *Escherichia coli* strain. Präsentiert auf der ACHEMA mit Industrial Biotechnology Exhibition and Partnering Conference in Frankfurt am Main, 2006

M. BLAESEN, K. FRIEHS & E. FLASCHEL : Untersuchungen zur Lyse und Rückführung bakterieller Biomasse in den Produktionskreislauf. Präsentiert auf den GVC/DECHEMA Jahrestagungen mit 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen in Wiesbaden, 2006

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Bielefeld im Dezember 2006

Markus Blaesen