



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

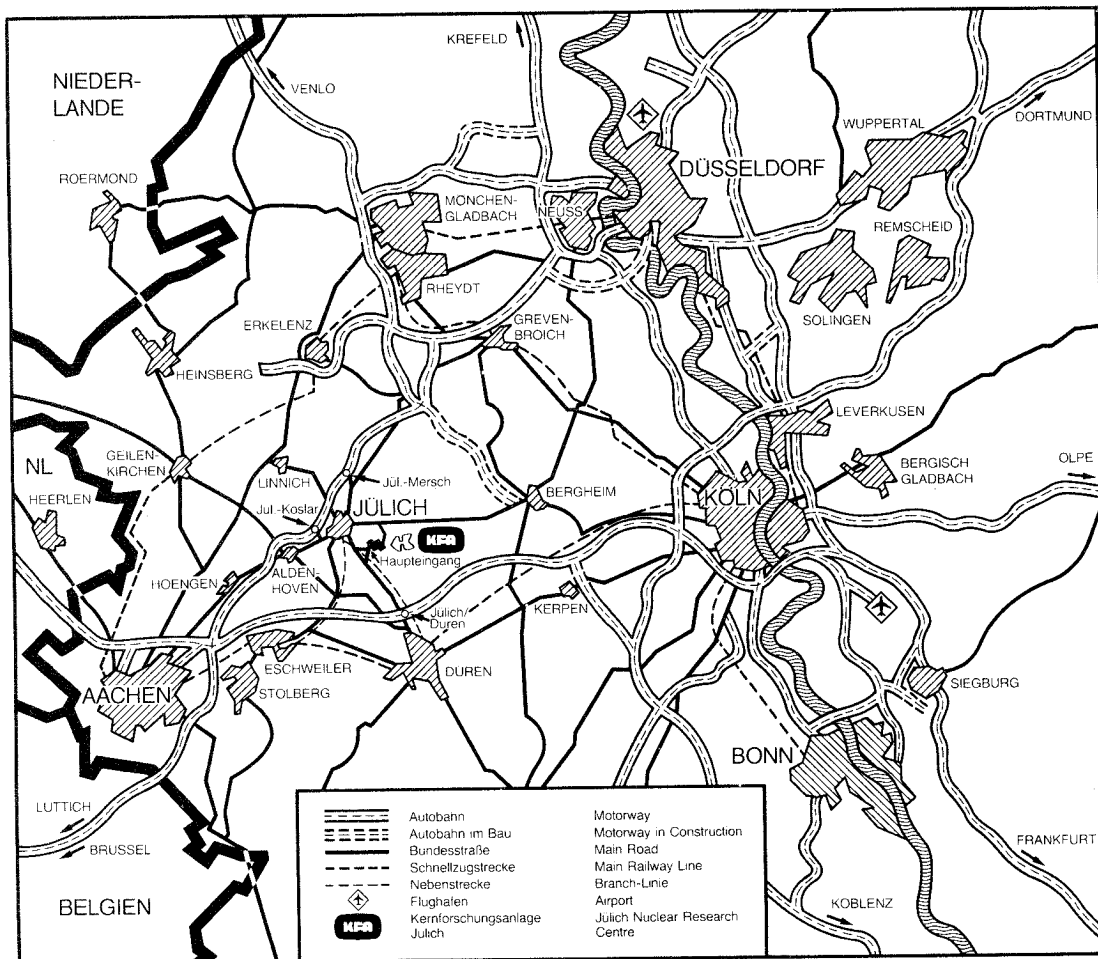
Institut für Biotechnologie

**Immobilisierung von aeroben
Mikroorganismen an Glassintermaterial
am Beispiel der L-Leucin-Produktion
mit *Corynebacterium glutamicum***

von

Jochen Büchs

Jül-2251
Dezember 1988
ISSN 0366-0885



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2251
 Institut für Biotechnologie Jül-2251

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Immobilisierung von aeroben
Mikroorganismen an Glassintermaterial
am Beispiel der L-Leucin-Produktion
mit *Corynebacterium glutamicum***

von

Jochen Büchs

D 830 (Diss. T.U. Hamburg-Harburg)



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Liste der Abbildungen	IV
Liste der Tabellen	VIII
Liste der Abkürzungen	IX
Begriffsdefinitionen.....	X

1. Einleitung

1.1. Die Aminosäure Leucin und ihre Gewinnung	1
1.2. Sinn und Methoden der Immobilisierung von Mikroorganismen	3
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit	8

2. Grundlagen & Theorie

2.1. Coryneforme Bakterien und ihr Stoffwechsel	9
2.1.1. Abbau von Glucose bis zum Pyruvat	10
2.1.2. Oxidative Phosphorylierung	10
2.1.3. Aerober Abbau von Pyruvat	10
2.1.4. Anaerober Abbau von Pyruvat	12
2.1.5. Anaplerotische Auffüllreaktionen.....	12
2.1.6. Leucinbildung	13
2.2. Grundlagen der mathematischen Behandlung mikrobiologischer Prozesse	14
2.2.1. Wachstum in der Batch-Kultur	14
2.2.2. Kontinuierliche Kultur	15
2.2.3. Betriebsführung eines kontinuierlichen Bioreaktors	17
2.3. Grundlagen der Oberflächenbehandlung von Glas (Silanchemie).....	18
2.4. Grundlagen mikrobieller Adhäsionsphänomene	20
2.4.1. Elektrostatische Wechselwirkungen	20
2.4.2. Hydrophobe Wechselwirkungen.....	21
2.4.3. Adhäsion in Gegenwart von makromolekularen Substanzen	23
2.4.4. Weitere Bindungsmechanismen	24
2.4.5. Polymer-induzierte Flockulation	24

3. Material & Methoden

3.1. Organismen & Kulturbedingungen	26
3.1.1. Stammhaltung und Aufzucht	26
3.1.2. Medien und Durchführung der Schüttelkolbenversuche	26
3.1.3. Medien und Durchführung der Vergleichsversuche	28
3.1.4. Medien für die kontinuierlichen Fermentationen	29

3.2. Analysenmethoden	30
3.2.1. Biomasse	30
3.2.2. Aminosäuren	31
3.2.3. α -Ketoisocapronsäure	33
3.2.4. Glucose	34
3.2.5. Lactat	35
3.2.6. Phosphat	36
3.2.7. Gaschromatographische Bestimmungen	36
3.2.8. Spez. Sauerstoffaufnahme	37
3.2.9. Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen	38
3.2.10. Flockungsverhalten der Mikroorganismen	39
3.2.11. Adsorptionsverhalten der Mikroorganismen	39
3.3. Herstellung der oberflächenmodifizierten Gläser	40
3.3.1. Gläser für adsorptive Bindung der Mikroorganismen	40
3.3.1.1. Kovalent gebundene niedermolekulare funktionelle Gruppen	40
3.3.1.2. Adsorptiv gebundene kationische Polymere	43
3.3.1.3. Quervernetzung adsorbierter kationischer Polymere	45
3.3.1.4. Kovalent gebundene kationische Polymere	47
3.3.2. Gläser für kovalente Bindung der Mikroorganismen	49
3.4. Aufbau der Versuchsanlagen	52
3.4.1. Festbettreaktor für Vergleichsversuche	52
3.4.2. Rührkesselreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche	53
3.4.3. Festbettumlaufreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche	54
3.4.4. Wirbelschichtreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche	61
<u>4. Ergebnisse & Diskussion</u>	
4.1. Mikrobiologie	62
4.1.1. Stoffwechsel	62
4.1.1.1. Bilanzierung des Prozesses	62
4.1.1.2. Stöchiometrische Größen (Ausbeutekoeffizienten)	64
4.1.1.3. Kinetische Größen	69
4.1.1.4. Bedeutung von CO ₂ zum Anwachsen	74
4.1.2. Optimierung der Kulturbedingungen	75
4.1.2.1. Temperatur	75
4.1.2.2. pH-Wert	78
4.1.2.3. Osmotischer Druck	80
4.1.2.4. Wachstumskontrolle	84
4.1.3. Medienoptimierung	87
4.1.3.1. Mg-Mangel im Vollmedium	87
4.1.3.2. Ketosäurezerlegung und Stabilisierung	87
4.1.3.3. Medienoptimierung im Turbidostaten	93
4.1.4. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Leucinbildung	96

4.2. Einfluß und Optimierung der Oberflächeneigenschaften der Trägerkörper.....	99
4.2.1. Aktivität von Mikroorganismen-beladenen Trägerkörpern	100
4.2.2. Menge der adsorbierten Biomasse	110
4.2.3. Abschätzung der theoretisch erreichbaren Zelldichten	114
4.3. Einfluß und Steuerung der Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen ..	116
4.3.1. Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen.....	116
4.3.2. Flockulationseigenschaften der Mikroorganismen	120
4.3.3. Adsorptionseigenschaften der Mikroorganismen.....	122
4.3.4. Steuerung der adsorbierten Biomasse	126
4.4. Modellierung der Leucinfermentation mit trägerfixierten Zellen.....	128
4.5. Stofftransport in den Trägerkörpern	136
4.5.1. Transportwiderstand im Biomassefilm.....	136
4.5.2. Der gesamte diffusive Sauerstofftransport im Sinterglas.....	144
4.6. Reaktorauswahl.....	156
4.6.1. Wirbelschichtreaktor.....	156
4.6.2. Festbettumlaufreaktor	158
4.6.3. Vergleich der erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten mit Literaturdaten	159

5. Zusammenfassung & Ausblick

5.1. Zusammenfassung	160
5.2. Vorschläge für weitere Arbeiten.....	162

Anhang

A.1. Pufferlösungen und Programme des Aminosäureanalysators	A1
A.2. Festbettreaktor für Vergleichsversuche	A7
A.3. Festbettumlaufreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche.....	A7
A.4. Wirbelschichtreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche	A7
A.5. Begasungsanlage	A10
A.6. Bilanzierung des Prozesses	A12
A.7. Nebeneffekte bei Phosphor-verarmten Zellen	A14
A.8. Berechnung von $Y_{L/s'}$ für ruhende Zellen	A14
A.9. Auswahl der pH-Puffer für die Batch-Versuche	A15
A.10. Rechnerprogramm Reaktormodell.....	A17
A.11. Ableitung Diffusion eines Stoffes durch einen Biomassefilm	A23
A.12. Rechnerprogramm Diffusion der Ketosäure im Biomassefilm	A25
A.13. Rechnerprogramm Gesamter diffusiver Sauerstofftransport	A30
A.14. Diffusion der Mikroorganismen aus den Poren	A31
A.15. Berechnung der Strömungsgeschwindigkeit in einer Pore	A33
Liste der mathematischen Formelzeichen	A35
Literaturverzeichnis	A38

Liste der Abbildungen

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges für L-Leucin	2
Abb. 1.2: Techniken der Immobilisierung	4
Abb. 2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Corynebacterium glutamicum</i> auf Sinterglas	9
Abb. 2.2: Stoffwechsel von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
Abb. 2.3: Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der limitierenden Substratkonzentration S nach Monod	15
Abb. 2.4: Auftragung der stationären Betriebspunkte einer kontinuierlichen Kultur im X-D Diagramm.....	17
Abb. 2.5: Reaktionsmechanismus von γ -Aminopropyltriethoxysilan mit einer durch Salpetersäure aktivierten Glasoberfläche	19
Abb. 2.6: Anziehende und abstoßende Wechselwirkungen zwischen in Flüssigkeit eingetauchten Körpern	22
Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Polymer-Brückenbildung	24
Abb. 2.8: Einfluß der Konzentration des Flockulationsmittels auf die Aggregation von kolloiden Partikeln aus Quarz	25
Abb. 3.1: Eichkurve zur Bestimmung der Biotrockenmasse aus der Optische Dichte	31
Abb. 3.2: Photographische Ansicht von fünf Festbettreaktoren zum Vergleich von verschieden oberflächenbehandelten Gläsern.....	52
Abb. 3.3: Photographische Ansicht einer kontinuierlichen Fermentationsanlage mit Festbettumlaufreaktor	55
Abb. 3.4: Grundfließbild der kontinuierlichen Fermentationsanlage mit Festbettumlaufreaktor	56
Abb. 3.5: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Fermentationsanlage mit Festbettumlaufreaktor	57
Abb. 4.1: Ein- und ausströmende Kohlenstoffmengen eines kontinuierlichen Rührkesselreaktors im Fließgleichgewicht	63
Abb. 4.2: Der Einfluß der Phosphat-Konzentration im Medium auf Wachstum und Stoffwechsel	67
Abb. 4.3: Schematische Darstellung des molaren Ausbeutekoeffizienten $Y_{L/S}$ in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen	68

Abb. 4.4: Bedeutung von CO ₂ für das Anwachsen angeimpfter Kulturen	74
Abb. 4.5: Einfluß der Inkubationstemperatur auf das Wachstum (a) und die spez. Produktbildungsrate (b).....	76
Abb. 4.6: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum (a) und die spez. Produktbildungsrate (b).....	77
Abb. 4.7: Einfluß des pH-Wertes der Fermentationsflüssigkeit auf Wachstum (a) und Raum-Zeit-Ausbeute(b)	79
Abb. 4.8: Einfluß des pH-Wertes auf die Sauerstoffaufnahme.....	80
Abb. 4.9: Einfluß des osmotischen Druckes auf Wachstum (a) und spez. Produktbildungsrate (b).....	82
Abb. 4.10: Einfluß des osmotischen Druckes auf die spez. Produktbildungsrate bei ruhenden Zellen	83
Abb. 4.11 Einfluß der Phosphatkonzentration im Medium auf die Wachstumsgeschwindigkeit.....	86
Abb. 4.12: Einfluß von Zusätzen zum Vollmedium auf Wachstum (a) und Glucoseaufnahme (b).....	88
Abb. 4.13: Chemismus der Zersetzung der α -Ketoisocapronsäure durch Katalyse von Manganionen	89
Abb. 4.14: Stabilisierung der α -Ketoisocapronsäure durch Komplexbildner in Gegenwart von Manganionen.....	90
Abb. 4.15: Einfluß von Medienzugaben auf die Durchflußrate in einem turbidostatisch geregelten Festbettumlaufreaktor	94
Abb. 4.16: Die möglichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Leucinbildung.....	96
Abb. 4.17: Die Entwicklung der Leucinkonzentration im Vergleichsversuch 1.....	100
Abb. 4.18: Die Entwicklung der Leucinkonzentration im Vergleichsversuch 2.....	101
Abb. 4.19: Theoretische Vorteile einer Oberflächenmodifizierung durch makromolekulare Substanzen.....	102
Abb. 4.20: Die Entwicklung der Leucinkonzentration (a), OD ₆₀₀ (b) und des pH-Wertes (c) im Vergleichsversuch 4.....	104
Abb. 4.21: Die Entwicklung der Leucinkonzentration im Vergleichsversuch 5.....	105
Abb. 4.22: Leucinkonzentration (a) und OD ₆₀₀ (b) im ersten Produktionsabschnitt des Vergleichsversuches 6	106

Abb. 4.23: Leucinkonzentration im zweiten Produktionsabschnitt des Vergleichsversuches 6	108
Abb. 4.24: Titrationskurven von unterschiedlichen DEAE-Dextranen	109
Abb. 4.25: Einfluß der DEAE-Dextran-Konzentration bei der Herstellung der Sinterglaskörper auf die Bindungsfähigkeit für Mikroorganismen.....	111
Abb. 4.26: Haltbarkeit verschiedener Oberflächenmodifikationen durch DEAE-Dextran.....	112
Abb. 4.27: Haltbarkeit verschiedener Oberflächenmodifikationen durch Polyethylenimin (PEI)	113
Abb. 4.28: Elektrophoretische Mobilität von Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien.....	117
Abb. 4.29: Chemische Strukturformeln der Teichon-, Teichuron- und Lipoteichonsäuren	118
Abb. 4.30: Flockulation von Mikroorganismen unterschiedlicher Aufzucht in Abhängigkeit von der Konzentration des Flockulationsmittels (DEAE-Dextran).....	121
Abb. 4.31: Einfluß des Phosphorgehaltes der Zellen auf deren Flockulierbarkeit (DEAE-Dextran-Konzentration, bei der maximale Flockulation auftritt)	122
Abb. 4.32: Adsorptionsverhalten von Phosphor-gesättigten (P-Gehalt: 3.1 Gew. %) und Phosphor-verarmten Zellen (P-Gehalt: 1.2 Gew. %).....	123
Abb. 4.33: Einfluß der Phosphatversorgung wachsender Mikroorganismen auf deren Adsorptionsverhalten.....	125
Abb. 4.34: Modellierung der Leucinfermentation in kontinuierlicher Kultur mit trägerfixierten wachsenden Mikroorganismen	130
Abb. 4.35: Einfluß der aktiven immobilisierten Biomassekonzentration X_1 und der Wachstumsrate auf Raum-Zeit-Ausbeute und Umsatz	133
Abb. 4.36: Meßwerte und Modellrechnung einer kontinuierlichen Fermentation	134
Abb. 4.37: Schematische Darstellung des Stofftransportes in mit Mikroorganismen bewachsenen porösen Trägerkörpern.....	137
Abb. 4.38: Verlauf der Sauerstoffkonzentration und der spez. Sauer- stoffaufnahme der Mikroorganismen in einem Biomassefilm	138
Abb. 4.39: Einfluß von pO_2 , Thiamin und Temperatur auf Durchflußrate und Raum-Zeit-Ausbeute	141

Abb. 4.40: Schematische Darstellung der realen (a) und idealisierten (b) Struktur des Sinterglasmaterials	145
Abb. 4.41: Schematische Darstellung des diffusiven Stofftransports in unbewegter Flüssigkeit innerhalb einer Pore	146
Abb. 4.42: Eindimensionale Diffusion im unbewegten Flüssigkeitsfilm innerhalb der Poren und im Biomassefilm	147
Abb. 4.43: Dicke des aktiven Biomassefilms in Abhängigkeit von der Entfernung vom Eingang der Pore	149
Abb. 4.44: Aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 in Abhängigkeit von der Konzentration X der frei suspendierten Mikroorganismen	151
Abb. 4.45: Einfluß des pO_2 in der Fermentationsflüssigkeit auf die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1	153
Abb. 4.46: Maßstabsgetreue Darstellung einer großen Pore, die durch einen Biomassefilm verschlossen ist	154
Abb. A.1: Festbettreaktor für die Vergleichsversuche	A8
Abb. A.2: Festbettumlaufreaktor für kontinuierliche Fermentationen	A9
Abb. A.3: Boden des Wirbelschichtreaktors	A10
Abb. A.4: Begasungsanlage der kontinuierlichen Festbettumlaufreaktoren	A11
Abb. A.5: Programmablaufplan Reaktormodell	A18
Abb. A.6: Diffusion eines Stoffes durch einen Biomassefilm	A23
Abb. A.7: Diffusion der auf der Glasoberfläche nachwachsenden Mikroorganismen durch die unbewegte Fermentationsflüssigkeit	A31

Liste der Tabellen

Tabelle 1.1: Bewertender Vergleich der wichtigsten Methoden zur Trägerfixierung von Mikroorganismen im Hinblick auf ein aktives, aerobes mikrobiologisches System	5
Tabelle 1.2: Bisher publizierte Arbeiten über die Aminosäure-Produktion mit lebenden, trägerfixierten Mikroorganismen	6
Tabelle 3.1: Nährmedien für Stammhaltung und Aufzucht	26
Tabelle 3.2: Medien für die Schüttelkolbenversuche	27
Tabelle 3.3: Spurenelementlösungen	27
Tabelle 3.4: Medien für die Vergleichsversuche	28
Tabelle 3.5: Medien für die kontinuierlichen Fermentationsversuche	29
Tabelle 3.6: Liste der oberflächenmodifizierten Gläser zur adsorptiven Bindung der Mikroorganismen	51
Tabelle 3.7: Liste der oberflächenmodifizierten Gläser zur kovalenten Bindung der Mikroorganismen	51
Tabelle 4.1: Geschlossene Kohlenstoffbilanz einer sich im Fließgleichgewicht befindlichen kontinuierlichen Kultur	63
Tabelle 4.2: Geschlossene Redoxbilanz einer sich im Fließgleichgewicht befindlichen Kultur	64
Tabelle 4.3: Der Zellertrag $Y_{X/S}$ unter verschiedenen Kulturbedingungen	65
Tabelle 4.4: Molarer Leucin-Ausbeutekoeffizient $Y_{L/S'}$ von stark wachstumslimitierten bzw. ruhenden Zellen	68
Tabelle 4.5: Zusammenstellung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$, $Y_{L/S'}$, $Y_{L/K'}$ und Y_{X/O_2} bei verschiedenen Kulturbedingungen	69
Tabelle 4.6: Der Einfluß von reduziertem Wachstum auf die spezifische Produktbildungsrate und Glucoseverbrauchsrate	71
Tabelle 4.7: Relative Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit von der Mediumzusammensetzung	73
Tabelle 4.8: Zusammenfassung der kinetischen Parameter	74
Tabelle 4.9: Komplexbildungskonstanten	89
Tabelle 4.10: Wachstum auf Medien mit verschiedenen Komplexbildnern	91

Tabelle 4.11: Einfluß der Komplexbildungsstärke auf die Verfügbarkeit von Calcium.....	91
Tabelle 4.12: Einfluß von EDTA auf durch Antibiotika zum Ruhen gebrachte Zellen.....	92
Tabelle 4.13: Die optimalen Kulturbedingungen und das optimale Medium zur kontinuierlichen Kultur von wachsenden Zellen	95
Tabelle 4.14: Qualitative Vor- und Nachteile einer Wachstumsentkopplung der Leucinproduktion.....	95
Tabelle 4.15: Konzentrationsverhältnisse auf den Zellwandoberflächen von Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien	116
Tabelle 4.16: Klassifizierung der Hydrophobizität von verschiedenen Mikroorganismen	119
Tabelle 4.17: Maximale Raum-Zeit-Ausbeuten bei der L-Leucinfermentation mit verschiedenen Methoden der Zellrückhaltung bzw. Rückführung	159
Tabelle A1: Wachstum auf mit verschiedenen pH-Puffern versetzten Medien	A15

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Art.	Artikel
DEAE	Diethylaminoethyl
dest.	destilliert
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-Aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
Glu	Glucose
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Kap.	Kapitel
Ket	Ketosäure
Leu	Leucin
Mol. Gew.	Molekulargewicht
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
n. Vors.	nach Vorschrift
NI	Normliter (1 bar, 0°C)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
PEI	Polyethylenimin
pK _i	isoelektrischer Punkt
Pyr	Pyruvat
sp.	species
spez.	spezifisch
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TS	Trockensubstanz
vvm	Volumen/Volumen/min

Begriffsdefinitionen

Scheinbare Dichte	Dichte des porösen Sinterglases, welches sich aufgrund des äußeren Volumens des Materials (Glas und Luft in den Poren) berechnet
Reaktorvolumen	Gesamtes Flüssigkeitsvolumen (einschließlich Volumen in den Poren des Sinterglases, im äußeren Umlauf und Küvettenkreislauf) ohne Gasraum
Umbautes Reaktorflüssigkeitsvolumen	Volumen des leeren Reaktors ohne Sinterglas (einschließlich Volumen im äußeren Umlauf und Küvettenkreislauf) ohne Gasraum
Frei suspendierte Mikroorganismen	Mikroorganismen, die in der Fermentationsflüssigkeit innerhalb und außerhalb der Poren suspendiert sind und nicht an der Wand des Sinterglases haften
Aktive immobilisierte Biomassekonzentration	Am Sinterglas immobilisierte auf ein Liter Reaktorvolumen (s.o.) bezogene Biomasse, mit der Aktivität der suspendierten Mikroorganismen
Freie Fermentationsflüssigkeit	Fermentationsflüssigkeit außerhalb der Poren des Sinterglases
Adhäsion von Mikroorganismen	Adsorption und Flockulation von Mikroorganismen
k_{La} -Wert	Sauerstoffübergangskoeffizient aus der Gasphase in die Flüssigphase
Trägerkörper	Füllkörper aus Sinterglasmaterial, an denen Mikroorganismen adsorbieren können

1. Einleitung

1.1. Die Aminosäure Leucin und ihre Gewinnung

Im Jahr 1908 wurde die Aminosäure L-Glutamat als der wichtigste geschmacksverstärkende Bestandteil von Konbu identifiziert, einem traditionell in der japanischen Küche als Würzmittel verwendeten Seetang (Hirose und Shibai, 1980a). Die Entdeckung leitete die industrielle Gewinnung von Aminosäuren ein, die bis 1980 auf eine Weltproduktion von über 500.000 Tonnen pro Jahr angestiegen ist. Während zunächst die Hydrolyse von Proteinen die einzige Methode zur Herstellung von L-Aminosäuren darstellte, gewannen nach 1956 mikrobielle Verfahren zunehmend an Bedeutung.

Die Einsatzmöglichkeiten von Aminosäuren sind vielfältig. Im Jahr 1980 wurden 340.000 Tonnen L-Glutamat gewonnen und vor allem in der Lebensmittelindustrie verwendet. Von D,L-Methionin und L-Lysin wurden jährlich 120.000 bzw. 34.000 Tonnen hergestellt und zur Supplementierung von Futtermitteln in der Masttierhaltung verbraucht (Hoppe und Martens, 1984). Im Vergleich dazu macht L-Leucin mit einem jährlichen Bedarf von 150 Tonnen einen geringen Anteil aus und kommt hauptsächlich in Infusionslösungen zur Anwendung.

In biologischen Materialien spielt L-Leucin generell eine große Rolle. So ist es im Gesamtprotein von *E. coli* bzw. *Brevibacterium* nach Alanin, Glutamat und Aspartat mit etwa 8 mol% die vierthäufigste Aminosäure (Roberts et al., 1955; Miller und Thayer, 1979) und auch in allen Pflanzenproteinen, z.B. in Reis- oder Sojaweiß, reichlich enthalten. Bei Säuglingen stellt Leucin mit einem Tagesbedarf von 160 mg/kg Körpergewicht die mengenmäßig wichtigste essentielle Aminosäure dar (Hoppe und Martens, 1983).

Für die Gewinnung von L-Leucin stehen heute sechs verschiedene Produktionskonzepte zur Verfügung:

- 1) Aufreinigung aus Proteinhydrolysaten und Rohmelasse
- 2) Enzymatische Racematspaltung von chemisch synthetisiertem D,L-Leucin nach dem Acylase-Verfahren (Chibata et al., 1985)
- 3) Enzymatische Racematspaltung von chemisch synthetisiertem D,L-Leucin mit D-Aminosäure-Oxidase (Brodelius et al., 1980)
- 4) Herstellung im Enzymmembranreaktor mit Cofaktor-Regenerierung (Wandrey et al., 1981)
- 5) Mikrobielle Herstellung mit Mutanten aus Glucose oder Melasse (Araki et al., 1974; Tsuchida et al., 1975)

6) Mikrobielle Herstellung mit Wildstämmen aus der chemischen Vorstufe α -Ketoisocaprinsäure (Groeger, 1986)

Der momentane Weltbedarf wird vor allem mit Verfahren gedeckt, die auf der ersten Methode und zu einem geringeren Anteil auch auf der fünften Methode basieren (Yoshinaga und Nakamori, 1983). Die maximal erreichbare Produktkonzentration wird durch die relativ geringe Löslichkeit des L-Leucins von 24.3 g/l bei 25°C (Dawson et al., 1986) begrenzt. Die sechste Methode bietet aus technischer Sicht einige interessante Vorteile.

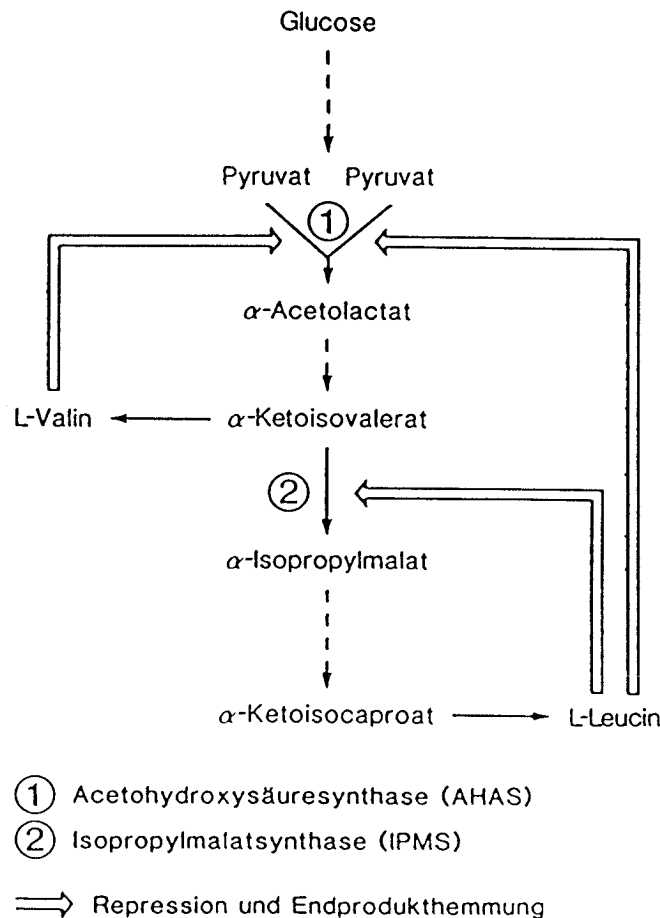


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges für L-Leucin

In der Regel produzieren Mikroorganismen die einzelnen Aminosäuren nur in solchen Mengen, wie diese für die Herstellung von zelleigenen Bestandteilen erforderlich sind. Wie Abb. 1.1 darstellt, werden im Biosyntheseweg von Leucin, ausgehend von Glucose, zwei Schlüsselenzyme durch das Endprodukt gehemmt bzw. reprimiert und damit eine Überproduktion verhindert. Diese Regulationsmechanismen müssen durch Mutationen der Mikroorganismen außer Kraft gesetzt werden, wenn Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet werden soll. Wird jedoch die chemische Vorstufe α -Ketoisocaprinsäure eingesetzt, so befindet man sich bereits "hinter" den regulierten Enzymen des Leucin-Biosyntheseweges.

Die Mikroorganismen haben deshalb keine Möglichkeit, eine Überproduktion der Aminosäure zu stoppen. Da nicht der ganze Biosyntheseweg durchlaufen wird, ist mit weniger Nebenprodukten zu rechnen. Die gegenüber Mutanten größere genetische Stabilität macht Wildstämme besonders geeignet für eine kontinuierliche Fermentationsführung.

1.2. Sinn und Methoden der Immobilisierung von Mikroorganismen

Am Anfang des vorigen Jahrhunderts wurde bereits mit der Tropfkörper-Essigsäurefabrikation der erste Bioprozeß mit immobilisierten Mikroorganismen eingeführt. Wenig später folgte ein Versuch zur kontinuierlichen Bierproduktion nach einem ähnlichen Konzept. Die wissenschaftliche Erforschung der Immobilisierung von ganzen Mikroorganismen begann allerdings erst um 1959 mit den Arbeiten von Hattori und Furusaka (1959). Die Autoren untersuchten die adsorptive Bindung von Zellen an Ionenaustauscherharzen. 1966 stellten schließlich Mosbach und Mosbach (1966) die heute bedeutende Technik der Einschlußverfahren von Mikroorganismen in Gelpartikel vor. Seither haben sich die Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet enorm verstärkt und führten bereits zur industriellen Verwirklichung von verschiedenen Bioprozessen mit immobilisierten Mikroorganismen (Chibata, 1974).

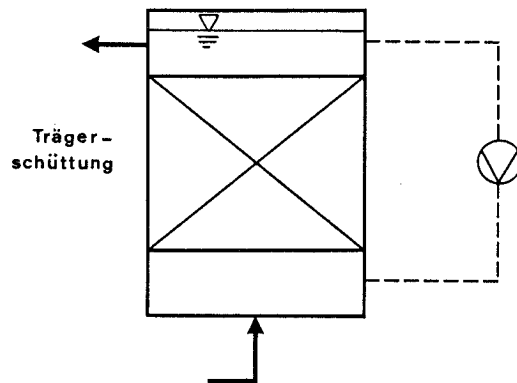
Nachdem zunächst Prozesse mit nicht reproduzierenden Mikroorganismen als Trägern von nutzbaren Einzelenzymaktivitäten im Mittelpunkt des Interesses gestanden hatten, ist in den letzten Jahren ein Trend zum Einsatz von lebenden, vermehrungsfähigen Zellen zu erkennen (Kolot, 1981; Berger 1982; Linko und Linko, 1983; Fujimura et al., 1984, Chibata et al., 1985). Diese eröffnen die Möglichkeit, enzymatische Mehrstufen-Reaktionen durchzuführen oder solche, die von einer Coenzym- bzw. ATP-Regenerierung abhängen.

Als Vorteile der Immobilisierung sind hervorzuheben:

- 1) Höhere Zelldichten im Bioreaktor und daraus resultierend höhere Raum-Zeit-Ausbeuten (besonders wichtig bei langsam wachsenden Zellen).
- 2) Höhere Prozeßstabilität. Keine Gefahr des Auswaschens einer kontinuierlichen Kultur in der Nähe der maximalen Wachstumsrate.
- 3) Geringere Gefahr einer Kontamination durch Fremdkeime durch hohe Zelldichten im Reaktor und hohe Durchflußraten (Margaritis und Merchant, 1984).
- 4) Einsparung an Kohlenstoffquelle (Substrat), wenn die Mikroorganismen ausschließlich katalytische Funktionen erfüllen und ihr Wachstum ohne Beeinflussung der spez. Produktivität gedrosselt werden kann (Messing, 1981).

Es stehen heute eine große Anzahl von verschiedenen Techniken der Immobilisierung zur Verfügung. Man kann generell unterscheiden zwischen (s. Abb. 1.2):

(a)



(b)

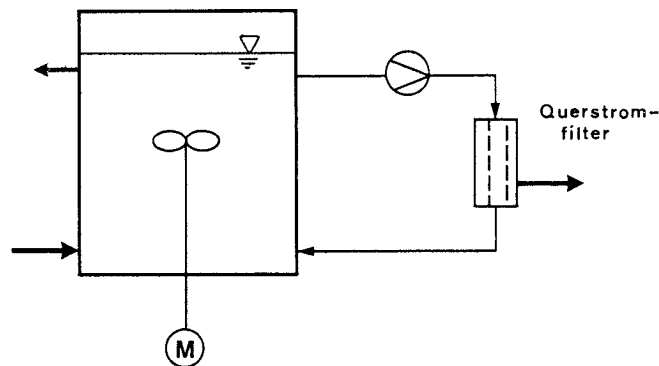


Abb. 1.2: Techniken der Immobilisierung

(a): Rückhaltung der Mikroorganismen durch Trägerfixierung

(b): Mechanische Abtrennung der frei suspendierten Mikroorganismen am Beispiel der Querstromfiltration

1) Rückhaltung der Mikroorganismen durch Trägerfixierung

2) Mechanische Abtrennung der frei suspendierten Mikroorganismen durch Filtration, Zentrifugalseparation oder Sedimentation

Die Trägerfixierung ist einfach und billig und benötigt keine komplizierten mechanischen Teile. Die Kontaminationsgefahr ist geringer einzuschätzen als bei den anderen Methoden (Black et al., 1984; Margaritis und Merchant, 1984). Es wurden daher in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener Techniken zur Trägerfixierung von Mikroorganismen entwickelt. Zur Auswahl einer für die praktische (industrielle) Anwendung geeigneten Methode wurden von der "Working Party of the European Federation of Biotechnology" (Konecny, 1984) und von Kolot (1981) Richtlinien erarbeitet und veröffentlicht.

Die vier wichtigsten Methoden der Trägerfixierung sind in Tabelle 1.1 aufgeführt und im Hinblick auf sehr aktive, aerobe mikrobiologische Systeme, z.B. Aminosäurefermentationen, bewertet.

Kriterium	Immobilisierungsmethode			
	Flockulation	Einschluß	Kovalente Bindung ¹	Adsorption ¹
Herstellung der Immobilisate	einfach	mittel	schwierig	einfach-(mittel) ²
Immobilisierte Biomasse	gering-(sehr hoch) ³	hoch	gering	mittel
Bindungsstärke	schwach-(mittel) ⁴	stark	stark	schwach-(mittel) ⁴
Diffusionswiderstände	mittel-(groß) ⁵	groß	gering	gering-(mittel) ⁶
Toxische Auswirkungen der Immobilisierung	keine	eventuell	stark	keine
Sterile Handhabung (Reaktorbefüllung)	einfach	schwierig	schwierig	einfach
Regenerierung des Trägermaterials	-	unmöglich	kaum möglich	einfach
Austausch des Trägermaterials	einfach	schwierig	sehr schwierig	nicht nötig
Druckfestigkeit (Stapelbarkeit)	-	mittel	gut	gut
Mechanische Haltbarkeit	gering	mittel	gut	gut
Spezifische Dichte ⁷	gering	gering	hoch	hoch
Praktische Anwendbarkeit	keine	mittel	gering	hoch

¹: Kovalente Bindung und Adsorption an anorganische Trägermaterialien. ²: gilt bei aufwendigen Oberflächenmodifizierungsmethoden; ³: gilt nur bei geringen Turbulenzen im Reaktor; ⁴: abhängig von Bindungsmechanismus und Medieneigenschaften; ⁵: abhängig vom Flockendurchmesser; ⁶: gilt bei starker mehrschichtiger Adsorption; ⁷: hohe Dichte ermöglicht hohe Fest-Flüssig-Relativgeschwindigkeiten und damit guten Stoffaustausch

Tabelle 1.1: Bewertender Vergleich der wichtigsten Methoden zur Trägerfixierung von Mikroorganismen im Hinblick auf ein aktives, aerobes mikrobiologisches System

Flockulierte Mikroorganismen werden u.a. in der Abwassertechnik und zur Ethanolherstellung mit Erfolg eingesetzt, da sich durch diese Technik sehr hohe Zelldichten erzielen lassen (Klein und Wagner, 1983). Bei sehr aktiven, aeroben Prozessen ist diese Methode allerdings nicht anwendbar. Hohe Turbulenzen und Scherkräfte, die aus Gründen eines ausreichenden Stoffaustausches erforderlichen sind, würden im Bioreaktor zur gleichmäßigen Verteilung oder Auflösung der Zellaggregate führen.

Vorherrschend bei der Immobilisierung mikrobieller Zellen ist zur Zeit der Einschluß in meist vernetzte Gele, z.B. aus Polyacrylamid, Alginat oder Carrageenan, bzw. Membranen oder Folien aus z.B. photovernetzbaaren Harzen oder Collagen. Etwa 70 - 80 % der bis 1981 publizierten Arbeiten befassen sich mit dieser Art der Immobilisierung (Berger, 1981). Sie ist jedoch meist auf Prozesse mit toten oder lebenden, anaeroben Zellen beschränkt. Seit 1973 wird L-Malat und die Aminosäure L-Aspartat im industriellen Maßstab mit Gel-immobilisierten Zellen hergestellt. In beiden Fällen werden permeabilisierte Zell-Skelette verwendet. Auch andere Aminosäuren wie Alanin, Tryptophan, Lysin, Citrullin, Tyrosin und Phenylalanin wurden auf diese Weise gewonnen (Chibata et al., 1985).

Bei aktiven aeroben Prozessen steht dem Gel-Einschluß der lebenden Zellen vor allem der daraus resultierende hohe Diffusionswiderstand entgegen. In der Literatur wird wiederholt auf das bei dieser Immobilisierungsmethode kaum zu lösende Problem der ausreichenden Sauerstoffversorgung hingewiesen (Jack und Zajic, 1977a; Ghommidh et al., 1982; Enfors und Mattiasson, 1983; Konecny, 1984).

Methode	Material	Organismus	Produkt	Raumzeitausbeute [g/l/d] ¹	Literatur
Geleinschluß	Polyacrylamid	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Glutamat	3.75	Slowinski and Charm (1973)
Geleinschluß	Carrageenan	<i>Serratia marcescens</i>	L-Isoleucin	5.4 ²	Wada et al. (1980)
Membraneinschluß	Collagen	<i>Brevibacterium flavum</i>	L-Glutamat	k.A.	Constantinides et al. (1981)
Geleinschluß	Carrageenan	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Glutamat	25.9	Kim and Ryu (1982)
Adsorption	Silikate	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Valine	28.8	Boirie et al. (1983)
Geleinschluß	Photovernetzbares Harz	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	L-Lysin	6	Ajinomoto (1983)
Geleinschluß	Carrageenan	<i>Serratia marcescens</i>	L-Arginin	24	Fujimura et al. (1984)
Geleinschluß	Carrageenan	<i>Brevibacterium flavum</i> ³	L-Glutamat	2.3	Karube et al. (1987)

¹: Maximalwerte, berechnet aus gesamter Fermentationszeit (Batch) bzw. mittlerer Verweilzeit (Kontin. Kultur) und Produktkonzentration; ²: bezogen auf beide Reaktorstufen; ³: Protoplasten

Tabelle 1.2: Bisher publizierte Arbeiten über die Aminosäure-Produktion mit lebenden, trägerfixierten Mikroorganismen

In Tabelle 1.2 sind eine Reihe von Arbeiten mit lebenden, Gel-immobilisierten Mikroorganismen zur Aminosäureproduktion aufgeführt. Die erreichten Produktivitäten sind jedoch kaum höher als bei konventionellen Fermentationsverfahren. Die Sterilität bereitet Schwierigkeiten (Constantinides et al., 1981) und ist offenbar nur mit Antibiotika-Zugabe zu beherrschen (Fujimura

et al., 1984). Es besteht keine Möglichkeit zur Regenerierung des Trägermaterials. Der Bioreaktor muß mit erheblichem Aufwand vollständig entleert werden, wenn die Immobilisate verbraucht sind. Ein weiterer Nachteil ist die relativ geringe mechanische Stabilität der Gelpartikel. So ist im unteren Bereich von großen Festbettreaktoren mit einer Deformierung der Partikel zu rechnen, die zu hohen Druckverlusten führen kann (Mattiasson, 1983; Klein und Wagner, 1983). Bei lang anhaltendem Dauerbetrieb kommt es häufig zu einer Zerfaserung der Gelpartikel durch wachsende und austretende Mikroorganismen und CO₂-Gasblasen (Margaritis und Merchant, 1984; Voss, 1987). Die spez. Dichte der Immobilisate ist sehr gering, was im Wirbelschichtreaktor zu ungünstigen Fließeigenschaften führt (Venkatasubramanian et al., 1983). Verfahren zur Beschwerung der Gelpartikel mit Quarz (Constantinides und Chotani, 1984) oder Stahl (Verax, 1987) sind für die allgemeine Anwendung zu aufwendig.

Die kovalente Bindung von Mikroorganismen an feste Trägermaterialien wurde bisher noch nicht in befriedigendem Maße gelöst (Berger, 1982; Blanch, 1984). Die Kopplungsreaktionen können auf die Zellen toxische Nebenwirkungen ausüben. Die sterile Herstellung der Immobilisate ist sehr aufwendig. Das Trägermaterial ist kaum regenerierbar. Wegen der festen Bindung, die theoretisch zu erwarten ist, und der geringen Diffusionsbehinderung dürfte die Technik der kovalenten Bindung eine Zukunft haben (Berger, 1981).

Tabelle 1.1 zeigt, daß die Immobilisierung von lebenden aeroben Mikroorganismen am besten durch eine adsorptive Bindung an feste Trägermaterialien erfolgt (Mattiasson, 1983). Die gebundene Biomasse ist allerdings geringer als z.B. bei der Einschlußmethode. Anorganische poröse Trägerkörper sind wegen ihrer größeren Stabilität und spez. Dichte denjenigen aus organischen Materialien vorzuziehen (Kennedy und Chabral, 1983). Die Zugänglichkeit der Fermentationsflüssigkeit (und damit der Substrate) zu den adsorbierten Zellen ist gut und die Diffusionswiderstände sind daher gering (Konecny, 1984). Für die praktische Anwendung dürfte die Tatsache entscheidend sein, daß geeignete Trägerkörper zur Regenerierung im Reaktor verbleiben können und sich für weitere Fermentationsansätze wiederverwenden lassen (Kennedy und Cabral, 1983; Mattiasson, 1983).

Anorganische poröse Trägerkörper können natürlicher (z.B. Lava) oder synthetischer Herkunft sein. Die letzteren haben den Vorteil, daß durch den Herstellungsprozeß jede gewünschte Form erzeugt werden kann. Die Porengrößen lassen sich genau einstellen und große Oberflächen erzeugen. Von Messing und Oppermann (1979) und Navarro und Durand (1977) wurden Glasmaterialien mit sehr kleinen Poren (im Bereich der Größe der Mikroorganismen) verwendet. Es ist allerdings zu bezweifeln, ob derart immobilisierte Mikroorganismen ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden können (Venkatasubramanian und Karkare, 1983). Einen guten Kompromiß zwischen hoher Oberfläche und großem Diffusionsquerschnitt stellen die von der Firma Schott produzierten Glaskörper (Siran) dar, welche für die anaerobe Abwasserreinigung von Aivasidis (1988) optimiert wurden. Diese Trägerkörper kamen außerdem bei Bisping und Rehm (1986) und Hartmeier et al. (1987) erfolgreich zum Einsatz.

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Angesichts des wachsenden Bedarfs an Aminosäuren wird weltweit intensiv an einer Verbesserung der Herstellungsverfahren für diese Substanzklasse gearbeitet. Die Entwicklung geeigneter Immobilisierungsmethoden steht dabei mit im Vordergrund des Interesses (Enei et al., 1982).

Ziel und Aufgabe dieser Arbeit war es, Methoden und Verfahrenstechnik der Trägerfixierung von lebenden Mikroorganismen an offenporigem Glassintermaterial zu untersuchen. Diese Immobilisierungstechniken sollten am Beispiel der aeroben, fermentativen Gewinnung der Aminosäure L-Leucin aus α -Ketoisocaproinsäure mit *Corynebacterium glutamicum* entwickelt und optimiert werden. Da es sich dabei um ein mikrobiologisches System mit sehr hohem Sauerstoffbedarf handelt, mußte auf eine möglichst geringe Diffusionsbehinderung geachtet werden.

Aufgabenstellung:

- 1) Überführung der bisher nur im Batch-Betrieb erprobten Umsetzung von α -Ketoisocaproinsäure zu L-Leucin in kontinuierliche Kultur. Klärung der dafür maßgebenden mikrobiologischen Fragen.
- 2) Untersuchung der Fähigkeit der eingesetzten Mikroorganismen, an unbehandelten Glasoberflächen adsorptiv zu binden und diese zu besiedeln. Gegebenenfalls Verbesserung der Trägerkörper durch eine Oberflächenmodifizierung. Kovalente Bindung der Mikroorganismen als Alternative zur adsorptiven Trägerfixierung.
- 3) Klärung der wesentlichen Mechanismen bei mikrobiellen Adhäsionsphänomenen. Suche nach Möglichkeiten zur gezielten Beeinflussung der Adsorption im Sinne einer optimalen Biomassebeladung der Glaträger.
- 4) Modellierung des Prozesses zur Voraussage des Betriebsverhaltens eines Reaktors mit trägerfixierten Mikroorganismen.
- 5) Modellierung des Stofftransports im bewachsenen Sinterglas
- 6) Aufbau von geeigneten Reaktorsystemen (Festbettumlaufreaktor bzw. Wirbelschichtreaktor) zur Beurteilung der neu zu entwickelnden Immobilisierungstechniken. Vergleich der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Reaktorsysteme untereinander und mit bekannten Aminosäure-Produktionsmethoden unter Verwendung immobilisierter Mikroorganismen.

2. Grundlagen & Theorie

2.1. Coryneforme Bakterien und ihr Stoffwechsel

Corynebacterium glutamicum ist seit 1957 als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus bekannt (Kinoshita et al., 1957). Die Zellen haben eine wechselnde Morphologie, sie sind unbeweglich, aerob und färben Gram-positiv. Taxonomisch eng verwandt sind die Brevibakterien (besonders *Brevibacterium flavum*). Die coryneformen Bakterien, bzw. die aus den Wildstämmen gewonnenen Mutanten, sind die heute industriell am häufigsten eingesetzten Mikroorganismen zur Produktion von fast allen Aminosäuren (Aida et al., 1986). Abb. 2.1 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* auf einer Sinterglasunterlage.

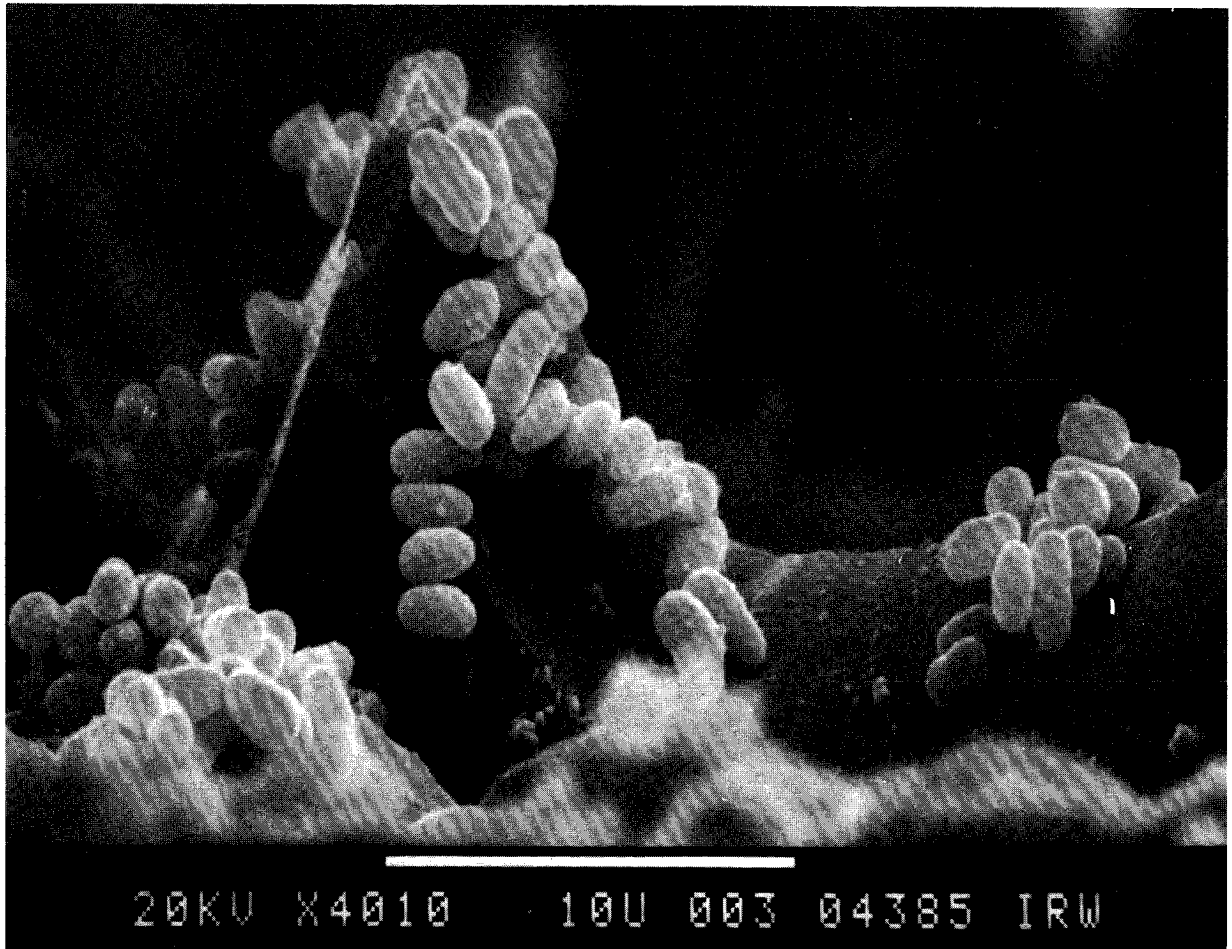


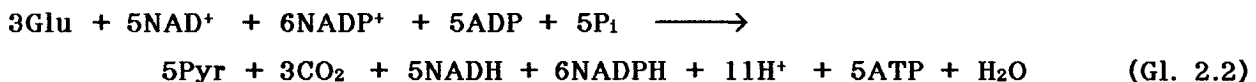
Abb. 2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* auf Sinterglas (Die Länge des weißen Balkens am unteren Bildrand entspricht 10 µm.)

2.1.1. Abbau von Glucose bis zum Pyruvat

Die Metabolisierung von Glucose erfolgt über den Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) und über den Phosphogluconat-Weg (s. Abb. 2.2). Bei dem ersteren wird ein Mol Glucose (Glu) über mehrere Stufen zu zwei Molen Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt, welches unter Bildung von NADH in den folgenden Schritten zu Pyruvat (Pyr) weiterreagiert. Bei dem Abbau wird Energie als ATP gespeichert. Man spricht von der Substratketten-Phosphorylierung. Die Bilanzgleichung der Glycolyse bis zum Pyruvat ergibt:



Der Phosphogluconat-Weg geht vom Glucose-6-phosphat aus und mündet nach mehreren variablen Stufen auf der Höhe des Fructose-6-phosphat und des Glycerinaldehyd-3-phosphat in die Glycolyse ein. Da beide Endprodukte theoretisch wieder zu Glucose-6-phosphat umgesetzt werden können, handelt es sich formal um einen Kreisprozeß. Man spricht deshalb auch von dem Pentosephosphat-Cyclus. Die gekoppelte Bilanzgleichung des Phosphogluconat-Weges einschließlich der durchlaufenen glycolytischen Abbaureaktionen bis zum Pyruvat ergibt:



NADH wird in lebenden Organismen generell in der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette, s.u.) regeneriert und damit zur Energieproduktion in Form von ATP genutzt. NADPH dient vor allem als Überträger von Reduktionsäquivalenten in Synthesereaktionen. Der Phosphogluconat-Weg wird daher von den Mikroorganismen immer dann aktiviert, wenn besonders hoher Bedarf an NADPH für die Biosynthese von Zellmaterial besteht.

2.1.2. Oxidative Phosphorylierung

Das in den Zellen gebildete NADH wird in der Atmungskette gemäß folgender Gleichung oxidiert:



Die bei der Oxidation von NADH frei werdende Energiemenge ist weitaus größer als der ATP-Gewinn in der Substratketten-Phosphorylierung. Ein Mol FADH_2 liefert nach einer entsprechenden Gleichung 2 Mole ATP. Unter Umständen kann auch NADPH veratmet werden.

2.1.3. Aerober Abbau von Pyruvat

Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat in dem sich an die Glycolyse anschließenden Citronensäure-Cyclus zu CO_2 unter Bildung von Reduktionsäquivalenten umgesetzt (s. Abb. 2.2). In coryneformen Bakterien

existiert nur eine NADP⁺-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, nicht jedoch eine NAD⁺-abhängige, wie in vielen anderen Organismen (Shio und Ozaki, 1970; Groeger, 1986). Die Bilanzgleichung des Citronensäure-Cyclus lautet:

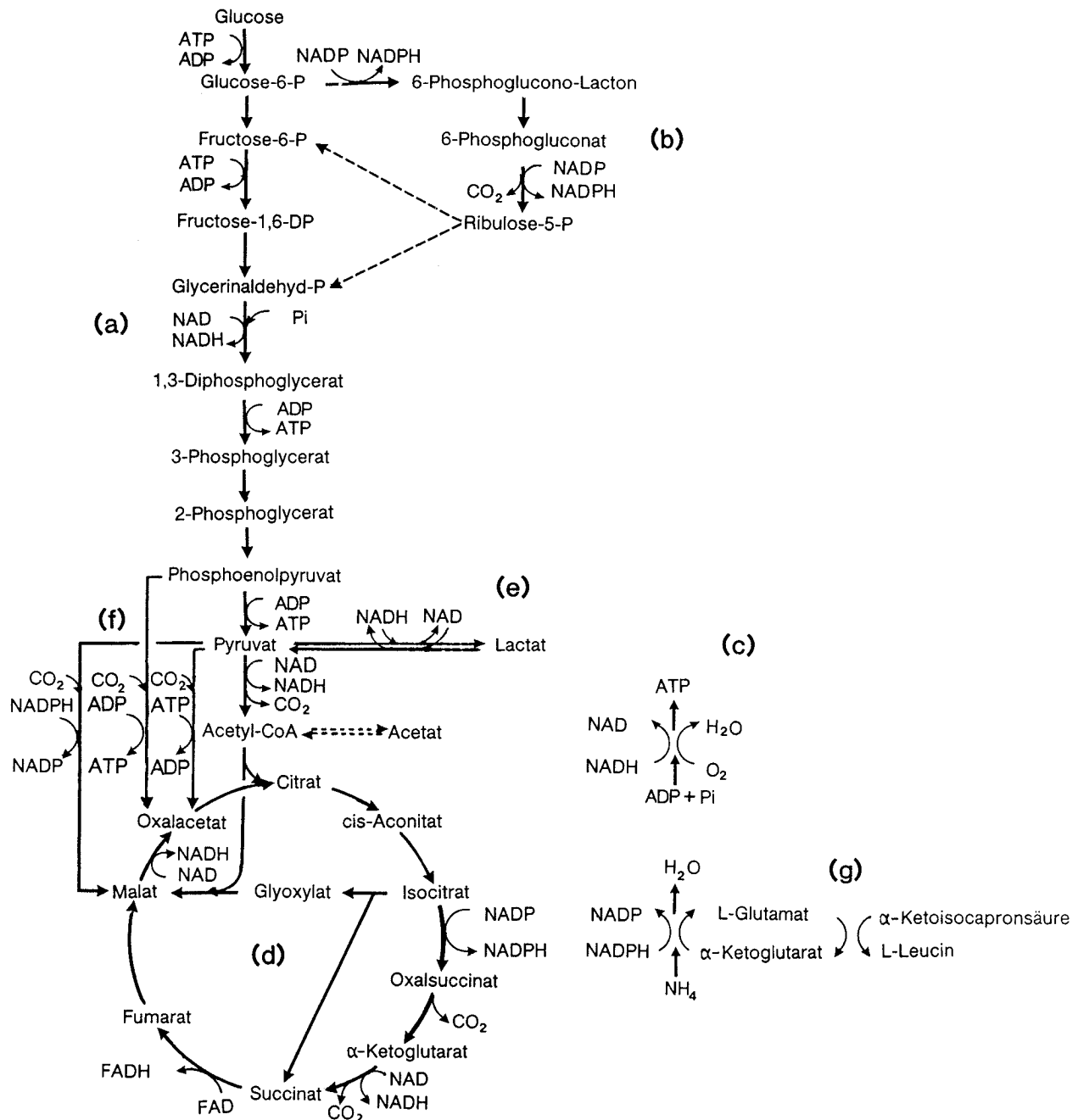
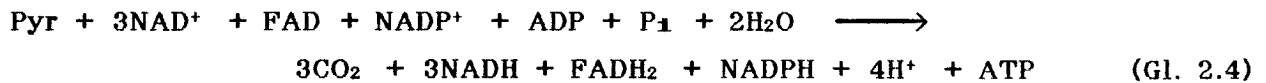


Abb. 2.2: Stoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum*

(a): Glycolyse; **(b):** Phosphogluconat-Weg; **(c):** Oxidative Phosphorylierung; **(d):** Citronensäure-Cyclus; **(e):** Lactatgärung; **(f):** Anaplerotische Auffüllreaktionen; **(g):** Leucinsynthese

Bis vor kurzem ließen sich in coryneformen Bakterien keine signifikanten α -Ketoglutarat-Dehydrogenase(KGDH)-Aktivitäten nachweisen. α -Ketoglutarat müßte sich folglich aufstauen und könnte zu Glutamat abgebaut werden. Darin hatte man den Grund für die herausragenden Aminosäure-Produktionseigenschaften dieser Bakterienklasse gesehen. Shiio und Ujigawa-Takeda (1980) konnten schließlich zeigen, daß doch eine funktionsfähige KGDH vorhanden ist, die sich allerdings als ungewöhnlich empfindlich und hoch reguliert erwies. Das Enzym ist unter normalen Kulturbedingungen aktiv, und der Citronensäure-Cyclus arbeitet vollständig. Unter Glutamat-produzierenden Bedingungen (permeabilisierte Zellwand) kann die KGDH jedoch gänzlich deaktiviert werden. Damit versuchen die Mikroorganismen dem Absinken der zellinternen Glutamat-Konzentration entgegenzuwirken, indem der Stofffluß des Citronensäure-Cyclus beim α -Ketoglutarat gestoppt und umgelenkt wird.

2.1.4. Anaerober Abbau von Pyruvat

Unter anaeroben Bedingungen kann das in den Zellen gebildete NADH nicht über die Atmungskette regeneriert werden. Es staut sich auf und blockiert damit vor allem den Citronensäure-Cyclus. Die coryneformen Bakterien können dann auf Gärungsreaktionen (z.B. für Lactat, Acetat, usw.) ausweichen. Die Bilanzgleichung der Lactatgärung aus Pyruvat lautet:



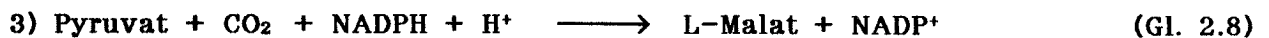
Die Kopplung dieser Reaktion mit (Gl. 2.1) oder (Gl. 2.2) zeigt, daß sämtliches NADH, welches beim Glucoseabbau bis zum Pyruvat gebildet wird, unter Entstehung von Lactat regeneriert und der Stofffluß aufrecht erhalten werden kann. Der Energiegewinn der Gesamtreaktion beschränkt sich auf das in der Substratketten-Phosphorylierung gebildete ATP.

Unter mikraeroben Bedingungen (d.h. laufende, aber ungenügende Sauerstoffzufuhr, $p\text{O}_2 = 0$) finden die vollständige Oxidation von Glucose durch den Citronensäure-Cyclus und die Gärungsreaktionen gleichzeitig statt. Die unter Sauerstoffmangel ausgeschiedenen anaeroben Stoffwechselprodukte wie Lactat können von den Mikroorganismen bei Wechsel auf aerobe Bedingungen wieder aufgenommen und weiter umgesetzt werden.

2.1.5. Anaplerotische Auffüllreaktionen

Befindet sich ein Organismus im Wachstum, so werden für die Biosynthese von Zellmaterial organische Grundbausteine benötigt. Diese werden zum Teil dem Citronensäure-Cyclus entnommen. Die aus dem Kreislauf ausgeschleuste Kohlenstoffmenge muß jedoch entsprechend wieder ersetzt werden, da sonst der Cyclus aus stöchiometrischen Gründen zum Erliegen kommen würde. Zu diesem Zweck besitzen die Zellen die folgenden sog. anaplerotischen (Auffüll-) Reaktionen:





4) Glyoxylat-Kurzschluß

Die ersten drei Gleichungen repräsentieren CO₂-fixierende Reaktionen und führen zum Einschleusen von Kohlenstoff in den Citronensäure-Cyclus. Der Glyoxylat-Kurzschluß ist vor allem bedeutsam beim Wachstum auf Acetat. Er umgeht die Decarboxylierung von α-Ketoglutarat im Cyclus (vermeidet dadurch den Verlust von CO₂) bei gleichzeitiger Aufnahme eines Acetyl-CoA. Alle vier anaplerotischen Reaktionen, besonders 1) und 4), sind in coryneformen Bakterien aktiv.

2.1.6. Leucinbildung

Die Leucinbildung aus α-Ketoisocaproonsäure ist in Abb. 2.2 schematisch mit dargestellt. Sie erfolgt unter gekoppelter Katalyse der Transaminase B und der Glutamat-Dehydrogenase (Groeger, 1986). L-Glutamat dient als Aminodonor und wird bei dieser Reaktion zu α-Ketoglutarat deaminiert. Zur Regenerierung von L-Glutamat wird NADPH aus dem Energie-Stoffwechsel der Zellen abgezogen. Als das wichtigste NADPH-liefernde Enzym ließ sich die Isocitrat-Dehydrogenase nachweisen, während sowohl die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als auch die 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase des Phosphogluconat-Weges und das Malatenzym (3. Anaplerotische Reaktion, s.o.) von untergeordneter Bedeutung sind.

Leucin wird auch von ruhenden Zellen gebildet. Das ist nur bei vollständig arbeitendem Citronen-Cyclus möglich. Dabei entstehen im Energiestoffwechsel pro Mol Glucose 2 Mole NADPH, was theoretisch die Synthese von zwei Molen Leucin ermöglichen würde. Als "Nebenprodukt" werden pro Mol Glucose 10 Mole NADH (FADH₂) gebildet. Diese müssen in der Atmungskette oxidiert werden und erklären den enormen Sauerstoffbedarf der Zellen (s. Kap. 4.1.1.3.3.). Unter anaeroben Bedingungen ist keine Leucinbildung möglich.

Bei sich vermehrenden Zellen wird ein Teil des in den Mikroorganismen erzeugten NADPH für die Biosynthese von Zellmaterial benötigt. Die molare Ausbeute an Leucin bezogen auf Glucose wird folglich niedriger sein als bei ruhenden Zellen. Unter Wachstumsbedingungen arbeiten die anaplerotischen Reaktionen. Ein aktiver Glyoxylat-Kurzschluß wirkt sich dabei ungünstig aus, da er das wichtigste NADPH-liefernde Enzym, die Isocitrat-Dehydrogenase, umgeht.

2.2. Grundlagen der mathematischen Behandlung mikrobiologischer Prozesse

2.2.1. Wachstum in einer Batch-Kultur

Das Wachstum von Mikroorganismen auf frischem Nährmedium unter optimalen Bedingungen läßt sich in verschiedene Phasen unterteilen. Nach dem Animpfen müssen die Mikroorganismen zunächst ihren Stoffwechselapparat an die neuen Bedingungen anpassen (Synthese von Enzymen, usw.). Es vergeht daher einige Zeit (Lag-Phase), bevor es zum ersten merklichen Wachstum kommt. Nach einer Übergangsphase erreichen die Mikroorganismen ihre maximal mögliche Wachstumsgeschwindigkeit (Exponentielle Phase), bis ein essentieller Bestandteil des Mediums verbraucht ist. Nach einer stationären Phase, die vor allem von der Menge der in den Zellen vorhandenen Reservestoffe abhängig ist, gehen die Zellen in die Absterbephase über.

Die Wachstumsgeschwindigkeit (Änderung der Mikroorganismenkonzentration) wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$dX/dt = \mu \cdot X \quad [\text{gTS/l/h}] \quad (\text{Gl. 2.9})$$

mit X = Biomassekonzentration [gTS/l]
 μ = Spez. Wachstumsrate [1/h]
 t = Zeit [h]

Sie ist abhängig von der aktuellen Biomassekonzentration X und der spez. Wachstumsrate μ , welche die speziellen Eigenschaften des Mikroorganismus und den Einfluß der momentanen Kulturbedingungen erfaßt.

Für die modellmäßige Beschreibung von μ sind mehrere Ansätze vorgeschlagen worden. Allgemein durchgesetzt hat sich die Gleichung von Monod, die sich an die für einfache Enzymreaktionen hergeleitete Michaelis-Menten-Gleichung anlehnt:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (S + K_s) \quad [1/h] \quad (\text{Gl. 2.10})$$

$\mu_{\max}$ [1/h] ist definiert als die bei gegebenen Medien und Kulturbedingungen maximal mögliche Wachstumsrate eines speziellen Mikroorganismus. S [g/l] stellt diejenige Substratkomponente dar, die als erste durch den Medienverbrauch der Zellen auf Wachstum-limitierende Konzentrationen abfällt. Bei der Komposition von synthetischen Fermentationsmedien wird im allgemeinen darauf geachtet, daß nur eine Komponente (häufig die Kohlenstoffquelle) limitierend wirkt. Alle weiteren Substratbestandteile können dann in der mathematischen Beschreibung unbeachtet bleiben. Die Substratsättigungskonstante K_s [g/l] läßt sich sehr einfach aus der Monod-Darstellung bei halbmaximaler Wachstumsrate abgreifen. Wie Abb. 2.3 veranschaulicht, wachsen die Mikroorganismen bei hohen Substratkonzentrationen unlimitiert mit maximaler Wachstumsrate $\mu_{\max}$ (Reaktion 0. Ordnung). Nach Unterschreiten einer gewissen Grenzkonzentration wird das

Wachstum merklich limitiert und geht bei sehr kleinen Werten in eine nahezu lineare Abhängigkeit von S über (Reaktion 1. Ordnung).

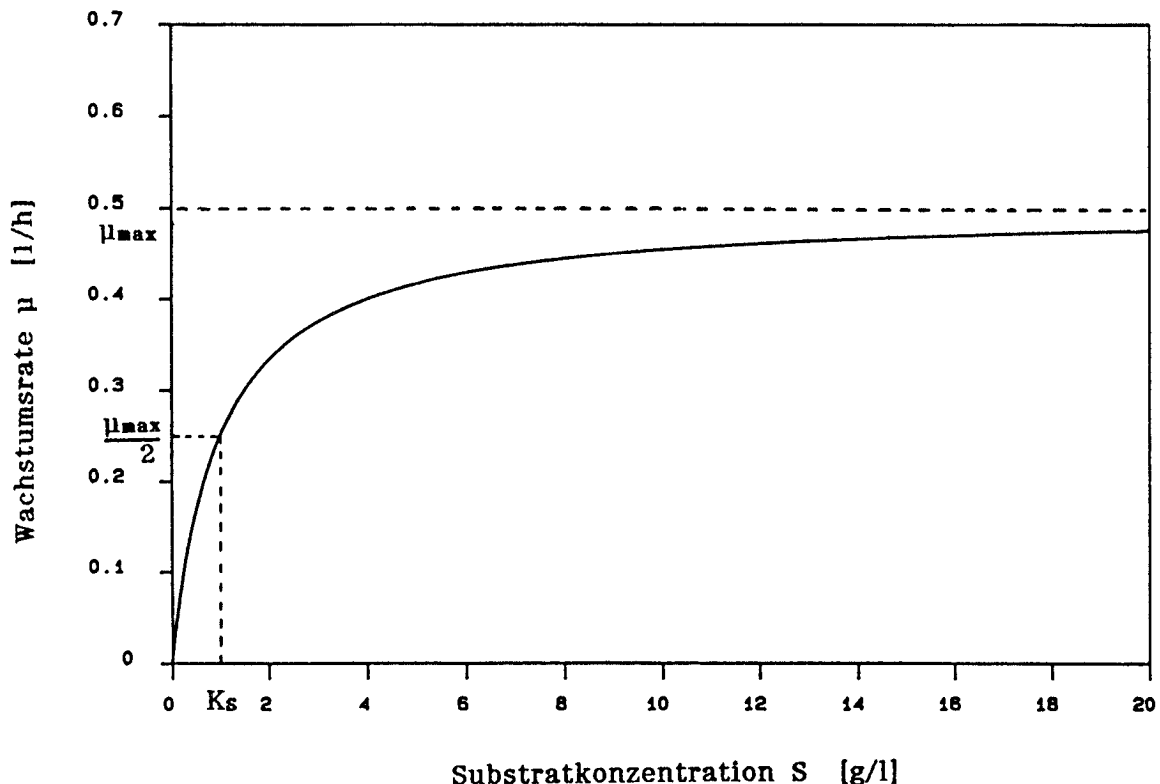


Abb. 2.3: Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der limitierenden Substratkonzentration S nach Monod
Parameter: $\mu_{max} = 0.5/h$; $K_s = 1 \text{ g/l}$

Bei aeroben Kulturen kann der nötige Sauerstoff wegen der sehr geringen Löslichkeit nicht wie die anderen Bestandteile vollständig von Anfang an im Nährmedium vorgelegt werden. Er muß daher während der Fermentation kontinuierlich nachgeliefert werden. Ist der Sauerstoff das limitierende Substrat, so kommt es bei Erreichen der limitierenden Konzentration zu einer linearen Abhängigkeit des Wachstums der Mikroorganismen von der Sauerstoffversorgung.

2.2.2. Kontinuierliche Kultur

Während die Batch-Kultur durch sich ständig ändernde Umgebungsbedingungen gekennzeichnet ist, an die sich die Mikroorganismen entsprechend anpassen müssen, können in kontinuierlicher Kultur alle Prozeßparameter konstant gehalten werden. Dabei wird dem Bioreaktor laufend frisches Medium zugeführt und gleichzeitig so viel Produktlösung wieder entnommen, daß der Flüssigkeitsstand im Reaktor auf gleicher Höhe bleibt. Die Durchflußrate D [1/h] errechnet sich aus der Summe der zufließenden Flüssigkeitsströme (Medium und Titrationsmittel) v_e [l/h] und dem konstanten Füllvolumen des Reaktors V_R [l]:

$$D = v_e/V_R \quad [1/h] \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Häufig wird auch die mittlere Verweilzeit τ eines infiniten Flüssigkeitselementes im Reaktorvolumen zur Kennzeichnung eines Prozesses verwendet:

$$\tau = V_R/v_e = 1/D \quad [h] \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Eine Bilanz der Biomasse ergibt:

$$dX/dt = \mu \cdot X - D \cdot X \quad [gTS/l/h] \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Für den stationären Fall ($dX/dt = 0$) folgt:

$$\mu = D \quad [1/h] \quad (\text{Gl. 2.14})$$

Es stellt sich also eine Mikroorganismenkonzentration und damit korrespondierend eine limitierende Substratkonzentration ein, bei der die Wachstumsrate genau der Durchflußrate entspricht.

Eine Bilanz des Substrates ergibt mit der zeitlich in den Reaktor einlaufenden ($D \cdot S_0$) und auslaufenden, unverbrauchten Substratmenge ($D \cdot S$) und dem Substratverbrauch durch Wachstum der Mikroorganismen ($\mu \cdot X/Y_{X/S}$) für den stationären Fall ($dS/dt = 0$):

$$D \cdot S_0 = D \cdot S + \mu \cdot X/Y_{X/S} \quad [g/l/h] \quad (\text{Gl. 2.15})$$

mit S_0 = Substratkonzentration im frischen Nährmedium [g/l]

$Y_{X/S}$ = Ausbeutekoeffizient [gTS/g]

Der Erhaltungsstoffwechsel sei hier vernachlässigt. Die Abhängigkeiten der stationären Substrat- S_{stat} und Biomassekonzentration X_{stat} ergeben sich durch Einsetzen von (Gl. 2.14) in (Gl. 2.10):

$$S_{stat} = K_S \cdot D / (\mu_{max} - D) \quad [g/l] \quad (\text{Gl. 2.16})$$

bzw. (Gl. 2.14) in (Gl. 2.15):

$$X_{stat} = Y_{X/S} \cdot (S_0 - D \cdot K_S / (\mu_{max} - D)) \quad [gTS/l] \quad (\text{Gl. 2.17})$$

Die modellmäßige Beschreibung der Produktbildung ist abhängig vom jeweiligen mikrobiologischen System. Man unterscheidet zwischen wachstumsgekoppelter und -entkoppelter Produktbildung. Es gilt:

$$dL_e/dt = \alpha \cdot dX/dt \quad [g/l/h] \quad (\text{Gl. 2.18})$$

bzw.

$$dL_e/dt = p \cdot X \quad [g/l/h] \quad (\text{Gl. 2.19})$$

mit L_e = Produktkonzentration [g/l]
 α = Produktbildungskonstante [g/gTS]
 p = Spezifische Produktbildungsrate [g/gTS/h]

Abb. 2.4 zeigt eine Auftragung von X_{stat} und S_{stat} über D . Bei niedrigen Durchflußraten ist eine geringe Abhängigkeit von X_{stat} und S_{stat} von D zu erkennen. Bei Annäherung der Durchflußrate an D_{krit} , die sich durch die maximale Wachstumsrate μ_{max} ergibt, fällt X_{stat} bis auf null ab ("wash-out") und S_{stat} steigt entsprechend auf S_0 , der Substratkonzentration im zulaufenden Medium an.

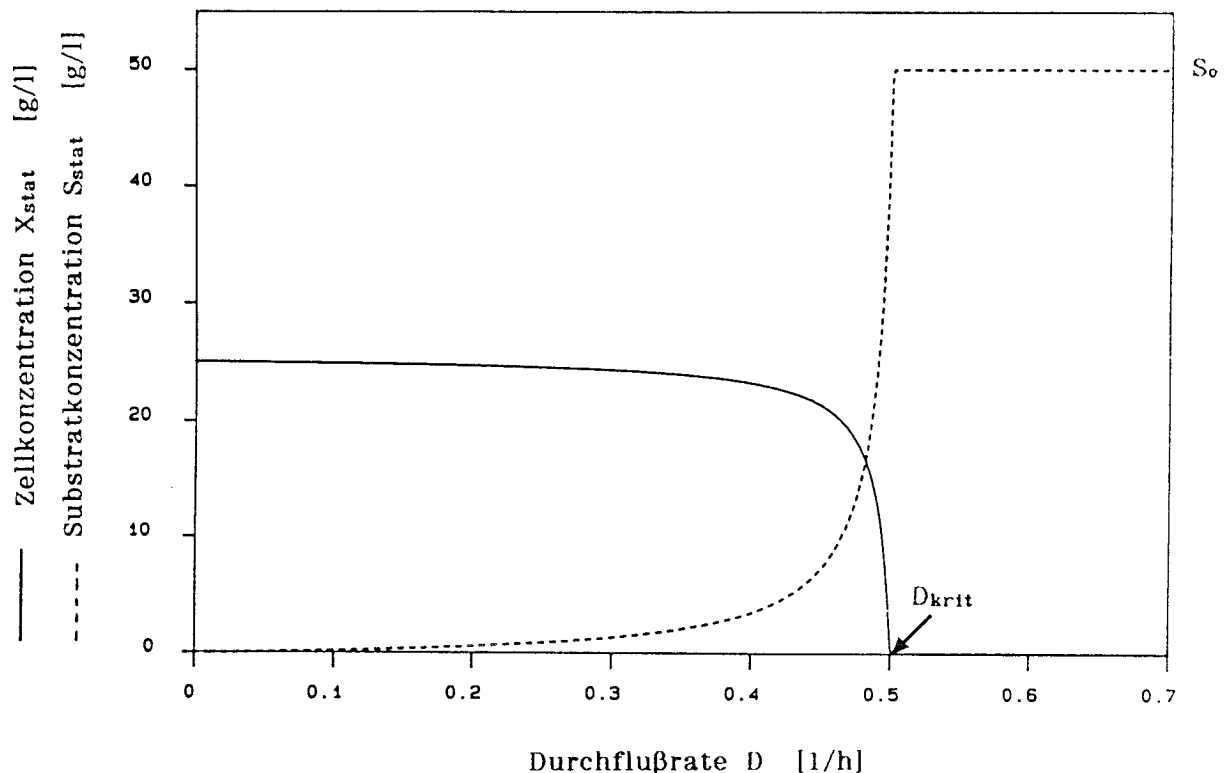


Abb. 2.4: Auftragung der stationären Betriebspunkte einer kontinuierlichen Kultur im X-D Diagramm

Parameter: $\mu_{max} = 0.5/h$; $S_0 = 50$ g/l; $K_s = 1$ g/l; $Y_{x/s} = 0.5$ gTS/g

2.2.3. Betriebsführung eines kontinuierlichen Bioreaktors

Es wird unterschieden zwischen chemostatischer und turbidostatischer Betriebsführung. Bei der chemostatischen Betriebsführung wird der Volumenstrom des zugeführten Mediums und damit die Durchflußrate konstant gehalten. Ist die Affinität der Mikroorganismen für das limitierende Substrat sehr groß, d.h. der Wert von K_s sehr klein, so erfolgt der Abfall von X_{stat} in der Nähe von D_{krit} sehr abrupt. Bei chemostatischer Prozeßführung ist die Kultur daher in diesem Bereich sehr instabil. Bei geringen Schwankungen der Zulauftrate kann die Kultur ausgewaschen werden. Man geht dann, wenn es technisch möglich ist, zu einer

sog. turbidostatischen Betriebsweise über. Die Biomassekonzentration im Reaktor wird über eine on-line Trübungsmessung der Fermentationsflüssigkeit ermittelt und durch Nachstellen der Durchflußrate konstant gehalten. Mit einer derartigen Regelung läßt sich jeder Punkt auf dem stark abfallenden Teil der Biomassekurve einstellen und damit die Kultur dauerhaft im unlimitierten Zustand halten. Die Mikroorganismen vermehren sich stationär mit maximaler Wachstumsrate μ_{max} . Die Regelung fördert gerade so viel Substrat nach, wie die Mikroorganismen verarbeiten können.

Bei hohen Biomassekonzentrationen (im limitierten Bereich) und flachem Verlauf von X_{stat} neigt die turbidostatische Regelung zur Instabilität und ist schließlich bei niedrigen Durchflußraten, wo X_{stat} auf hohem Niveau waagrecht verläuft, nicht mehr einsetzbar. Dann arbeitet man vorteilhafter mit einer chemostatischen Regelung.

2.3. Grundlagen der Oberflächenbehandlung von Glas (Silanchemie)

Die kovalente Modifizierung von Glasoberflächen durch Silane wird großindustriell z.B. bei der Herstellung von Windschutzscheiben (Holzer, 1986) oder Glasfaser-verstärkter Kunststoffe angewendet. Die Silane dienen zur Haftvermittlung zwischen der anorganischen Glasunterlage und der organischen Kunststoffmatrix. Die Oberflächenmodifizierung von porösem Glas (CPG) zur Immobilisierung von Enzymen wurde vor allem von der Gruppe um Weetall entwickelt (Weetall und Filbert, 1974; Weetall, 1976; Lynn, 1975).

Bei Silanen handelt es sich gemäß der unten dargestellten allgemeinen Strukturformel um organofunktionelle Siliziumverbindungen. Sie besitzen an einem Ende ein bis drei hydrolysierbare Abgangsgruppen, meist Chlor- oder Alkoxygruppen, und am anderen Ende einen funktionellen Rest. Letzterer ist über einen "spacer" mit dem zentralen Siliziumatom verbunden.



X: Abgangsgruppe (Alkoxy- oder Halogengruppe)

n: Anzahl der Abgangsgruppen (1,2,3)

Y: meist Methylgruppe

Z: "spacer"

R: Funktioneller Rest

Der Reaktionsmechanismus mit der Glasoberfläche ist in Abb. 2.5 am Beispiel eines *gamma*-Aminopropyltriethoxysilan dargestellt. Zur Hydrolyse des Silans ist Wasser erforderlich, welches meist als Lösungsmittel eingesetzt wird. Bei der Oberflächenmodifizierung in organischen Lösungsmitteln werden die Silane durch den Wasserfilm hydrolysiert, der stets auf nicht speziell behandelten Glasoberflächen adsorbiert vorliegt. Silane können auch aufgedampft werden (Radke, 1987).

Hydrolysierte Silanmoleküle reagieren nur mit freien Silanolgruppen auf dem Glasmaterial. Dieses wird zweckmäßigerweise mit Säure vorbehandelt, um aus der

Oberfläche Metallionen (Ca, Na, usw.) herauszulösen. Bei der Reaktion der Silane mit der anorganischen Oberfläche kommt es durch Kondensation der jeweiligen Silanolgruppen zur Ausbildung von kovalenten (Si-O-Si)-Bindungen. Erforderlich für einen optimalen Verbund ist die Trocknung nach der Silanbehandlung. Bei Wasserzutritt und hohen Temperaturen können kondensierte Siloxangruppen wieder hydrolysieren.

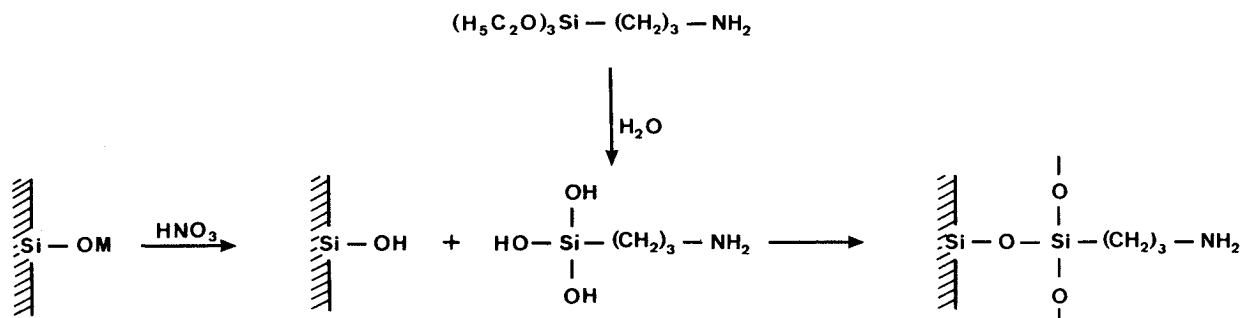


Abb. 2.5: Reaktionsmechanismus von *gamma*-Aminopropyltriethoxysilan mit einer durch Salpetersäure aktivierten Glasoberfläche

Es ist möglich, daß die Silanmoleküle in wässriger Lösung auch miteinander reagieren und dabei polymerisieren. Aminosilanlösungen sind in der Regel recht stabil, wenn sie auf einen pH von 5 eingestellt werden (Guilleth, 1986). Unbehandelte Glasoberflächen besitzen in der Regel einen deutlich alkalischen, Säure-behandelte einen sauren pH-Wert. Daher sind die Silanolgruppen auf der Glasoberfläche weit reaktiver als in freier Lösung (pH 5). Die gewünschte Reaktion ist kinetisch begünstigt.

Nach neueren Untersuchungen erwiesen sich herkömmliche Silane mit drei Abgangsgruppen als ungünstig. Aus sterischen Gründen kann es auf der Oberfläche des Glases zu keiner vollständigen Kondensation aller drei Silanolgruppen kommen. Vielmehr wurde gezeigt, daß bei bi- als auch trifunktionellen Silanen statistisch nur 1 - 2 Gruppen Siloxanbindungen ausbilden (Unger et al., 1976). Mit neu entwickelten Silanen läßt sich die Glasoberfläche durch organische Gruppen vollständig vor Wasserzutritt schützen (Szabo et al., 1984).

Die an Glasoberflächen durch Silane aufgetragenen funktionellen Gruppen können für weitere Kopplungsreaktionen genutzt werden.

2.4. GRUNDLAGEN MIKROBIELLER ADHÄSIONSPHÄNOMENE

Mikrobielle Adhäsionsphänomene, d.h. die Flockulation von Mikroorganismen (Adhäsion untereinander) und deren Adsorption an Trägeroberflächen, werden erst seit wenigen Jahren genauer untersucht. Die Systematisierung und Quantifizierung dieser Effekte befindet sich noch in der Entwicklung.

Man muß unterscheiden zwischen:

- 1) Rein physikochemischen Effekten (Anlagerung nach dem ersten Kontakt)
- 2) Effekten, die durch die physiologischen Aktivitäten der Mikroorganismen, wie z.B. Ausscheidung von haftungsvermittelnden Substanzen, Anpassung der Zellgeometrie an die Form der besiedelten Oberfläche usw., zustande kommen.

Die biologische Reaktion der Zellen, vereinfachend als "Aufwachsen" bezeichnet, ist die Folge eines vorangegangenen physikochemischen Adhäsionsvorganges.

Die physikalische Chemie hält zwei Theorien für die Beschreibung von Wechselwirkungen zwischen Oberflächen bereit: Die sog. DLVO-Theorie berücksichtigt die weitreichenden (~10-100 nm) elektrostatischen und van der Waals Kräfte, während der thermodynamische Ansatz auf der Bestimmung der auf sehr kurzen Entfernungen von < 1 nm (Abbott et al., 1983) wirkenden Gibbs'schen freien Bindungsenergie beruht (Rutter und Vincent, 1984). Da bisher noch keine Vereinheitlichung der beiden Theorien gelungen ist, werden sie im allgemeinen nebeneinander benutzt (Rouxhet et al., 1987).

Für die praktische, meßtechnische Bewertung von Flockulations- und Adsorptionsphänomenen werden heute die elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen als maßgebend angesehen (Mozes et al., 1987; van Loosdrecht et al., 1987b). Die Eigenschaften der beteiligten Oberflächen (Träger und Zellen) und die des umgebenden Mediums bestimmen, ob es zu Anziehungs- bzw. Abstoßungsreaktionen kommt.

2.4.1. Elektrostatische Wechselwirkungen

Tragen zwei Körper auf ihren Oberflächen elektrische Ladungen entgegengesetzten Vorzeichens, ziehen sie sich an, während gleichgeladene Körper sich abstoßen (s. Abb. 2.6a₁). Die Ladungsdichte beeinflusst die Stärke der zwischen den Körpern auftretenden Kräfte. Im umgebenden Medium gelöste Ionen (> 1 mM) können sich je nach Vorzeichen an die geladenen Oberflächen anlagern (Rutter und Vincent, 1984). Dadurch wird die nach außen wirkende Gesamtladung der Körper zu einem gewissen Teil abgeschirmt und damit verringert (s. Abb. 2.6a₂). Ein pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes von biologischen Körpern (z.B. Mikroorganismen: $pK_i = 2.5 - 4$) führt ebenfalls zu einer Reduktion der Gesamtladung. Dadurch geraten die Körper näher aneinander und können schließlich durch auf kurzen Entfernungen wirkende Kräfte, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen oder Polymere (s.u.) trotz noch bestehender entgegengesetzter Gesamtladung zur Haftung gelangen.

Wechselwirkungen oder Polymere (s.u.) trotz noch bestehender entgegengesetzter Gesamtladung zur Haftung gelangen.

Zur Beurteilung der Oberflächenladungen von Mikroorganismen wird die elektrophoretische Mobilität der in destilliertem Wasser suspendierten Zellen bei verschiedenen pH-Werten bestimmt.

Mikroorganismen als auch die meisten natürlichen und synthetischen Materialien (Glas, Keramik, Kunststoffe, usw.) tragen eine negative Gesamtladung (Rutter, 1980; van Loosdrecht, 1987b).

2.4.2. Hydrophobe Wechselwirkungen

Die Hydrophobizität von Körpern ist anschaulich gekennzeichnet durch ihre Benetzbarkeit bzw. thermodynamisch charakterisiert durch ihre freie Oberflächenenergie. Diese ist definiert als diejenige Energie, die nötig ist, um eine neue Flächeneinheit der Oberfläche zu erzeugen. Diese Energie ist bei Flüssigkeiten direkt korreliert mit ihrer Oberflächenspannung.

Wässrige Medien haben durch die starken Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen eine hohe Oberflächenenergie, während organische Lösungsmittel eine niedrige besitzen.

Bei Feststoffen ist die freie Oberflächenenergie meßtechnisch nicht ohne weiteres zugänglich. Sie wird indirekt aus Kontaktwinkelmessungen von Flüssigkeiten auf polierten Flächen abgeleitet. Materialien wie Glas oder Metalle besitzen gewöhnlich eine hohe Oberflächenenergie (sie sind hydrophil), organische Polymere eine niedrige (sie sind hydrophob).

Das Verhältnis der Oberflächenenergien von eingetauchten festen Körpern einerseits und des umgebenden flüssigen Mediums andererseits ist maßgebend für das Zustandekommen von Adhäsionsphänomenen. Ein System ist immer bestrebt, seine freie Gesamtenergie so weit wie möglich zu erniedrigen, bzw. seine Oberfläche zu verringern. Besitzen daher das flüssige Medium und die in ihr eingetauchten Körper unterschiedliche Oberflächenspannungen (unabhängig davon welcher Wert der größere ist), so entstehen anziehende Kräfte zwischen den Körpern und sie lagern sich aneinander (s. Abb. 2.6b). Bei gleich großen Oberflächenspannungen bleibt das System (z.B. eine Suspension kolloider Partikel) stabil. Das gleiche gilt sinngemäß, wenn Systeme mit verschiedenartigen festen Oberflächen vorliegen (wie z.B. Mikroorganismen und Trägerkörper).

Mikrobielle Prozesse laufen in wässriger, d.h. hydrophiler Umgebung ab. Körper mit einer hydrophoben Oberfläche versuchen daher das flüssige Medium zwischen ihnen zu entfernen und sich aneinanderzulagern. Man spricht aus diesem Grund in wässrigem Medium von hydrophoben Wechselwirkungen.

Zur Beurteilung der Hydrophobizität von Mikroorganismen werden vielfach die Kontaktwinkel von Flüssigkeiten auf getrockneten, flachen Zelniederschlägen gemessen (Busscher et al., 1984; Kjelleberg, 1984). Die gewonnenen Werte sollten direkt angegeben werden und ausschließlich zu Vergleichszwecken untereinander

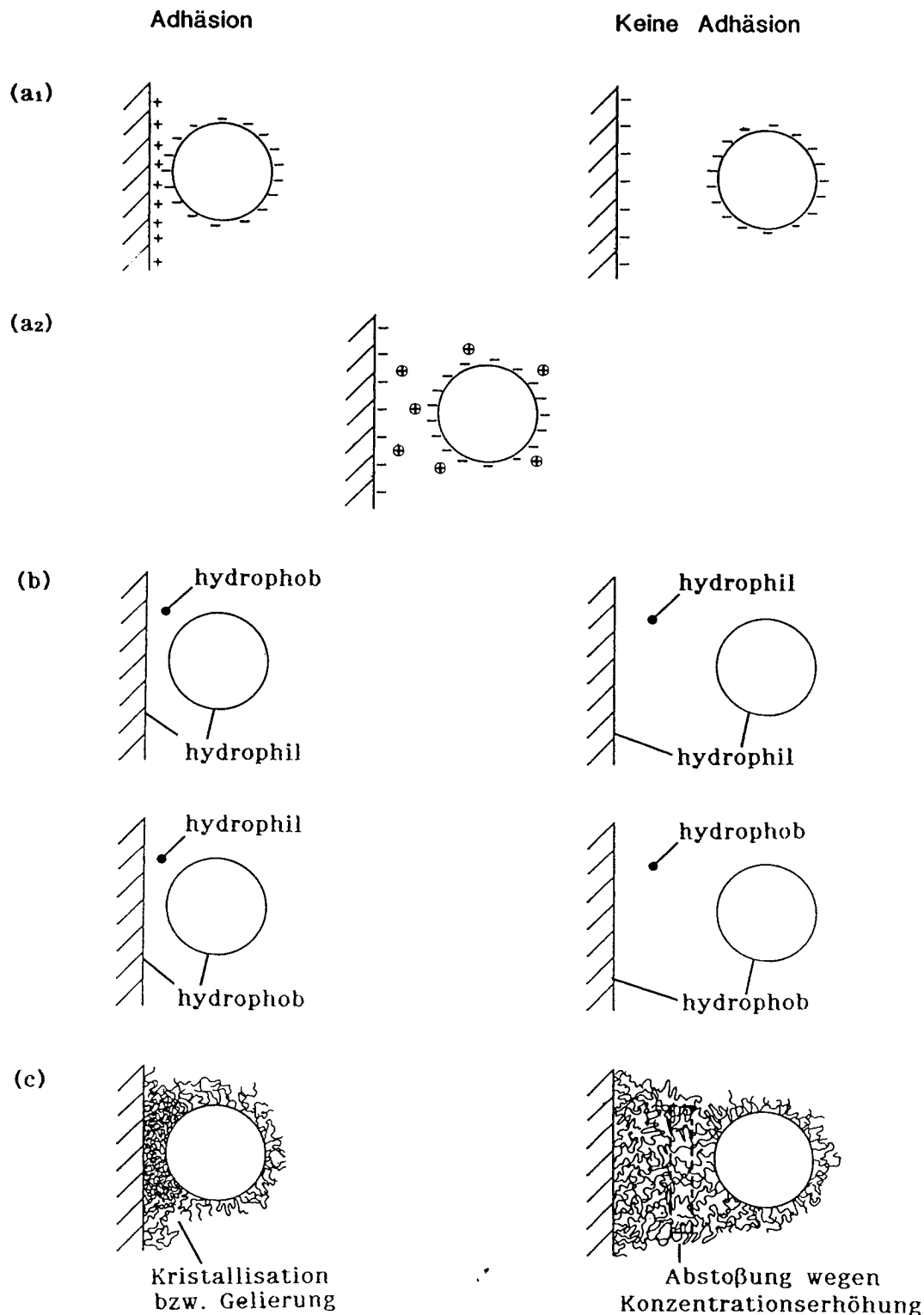


Abb. 2.6: Anziehende und abstoßende Wechselwirkungen zwischen in Flüssigkeit eingetauchten Körpern

(a₁): Elektrostatische Wechselwirkungen ohne Anwesenheit gelöster Ionen; (a₂): Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Oberflächen bei Anwesenheit gelöster Kationen; (b): Hydrophobe Wechselwirkungen; (c): Polymersegment-Lösungsmittel-Wechselwirkungen (nach Rutter, 1980)

dienen (van Loosdrecht et al., 1987a; Mozes und Rouxhet, 1987). Die Umrechnung der gemessenen Kontaktwinkel in Oberflächenenergie ist mit vielen Fehlern behaftet (Schubert, 1968) und sollte vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Hydrophobizität von Mikroorganismen stellt die hydrophobe Chromatographie dar (Mozes und Rouxhet, 1987). Dabei wird die Retention der in verschiedenen Medien bei unterschiedlichem pH suspendierten Zellen in einem Bett aus hydrophoben Füllkörpern bestimmt. Mit dieser Methode werden auch elektrostatische Wechselwirkungen erfaßt und daher die realistischen Bedingungen bei praktischen Adhäsionsvorgängen berücksichtigt.

2.4.3. Adhäsion in Gegenwart von makromolekularen Substanzen

Die Adhäsionseigenschaften von kolloiden Partikeln können durch Polymere entscheidend verändert werden. Deren Molekülketten sind im allgemeinen aus bis zu 10^5 sich wiederholenden Segmenten aufgebaut und können im Prinzip diese Anzahl von Bindungen mit einer festen Oberfläche eingehen (Robb, 1984). Daher lösen sich einmal adsorbierte Polymerfäden, auch wenn die Einzelbindungskräfte nur sehr schwach sind, kaum wieder von der Unterlage ab. Es müßten alle Bindungsstellen zur gleichen Zeit gelöst werden, ohne daß sich neue bilden, was sehr unwahrscheinlich ist.

Zwischen Körpern, die mit Makromolekülen überzogenen sind, kann es zusätzlich zu den bereits beschriebenen (elektrostatischen und hydrophoben) Mechanismen zu weiteren anziehenden bzw. abstoßenden sog. Polymersegment-Lösungsmittel-Wechselwirkungen kommen (Rutter, 1980). In einem Fall wird davon ausgegangen, daß bei Annäherung der Körper die Konzentration der polymeren Substanzen in der Berührungszone die Löslichkeitsgrenze überschreitet, die Polymere auskristallisieren und sich die Körper dadurch aneinanderheften (s. Abb. 2.6c). Im anderen Fall wird ein im flüssigen Medium gut lösliches Polymer vorausgesetzt. Das Lösungsmittel versucht daher die bei Annäherung der Körper in der Berührungszone entstehende hohe Polymerkonzentration zu verdünnen und hält so die Körper auseinander.

Natürlich vorkommende Polymere besitzen gewöhnlich Molekulargewichte von nicht größer als etwa 10^6 , da längere Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Scherkräfte zerteilt werden (Robb, 1984). Die Abmessungen einer solchen gelösten makromolekularen Substanz sind abhängig von der Art und Eigenschaft des Lösungsmittels. So liegt in reinem Wasser ein Polymerfaden mit regelmäßig folgenden, ionisierten Gruppen in gestreckter Form vor, da es zwischen den gleichen Ladungen innerhalb des Moleküls zu Abstoßungsreaktionen kommt (Atkinson und Daoud, 1971). Bei steigender Ionenstärke hingegen werden die Ladungen zunehmend abgeschirmt und das Molekül kann sich falten und verknäulen. Dennoch besitzen Polyelektrolyte mit einem Molekulargewicht von etwa $5 \cdot 10^5$ in Elektrolytlösungen von < 0.1 M noch Abmessungen von 15–100 nm (Robb, 1984). Damit übersteigen die Abmessungen der Polymere die Reichweite der abstoßenden elektrostatischen Kräfte (~ 10 nm, bei Ionenkonzentration 1 mM) bei gleich- (gewöhnlich negativ) geladenen Körpern. Die Polymere können daher diese

Adhäsionsbarriere überwinden und zu einer Bindung der Körper führen (s. Abb. 2.7). Man spricht von Polymer-Brückenbildung.

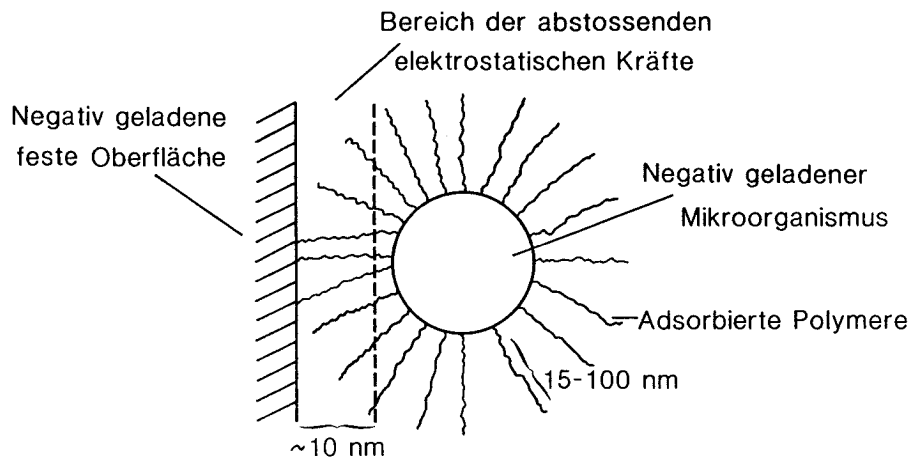


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Polymer-Brückenbildung

2.4.4. Weitere Bindungsmechanismen

Neben den bereits aufgeführten Mechanismen können biospezifische Wechselwirkungen (z.B. Antikörper-Antigen Reaktionen) zu Adhäsionsvorgängen von Mikroorganismen führen. Bekannt sind vor allem die sog. Lectine, welche spezifisch an bestimmte Kohlehydrate binden. Einige Mikroorganismen haben spezielle filamentöse Zellstrukturen, sog. Flagella, Pili, usw. entwickelt, die mehrere μm lang sein können und unter anderem der Fixierung auf festen Oberflächen unter ökologisch günstigen Bedingungen dienen (Rutter, 1980).

2.4.5. Polymer-induzierte Flockulation

Besonders anschaulich werden die Mechanismen an einem Beispiel (Dixon et al., 1967), der Flockulation von stark negativ geladenen Teilchen (aus Quarz) mit einem kationischen Polymer (Polyethylenimin).

In Abb. 2.8 ist die elektrophoretische Beweglichkeit als Maß für die Oberflächengesamtladung der Teilchen gegen die Konzentration des zugegebenen Flockulationsmittels aufgetragen. Die Kurve repräsentiert Experimente mit relativ hochmolekularen Polyethylenimininen (Mol. Gew. 1700 und 32000). Mit steigender Konzentration des kationischen Polymers sinkt die negative Gesamtladung (Teilchen + adsorbiertes Polymer), die abstossenden elektrostatischen Kräfte zwischen den Teilchen nehmen ab und es kommt zwischen ihnen zur Polymer-Brückenbildung. Die Flockulation setzt ein und erreicht bei einer elektrophoretischen Gesamtladung von null ihr Maximum. Bei höheren Konzentrationen wird die Oberfläche der Teilchen zunehmend mit Polymer gesättigt. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein an einem Teilchen bereits gebundener Polymerfaden auf einem anderen Teilchen noch eine freie Bindungsstelle findet

und Brücken bilden kann, nimmt ab. Die Gesamtladung der Teilchen kehrt sich ins Positive um und abstoßende elektrostatische Kräfte führen zur Redispersion der Teilchenaggregate (s. Abb. 2.8).

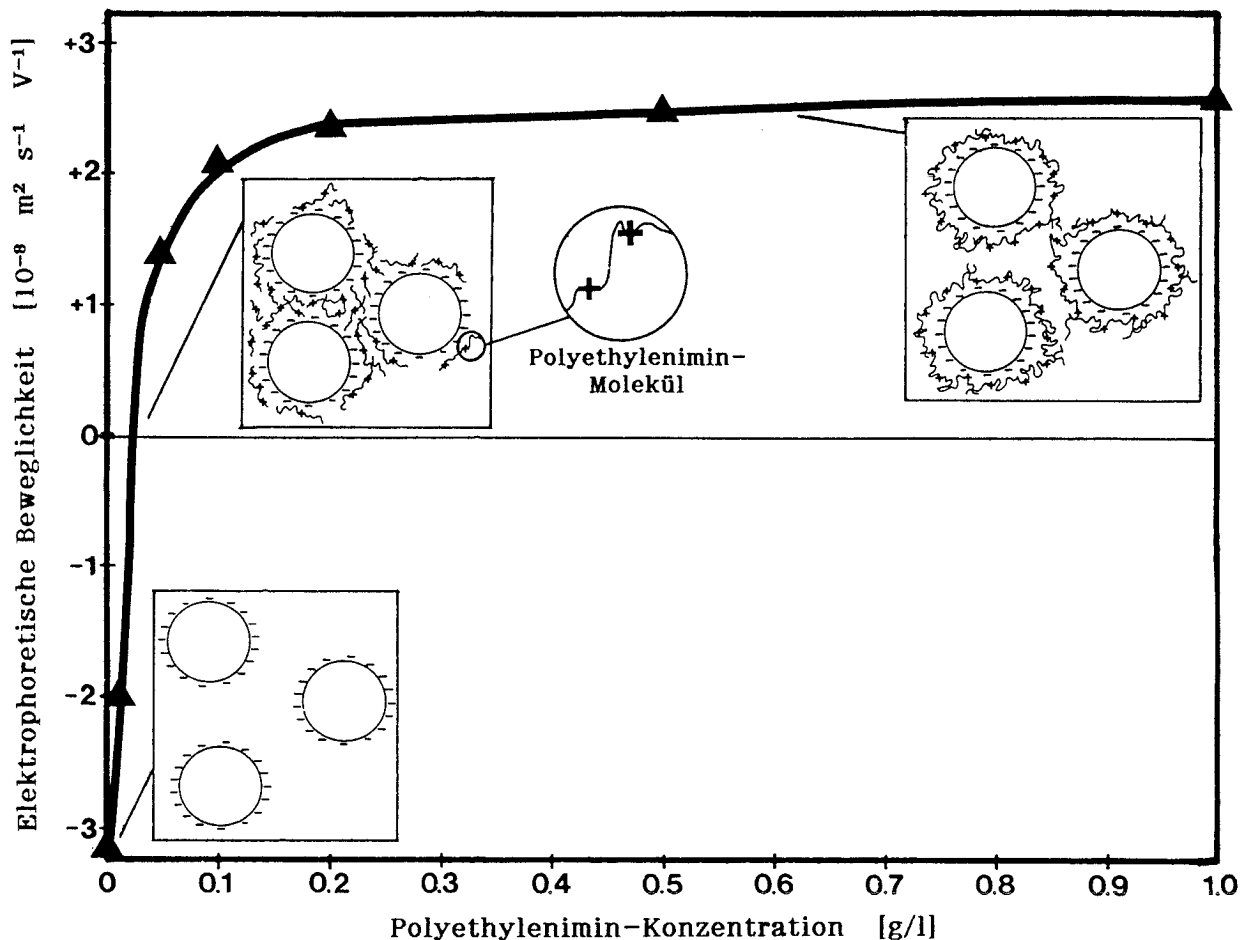


Abb. 2.8: Einfluß der Konzentration des Flockulationsmittels (Polyethylenimin) auf die Aggregation von kolloiden Partikeln aus Quarz (nach Dixon et al., 1967) Mol. Gew. 1700 - 32000; pH 4

Während zur Flockulation von negativ geladenen Teilchen kationische Polymere von relativ niedrigem Molekulargewicht ausreichend sind, müssen nichtionische Polymere mindestens ein Molekulargewicht von mehreren hunderttausend aufweisen, um vergleichbar wirksam zu sein (Harris und Mitchell, 1973).

Die bei leblosen Teilchen gefundenen Erkenntnisse lassen sich zum großen Teil auf Mikroorganismen übertragen. Typisch sind auch dort Flockulationskurven, die bei Zugabe von Flockulationsmittel durch ein Maximum laufen und danach wieder abfallen (Atkinson und Daoud, 1971).

3. MATERIAL & METHODEN

3.1. Organismen & Kulturbedingungen

3.1.1. Stammhaltung und Aufzucht

Stammkulturen werden auf Schrägagar 24 h bei 30°C inkubiert und anschließend bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Anzucht der Zellen (Vorkultur) geschieht in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen, die 100 ml Vollmedium enthalten. Die Inkubation erfolgt für etwa 15 h auf einer Schüttelmaschine (Pilot Shake TM, Braun, Melsungen) bei 100 U/min und einer Temperatur von 30°C. Die anschließenden Hauptkulturen werden 5 %ig mit der Vorkultur inokuliert. Die Zusammensetzung des Schrägagars und des Vollmediums ist in Tabelle 3.1 angegeben. Glucose wird getrennt autoklaviert.

Substanz	Schrägagar	Vollmedium
Bacto-Agar (Difco, Mich., USA)	20 g	–
Bacto-Pepton (Difco, Mich., USA)	10 g	10 g
Fleischextrakt (Roth, Karlsruhe)	10 g	–
Hefeextrakt (Merck AG, Darmstadt)	5 g	10 g
NaCl	3 g	2.5 g
Glucose·H ₂ O	–	20 g
MgSO ₄	–	0.25 g

aufgefüllt mit dest. Wasser auf 1000 ml, pH 7.2

Tabelle 3.1: Nährmedien für Stammhaltung und Aufzucht

3.1.2. Schüttelkolbenversuche

Die verwendeten Medien und Spurenelementelösungen sind in Tabelle 3.2 bzw. Tabelle 3.3 angegeben (Begründung für die verschiedenen Zusammensetzungen siehe Kap. 4.). Glucose, Ketosäure und die restlichen Substanzen werden getrennt autoklaviert und nach dem Erkalten vereinigt. Die Medien werden mit pH-Puffer, wie angegeben, supplementiert. Über die Auswahl der pH-Puffer siehe Anhang A.9. Alle Schüttelkolbenversuche werden in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit, wenn nicht anders angegeben, 40 ml Medium bei 30°C und 100 U/min durchgeführt.

Substanz	Medium			
	A	B	C	D
Glucose·H ₂ O	60 g	50 g	50 g	50 g
Na-α-Ketoisocaproat	20 g	20 g	20 g	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g	15 g	15 g	-
NH ₄ Cl	-	-	-	12.2 g
Harnstoff	-	5 g	5 g	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	1 g	-	1 g
KCl	-	-	0.75 g	-
Biotin	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg
Spurenelementelösung	A:10 ml	B:10 ml	B:10 ml	E:10 ml

aufgefüllt mit dest. Wasser auf 1000 ml, pH 7.4

Tabelle 3.2: Medien für die Schüttelkolbenversuche

Substanz	Spurenelementelösung				
	A	B	C	D	E
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25 g	25 g	6.2 g	25 g	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	-	-	20 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 g	4 g	0.13 g	4 g	4 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 g	1 g	0.1 g	1 g	-
FeCl ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	-	0.7 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.76 g	0.76 g	0.55 g	0.76 g	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	-	0.9 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	0.18 g	0.5 g	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	0.05 g	0.05 g	-
NaCl	-	-	1 g	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	0.17 g	-	-
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	-	-	0.018 g	-	-
H ₃ BO ₃	-	-	0.01 g	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	-	-	0.011 g	-	-
Na ₃ -Citrat·2H ₂ O	-	44.7 g	-	44.7 g	44.7 g
Titriplex III (EDTA)	-	6 g	-	6 g	6 g
Titriplex I (NTA)	-	-	0.5 g	-	-

aufgefüllt mit dest. Wasser auf 1000 ml, pH 7.0

Tabelle 3.3: Spurenelementelösungen

Diese Lösungen werden in den Medienansätzen 1:100 verdünnt

3.1.3. Vergleichsversuche

Die Wirksamkeit der Oberflächenbehandlungen der Sintergläser wird in Parallelversuchen verglichen. Fünf bzw. sechs verschiedene Sintergläser werden der gleichen Zellsuspension ausgesetzt, geschüttelt, gewaschen und dann in baugleiche Festbettreaktoren gefüllt. Nach Zugabe von Produktionsmedium wird die Leucinbildung, d.h. die Aktivität des Trägermaterials, verfolgt.

Je 50 g der verschieden oberflächenmodifizierten Sintergläser (Raschigringe ϕ 7.7 mm) zur Adsorption von Mikroorganismen werden in 200 ml Weithalskolben mit Wattestopfen 20 min bei 120°C autoklaviert und im Vakuumtrockenschrank (VT 5042 EK, Heraeus, Hanau) getrocknet. Die Gläser zur kovalenten Bindung der Mikroorganismen werden vor der Aktivierung sterilisiert. Die Durchführung aller weiteren Versuchsschritte erfolgt unter der Cleanbench.

Substanz	Aufzuchtmedium	Produktionsmedium		
		P1	P2	P3
Glucose·H ₂ O	50 g	50 g	40 g	40 g
Ketosäure	20 g	20 g	16 g	16 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g	15 g	10 g	6 g
Harnstoff	5 g	5 g	2.5g	1.8 g
KH ₂ PO ₄	0.68 g	-	-	-
KCl	0.74 g	0.74 g	0.74	0.55 g
Biotin	400 µg	400 µg	400 µg	400 µg
Polypropylenglykol 1200	1 g	1 g	1 g	0.5 g
HEPES-Puffer	-	47.7 g	42.9 g	23.8 g
Spurenelementelösung	B,D:10 ml	B:10 ml	D:5 ml	D:5 ml
pH-Wert	7.4	8.0	8.0	8.0

aufgefüllt mit dest. Wasser auf 1000 ml

Tabelle 3.4: Medien für die Vergleichsversuche

Ein 5 l-Rührkesselfermenter mit pH- und pO₂-Regelung und einem Inhalt von 2 bis 3 l Aufzuchtmedium (s. Tab. 3.4) wird 5 %ig aus einer Vollmediumkultur angeimpft. Wenn die Kultur gut durchgewachsen ist (20 - 26 h), wird die Biomasse in 500 ml-Zentrifugenbechern abgetrennt (Beckmann J-21C, Rotor JA10, 8000U/min, 10 min) und zweimal mit steriler 150 mM NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird eine konzentrierte Zellsuspension in 150 mM NaCl-Lösung hergestellt (pH~6). Davon werden je 85 ml auf die Sintergläser gegeben, im Vakuumtrockenschrank entgast und dann 2 h in einer Schüttelmaschine (Lab Shaker, Braun, Melsungen) mit 140 U/min bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend werden die Gläser steril abgenutzt und viermal gründlich mit 100 ml Portionen 150 mM NaCl-Lösung gewaschen. Die Durchführung dieser Versuchsschritte erfolgt unter der Cleanbench. Nun füllt man die Sintergläser mit je 100 ml Produktionsmedium (s. Tab. 3.4) in die auf 30°C thermostatisierten

Testreaktoren (s. Kap. 3.4.1.) und begast mit 0.7 vvm Sauerstoff. In zeitlichen Abständen werden Proben entnommen. Wenn über 80 mM Leucin gebildet worden ist, wird das Medium abgelassen. Man spült die Testreaktoren dreimal mit je 100 ml Portionen NaCl-Lösung und füllt sie für einen neuen Meßzyklus mit frischem Produktionsmedium.

3.1.4. Medien für die kontinuierlichen Fermentationen

Die Medien für die kontinuierlichen Fermentationsversuche im Rührkessel, Festbett- bzw. Wirbelschichtreaktor sind in Tabelle 3.5 angegeben. Glucose, Ketosäure und die restlichen Substanzen werden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt. Thiamindichlorid bzw. NH_4 -Acetat wird durch ein Millex-GV Mikrofilter mit 0.2 μm Porengröße (Millipore, Neu Isenburg) steriltfiltriert. Der beim Autoklavieren auftretende Volumenverlust der Medien wird mit sterilem dest. Wasser ausgeglichen (Eichmarke).

Substanz	Alt	Medium			
		Normal	P-lim	Acetat	S-lim
Glucose-H ₂ O	60 g	60 g	60 g	45 g	60 g
Na- α -Ketoisocaproat	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g	25 g	25 g	15 g	-
NH ₄ Cl	-	-	-	-	20 g
Harnstoff	-	2 g	2 g	-	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g	1 g	0.4 g	1 g	2.7 g
KCl	-	-	0.6 g	-	-
Biotin	400 μg	400 μg	400 μg	400 μg	400 μg
Thiamindichlorid	-	(2 mg)	2 mg	2 mg	2 mg
NH ₄ -Acetat	-	-	-	11.6 g	-
PPG 1200	1 g	-	-	-	-
Spurenelementelösung	A:10 ml	B,D:10 ml	D:10 ml	D:10 ml	D:10 ml

aufgefüllt mit dest. Wasser auf 1000 ml, pH 7.2

Tabelle 3.5: Medien für die kontinuierlichen Fermentationsversuche

Alt: Medium entsprechend Gröger (1986); Normal: Medium für Turbidostat; P-lim: Medium für chemostatisch Phosphor-limitierten Betrieb; Acetat: Acetatmedium; S-lim: Medium für chemostatisch Schwefel-limitierten Betrieb

3.2. Analysenmethoden

Aus den Kulturgefäßen (Schüttelkolben oder Bioreaktoren) wird etwa 1 ml Probeflüssigkeit entnommen, anschließend der pH und die optische Dichte bestimmt und bei Bedarf ein Glucoseschnelltest (s.u.) gemacht. Durch Zentrifugieren bei 13000 U/min, 10 min (Biofuge A, Heraeus-Christ GmbH, Osterode) wird die klare Probeflüssigkeit von der Biomasse abgetrennt und entweder sofort oder nach Einfrieren (bei -18°C) für weitere Analysen benutzt.

3.2.1. Bestimmung der Biomassekonzentration

3.2.1.1. Photometrische Bestimmung

Etwa 200 μl der unverdünnten Zellsuspensionen werden in 0,02 cm - Küvetten gefüllt und die Extinktion bei 600 nm gegen Wasser gemessen (Spectrophotometer 554, Perkin Elmer, Überlingen). Die gemessenen Werte müssen, da optische Dichten (OD) auf Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bezogen werden, mit 50 multipliziert werden.

Die optische Dichte ist nur ein indirektes Maß für die Biomassekonzentration. Diese erhält man als g Trockensubstanz/l (gTS/l) aus der in Abb. 3.1 dargestellten Eichkurve.

3.2.1.2. Trockengewicht-Bestimmung

Etwa 400 ml Zellsuspension werden jeweils zwei Mal in einer Beckman Zentrifuge J-21C (Palo Alto, USA), Rotor JA 10, 8000 U/min, 10 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in dest. Wasser resuspendiert. Man zentrifugiert anschließend definierte Volumina dieser gewaschenen Zellsuspension in vorgewogenen Zentrifugenröhrchen ab (Beckman J-21C, Rotor JA 20, 18000 U/min, 15 min). Der klare Überstand wird vorsichtig abgesaugt und die Röhrchen in einem Vakuum-Trockenschrank VT 5042 EK der Firma Heraeus (Hanau) bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der Gewichts Differenz (Röhrchen mit getrockneten Zellen - leeres Röhrchen) läßt sich das Trockengewicht der Biomasse (g TS/l) berechnen.

3.2.1.3. Gesamtkeimzahl-Bestimmung mittels Thomakammer

Eine geeignet vorverdünnte Zellsuspension wird von der Seite in die Zählkammer, auf der bereits das Deckglas liegt, eingebracht. Dann werden unter dem Mikroskop bei 480-facher Vergrößerung möglichst alle Kleinquadrate (16 pro Großquadrat) ausgezählt und eine mittlere Keimzahl je Großquadrat errechnet. Die Zellen, die sich auf der oberen und rechten Begrenzungslinie eines Quadrates befinden, werden mitgezählt, diejenigen auf der unteren und linken Begrenzungslinie dem Nachbarquadrat zugeordnet. Aus der Fläche eines Großquadrates einer Thomakammer von 0.04 mm^2 und dem Abstand zwischen Grundfläche und Deckglas von 0.1 mm errechnet sich ein Volumen von $4 \cdot 10^{-6}\text{ ml}$. Die für ein Großquadrat ermittelte Keimzahl muß also mit $2.5 \cdot 10^5$ multipliziert

werden, um die Gesamtkeimzahl pro ml zu erhalten. Die Zählung wird drei Mal mit neu gefüllter Kammer wiederholt. Es ergab sich folgende Umrechnungsgleichung zwischen Keimzahl und Trockengewicht:

$$1\text{g Biotrockensubstanz} = 1.77 \cdot 10^{12} \text{ Keime} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

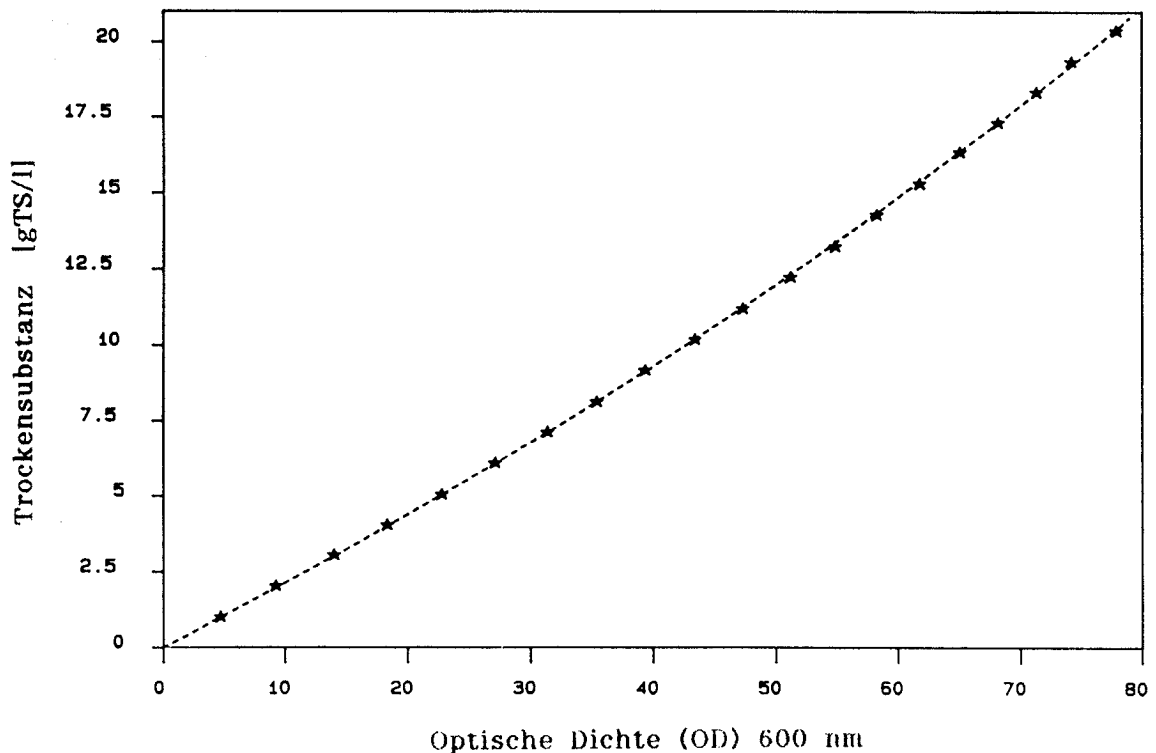


Abb. 3.1: Eichkurve zur Bestimmung der Biotrockenmasse [gTS/l] aus der Optischen Dichte (OD)

3.2.2. Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen

Leucin und andere Aminosäuren sowie Ammoniak werden mit dem Aminosäureanalysator LC 5001 (Biotronic, Maintal) bestimmt. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt auf einem Integrator Chromatopac C-R2AX (Shimadzu Co., Kyoto, Japan).

Nachweis-Prinzip:

Die Aminosäuren werden aufgrund der unterschiedlichen Dissoziationskonstanten ihrer Aminogruppen an einem Kationenaustauscherharz getrennt und anschließend mit Ninhydrin zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen Konzentration sich photometrisch bei 570 nm messen lässt.

Analysenbedingungen:

Methode:	Einsäulenanalyse
Probenvolumen:	50 µl
Coil-Temperatur:	125°C
Photometereinstellung 570nm:	0-2 Extinktionseinheiten
440nm:	0-2 Extinktionseinheiten

Alle weiteren Analysenbedingungen sowie die Zusammensetzung der Pufferlösungen sind auf den Programmdatenblättern im Anhang A.1 angegeben. Für Methionin, Norvalin, Leucin und Isoleucin kommt ein Kurzprogramm zur Anwendung (s. Programm 5, Anhang A.1).

Nachweisreagenz:

20g Ninhydrin gelöst in 750ml Ethylenglycolmonoethylether, 250 ml 4 M Na-Acetat pH 5.51 und 7.5 ml 15% Titan(III)-Chlorid-Lösung

Probenvorbereitung:

Die zu analysierenden Proben werden zunächst in 4 mM Norvalinlösung und anschließend in Probenverdünnungspuffer (s. Anhang A.1) jeweils 1:20 verdünnt. Norvalin, eine nicht natürliche Aminosäure, erscheint mit günstiger Retentionszeit auf den Chromatogrammen und wird als interner Standard genutzt. Eine Eichlösung mit 100 mM Leucin wird in gleicher Weise verdünnt wie die zu analysierenden Proben, um mögliche systematische Verdünnungsfehler zu kompensieren.

Ungefähre Retentionszeiten im Kurzprogramm 5:

Norvalin:	19.7 min
Isoleucin:	21.7 min
Methionin:	22.2 min
Leucin:	22.6 min

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt unter Berücksichtigung des internen Standards (Norvalin) aus den Peak-Flächen nach folgender Gleichung:

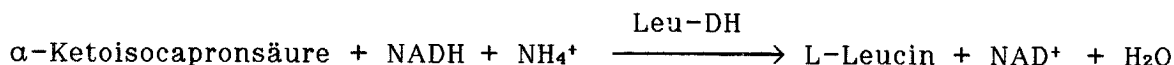
$$C_{(Pr)} = C_{(st)} \cdot \frac{A_{(Nor.St)}}{A_{(Leu.St)}} \cdot \frac{A_{(Leu.Pr)}}{A_{(Nor.Pr)}} \quad (Gl. 3.2)$$

mit $C_{(Pr)}$	=	Leucinkonzentration der Probe [mM]
$C_{(st)}$	=	Leucinkonzentration des Standards [100mM]
$A_{(Nor.St)}$	=	Fläche des Norvalin-Peaks des Standards [-]
$A_{(Leu.St)}$	=	Fläche des Leucin-Peaks des Standards [-]
$A_{(Leu.Pr)}$	=	Fläche des Leucin-Peaks der Probe [-]
$A_{(Nor.Pr)}$	=	Fläche des Norvalin-Peaks der Probe [-]

3.2.3. Bestimmung der α -Ketoisocapron-säurekonzentration

3.2.3.1. Enzymatische Bestimmung (Groeger, 1986)

α -Ketoisocapronsäure kann enzymatisch unter Katalyse von Leucin-Dehydrogenase (Leu-DH) zu Leucin reduktiv aminiert werden. Dies geschieht unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD⁺. Die Abnahme an NADH, die proportional zur umgesetzten α -Ketoisocapronsäuremenge ist, läßt sich photometrisch bei 340 nm verfolgen.



Reagenzien:

- 1) 1 M (NH₄)₂SO₄, pH 9
- 2) 5 mM NADH
- 3) Leucindehydrogenase aus *Bacillus cereus*

Probenvorbereitung:

Proben, Standard und dest. Wasser werden 1:100 in (NH₄)₂SO₄-Lösung verdünnt.

Testansatz in 1 mm - Durchflußküvette:

500 μ l Probe und 500 μ l NADH-Lösung werden in die Küvette gegeben und der Extinktionswert E₁ bei 340 nm abgelesen. Dann wird 5 μ l Leu-DH zugegeben. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 15 min) erhält man den Extinktionswert E₂. Die Berechnung der α -Ketoisocapronsäurekonzentration erfolgt mit Gleichung (Gl. 3.3) und (Gl. 3.4). Der Standard dient zur Kontrolle der Meßgenauigkeit.

$$\delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Wasser}} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

$$\text{Ketosäurekonz.} = (\delta E \cdot 2 \cdot 100) / 6.22 \quad [\text{mM}] \quad (\text{Gl. 3.4})$$

3.2.3.2. Bestimmung mit Ionenausschlußchromatographie

Die Messungen werden in einem HPLC-System der Firma Sykam (Gautingen) mit automatischer Probenahmeschleife und einem Photometer als Detektor durchgeführt. Proben und 50 bzw. 100 mM Eichstandards werden in zwei Schritten 1:1000 in dest. Wasser verdünnt.

Lactat und Acetat lassen sich quantitativ nicht erfassen, da sie bei der verwendeten Verdünnung ein zu schwaches Signal liefern. Bei geringerer Verdünnung wird ihr Signal von der extrem stark adsorbierenden α -Ketoisocapronsäure zugedeckt.

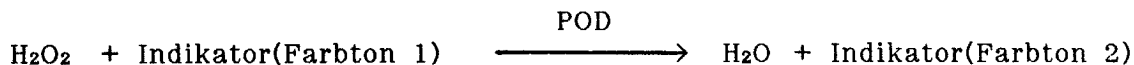
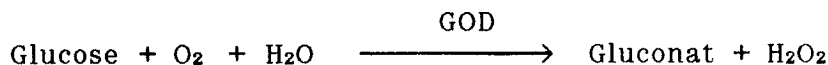
Analysenbedingungen:

Säule:	BT III OS (für organische Säuren) der Firma Biotronic (Maintal), $\varnothing$ 5 · 200 mm
Säulentemperatur:	40°C
Elutionsmittel:	0.02 N H ₂ SO ₄
Probevolumen:	100 μ l
Photometer:	215 nm
Stop time:	7.2 min
Ungefähre Retentionszeit: (α -Ketoisocaproensäure)	4.4 min

3.2.4. Bestimmung der Glucosekonzentration

3.2.4.1. Glucoseschnelltest

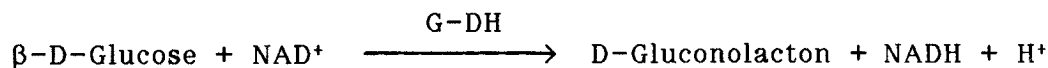
Bei Bedarf erfolgt eine Glucoseschnellbestimmung in frischen Proben mit Hilfe von Urinteststäbchen für Diabetiker (Diabur-Test 5000, Boehringer, Mannheim). Der Test beruht auf einer Farbreaktion unter Mitwirkung der Enzyme Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD).



Der Farbton der Teststäbchen wird nach 2 min Reaktionszeit mit einer Farbskala verglichen.

3.2.4.2. Quantitative Glucosebestimmung

Glucose wird enzymatisch nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode (Glucose 14055, Merck, Darmstadt) bestimmt. Dabei katalysiert die Glucose-Dehydrogenase (G-DH) die Oxidation der β -D-Glucose zu D-Gluconolacton. Dies geschieht unter gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH. Die Zunahme an NADH, die proportional zur umgesetzten Glucosemenge ist, läßt sich photometrisch bei 340 nm verfolgen.



Natürliche Glucose besteht aus 1/3 α -D-Glucose und 2/3 β -D-Glucose. Der Zusatz von Mutarotase beschleunigt die Umwandlung des α - in das β -Isomer.

Reaktionslösung:

0.12 M	Phosphatpuffer, pH 7.6
0.15 M	NaCl
5.2 kU/l	Glucose-Dehydrogenase
0.11 kU/l	Mutarotase
1.1 mM	NAD ⁺

Probenvorbereitung:

Die Proben werden je nach vermutetem Glucosegehalt 1:20 bis 1:200 in dest. Wasser vorverdünnt, um eine maximale Konzentration im Ansatz von 2 mM nicht zu überschreiten.

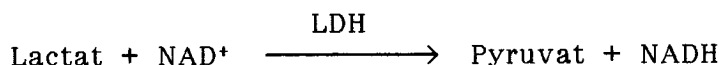
Testansatz in 1 cm Halbmikroküvette:

Man füllt 0.9 ml Reaktionslösung in die Küvetten und liest im Photometer den Reagenzienleerwert E_1 ab. 100 μ l vorverdünnte Probenflüssigkeit bzw. 1 mM Standard bzw. dest. Wasser werden zugegeben und der Extinktionswert E_2 nach Stillstand der Reaktion (etwa 15 min) abgelesen. Die Berechnung erfolgt mit Gleichung (Gl. 3.3) und (Gl. 3.5). Der Standard dient zur Kontrolle der Meßgenauigkeit.

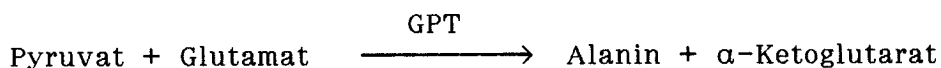
$$\text{Glucosekonzentration} = (\delta E \cdot 10 \cdot \text{Vorverdünnung}) / 6.22 \quad (\text{Gl. 3.5})$$

3.2.5. Bestimmung der Lactat-konzentration

Die quantitative Bestimmung von L-Lactat erfolgt enzymatisch unter Verwendung der entsprechenden Lactat-Dehydrogenase. Dabei wird Lactat unter Katalyse von Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Pyruvat oxidiert. Dies geschieht unter gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH. Die Zunahme von NADH, die proportional zur umgesetzten Lactatmenge ist, läßt sich photometrisch bei 340 nm verfolgen.



Das Gleichgewicht der obigen Reaktion liegt jedoch auf der linken Seite. Um die Umsetzung dennoch vollständig ablaufen zu lassen, wird zweckmäßigerweise das Reaktionsprodukt Pyruvat in einer Folgereaktion abgezogen. Das geschieht durch Aminierung von Pyruvat zu Alanin unter Katalyse von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT).



Reagenzien:

- 1) 2.44 g L-Glutaminsäure/73.5 ml + 26.5 ml 1 n NaOH
- 2) 75 mg NAD^+ in 4 ml
- 3) Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), ca. 94 U/mg Protein (Serva 22915)
- 4) L-Lactatdehydrogenase (LDH), ca. 550 U/mg (Boehringer Mannheim 127230)

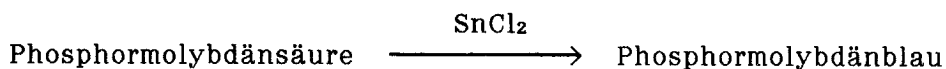
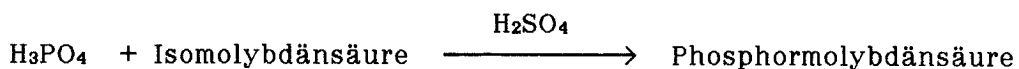
Testansatz in 1 cm Halbmikroküvette:

790 μ l Glutamatlösung
90 μ l NAD^+ -Lösung
10 μ l GPT
100 μ l Probe (maximal 1 mM Lactat)

Man mischt den Ansatz und mißt die Extinktion E_1 nach 3 - 5 min bei 340 nm. Dann wird 10 µl LDH zugegeben. Nach Stillstand der Reaktion (je nach Lactatkonzentration bis zu 2 Stunden) erhält man den Extinktionswert E_2 . Die Berechnung der Lactatkonzentration erfolgt mit sinngemäß modifizierten Gleichungen entsprechend (Gl. 3.3) und (Gl. 3.5).

3.2.6. Bestimmung der Phosphat-konzentration

Phosphat läßt sich kolorimetrisch mit dem Spectroquant 14488 Phosphor Test (Merck, Darmstadt) bestimmen. Er beruht auf der Reaktion der Orthophosphorsäure mit Isopolymolybdänsäure (Merck, P-1A) in schwefelsaurer Lösung. Wird das farblose Reaktionsprodukt Phosphormolybdän(VI)säure mit dem Zinn(II)Chlorid-haltigen Reduktionsmittel (Merck, P-2A) versetzt, so erhält man eine tiefblaue, kolloidale Lösung von Mischoxiden des Molybdäns in den Oxidationsstufen +IV und +VI (Phosphormolybdänblau). Dieser Farbstoff hat eine starke Adsorption bei 700 nm.



Probenvorbereitung:

Die Proben müssen mindestens 1:50 in dest. Wasser vorverdünnt werden, da sonst Medienbestandteile den Test stören. Die Eichkurve, Phosphatkonzentration gegen Extinktionsdifferenz gemäß (Gl. 3.3), zeigt bis mindestens 0.06 mM einen linearen Verlauf. Es läßt sich also ein Proportionalitätsfaktor angeben. Da sich die Steigung der Eichkurve mit dem Alter der Reagenzien leicht ändert, wird bei jeder Meßreihe ein 0.06 mM Standard mitgemessen und jeweils ein neuer Proportionalitätsfaktor berechnet.

Testansatz in 1 cm - Normalküvette:

Man gibt 2.5 ml Probe (maximal 0.06 mM Phosphat) bzw. dest. Wasser in die Küvetten und mißt die Anfangsextinktion E_1 bei 700 nm. Dann werden je ein Tropfen der Reagenzien P-1A und P-2A zugegeben. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 7 min) erhält man den Extinktionswert E_2 . Die Berechnung der Phosphatkonzentration erfolgt unter Benutzung von Gleichung (Gl. 3.3) und dem Proportionalitätsfaktor.

3.2.7. Gaschromatographische Bestimmungen

Ethanol, Essigsäure, Isovaleraldehyd und Isovaleriansäure lassen sich mit einem Gaschromatographen 5790A mit Flammenionisationsdetektor (FID) 5791A und Integrator 3390A (Hewlett-Packard, USA) quantitativ bestimmen. Es wird ein Temperaturprogramm mit folgenden Analysenbedingungen gefahren:

Säule:	Porapak QS, 80-100 mesh (Waters Ass., Mass., USA), ϕ 1/4 inch · 91.5 cm
Trägergas:	Stickstoff (99.999%)
Trägergasstrom:	70 ml/min
Probenvolumen:	1 μ l
Einspritzblocktemperatur:	250°C
FID-Temperatur:	250°C
Säulentemperatur 1:	145°C
Säulentemperatur 2:	165°C
Zeit(säulentemperatur1):	1 min
Zeit(säulentemperatur2):	35 min
Temperatursteigung:	36°C/min

Probenvorbereitung:

500 μ l Probe werden mit 500 μ l Probenverdünner (0.2 M HCl, 50 mM Methanol als interner Standard) in den Chromatographiefläschchen vermischt.

Ungefähre Retentionszeiten:

Wasser:	0.11 min
Methanol:	0.26 min
Ethanol:	0.65 min
Essigsäure:	1.82 min
Isovaleraldehyd:	3.86 min
Isovaleriansäure:	11.15 min
α -Ketoisocaproensäure:	26.79 min

Die α -Ketoisocaproensäure läßt sich nur qualitativ mitverfolgen. Isovaleraldehyd (vor allem aus den Proben) bindet sehr stark auf der Säule. Nach langer Benutzung muß die Säule durch häufiges Nachspritzen von Probenverdünner gründlich gespült werden. Isovaleraldehyd erscheint dann als "goast-peak" in abnehmender Höhe. Die Bestimmung dieser Substanz ist also mit größeren Fehlern verbunden. Die Auswertung erfolgt unter Berücksichtigung des internen Standards (Methanol) mit einer sinngemäß modifizierten Gleichung entsprechend (Gl. 3.2).

3.2.8. Bestimmung der spez. Sauerstoffaufnahme

Die Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme der Mikroorganismen erfolgt in einer Sauerstoffmeßzelle YSI Model 53 (Yellow Springs Instrument Co., Inc., Ohio, USA). Dabei wird in einer abgeschlossenen, gerührten Zelle das mit Luft gesättigte Testmedium mit Mikroorganismen versetzt und der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe einer polarographischen Sauerstoffelektrode verfolgt. Die Ausgabe des Meßsignals erfolgt auf einem gewöhnlichen Analogschreiber.

Analysenbedingungen:

Temperatur:	30°C
Mediumvolumen:	4 ml
Volumen Zellsuspension:	50 μ l
Schreiberempfindlichkeit:	100 mV
Papiervorschub:	1-2 cm/min

Meßvorschrift:

Es ist zweckmäßig, jeweils Doppelbestimmungen mit zwei unabhängigen Meßgeräten gleichzeitig durchzuführen. Die Elektroden werden mit frischen Membranen versehen, geeicht und die Funktionstüchtigkeit des gesamten Systems nach den Vorschriften des Herstellers überprüft. Zwei thermostatisierte Meßzellen werden mit Magnetrührern versehen und jeweils 4 ml sterilfiltriertes Medium, wie angegeben, eingefüllt. Die Rührer sind anschließend mit einem dünnen Schraubenzieher anzuheben, damit unter ihnen eingeschlossene Luftblasen entweichen können. Nachdem die Lösungen mindestens 5 min gerührt wurden und sich mit Luft sättigen konnten, pipetiert man jeweils 50 µl frische Zellsuspension hinzu. Die Meßzellen werden sofort mit den Elektroden verschlossen und das Signal mit dem Analogschreiber aufgezeichnet. Mit jedem Probenmaterial werden zwei Meßläufe durchgeführt und jeweils die Biomassekonzentration bestimmt.

Auswertung:

Am linearen Teil der Abfallkurven wird die zeitliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration Q_{O_2}' (mit der Einheit: % Luftsättigung/Zeit) abgegriffen. Die Berechnung der spez. Sauerstoffaufnahme erfolgt nach der Formel:

$$q = \frac{C_{O_2}^* \cdot Q_{O_2}'/100\%}{X \cdot F} \quad [\text{molO}_2/\text{gTS/h}] \quad (\text{Gl. 3.5})$$

mit q = Spez. Sauerstoffaufnahme [molO₂/gTS/h]
 Q_{O_2}' = Zeitliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration [%/h]
 $C_{O_2}^*$ = Sauerstoffsättigungskonzentration (s.u.): 0.21 mM
 X = Biomassekonzentration in der unverdünnten Zellsuspension [gTS/l]
 F = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension: 50/4050 [-]

Die Löslichkeit von Sauerstoff in reinem Wasser bei einem Partialdruck von 0.2095 bar und 30°C beträgt 0.243 mM (Schumpe et al., 1982). Die Löslichkeit in Kulturmedien ist jedoch geringer und ändert sich im Laufe einer Fermentation. Mit der von Schumpe et al. angegebenen Methode wurde ein mittlerer Wert von $C_{O_2}^* = 0.21$ mM abgeschätzt und für alle Berechnungen von q zugrunde gelegt.

3.2.9. Bestimmung der Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen

Die Oberflächeneigenschaften von *C. glutamicum* wurden in Zusammenarbeit mit Frau Nava Mozes (Unité de Chimie des Interfaces) an der Katholischen Universität in Louvain-la-Neuve, Belgien bestimmt.

3.2.9.1. Elementare Zusammensetzung der Zellwandoberfläche

Die elementare Zusammensetzung der Zellwandoberfläche läßt sich durch Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) ermitteln. Die gefriergetrockneten Proben werden in einem ESCA 3 MK II Spektrometer (Vacuum Generators, East Grinstead, UK.) analysiert. Die Eindringtiefe dieser Meßmethode in die Zellwandoberfläche beträgt etwa 5 nm. Die Konzentrationen der einzelnen Elemente werden in

Relation zu Kohlenstoff angegeben. Methode und Berechnungsgrundlagen sind bei Amory et al. (1988a) beschrieben.

3.2.9.2. Oberflächenladung

Die Oberflächenladung der Mikroorganismen läßt sich durch Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität in einem Laser-Zee-Meter (Typ 500, Pen Kem, Croton on Hudson, N.Y., USA) charakterisieren. Die gewaschenen Zellen werden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{10}/l$ in dest. Wasser suspendiert. Vor jeder Messung wird der pH mit verd. Salpetersäure auf den gewünschten Wert eingestellt.

3.2.9.2. Hydrophobizität

Die Oberflächenenergie bzw. Hydrophobizität der Mikroorganismen wird nach zwei Methoden bestimmt:

- 1) Randwinkelmessung eines auf eine getrocknete dichte Zellschicht aufgetragenen Wassertropfens.
- 2) Bestimmung des in einer hydrophoben Chromatographiesäule (Phenylsepharose) zurückgehaltenen Zellanteils.

Details sind bei Mozes und Rouxhet (1987) beschrieben.

3.2.10. Bestimmung des Flockulations- verhaltens der Mikroorganismen

DEAE-Dextran (Art. Dormacid Wi 63, Pfeifer & Langen, Dormagen) mit einem Molekulargewicht von 1.000.000 und einem Stickstoffgehalt von 3.4 % ist ein geeignetes Flockulationsmittel. Der Test wird in graduierten Zentrifugenröhrchen ($\phi 10 \cdot 110$ mm) mit 15 ml Inhalt durchgeführt. Die Röhrchen sind mit jeweils 1 ml DEAE-Dextranlösung verschiedener Konzentration zu füllen, um eine Endkonzentration, wie angegeben, zu erhalten. Die Mikroorganismen werden zweimal mit dest. Wasser gewaschen und die Biomassekonzentration auf etwa 7.5 gTS/l eingestellt. Man gibt je 5 ml dieser Zellsuspension in die Zentrifugenröhrchen, schüttelt kräftig von Hand und stellt die Ansätze dann ruhig (pH=6). Nach 40 Minuten wird das Volumen der flockulierten Zellmasse von der Graduierung der Röhrchen abgelesen. Der Prozentsatz flockulierter Zellen errechnet sich aus dem Volumenverhältnis der niedergeschlagenen Zellmasse zum gesamten Flüssigkeitsvolumen (6 ml).

3.2.11. Bestimmung des Adsorptions- verhaltens der Mikroorganismen

Die Mikroorganismen werden zweimal mit dest. Wasser gewaschen und in Wasser oder NaCl-Lösung, wie angegeben, resuspendiert. Man gibt je 20 g der oberflächenmodifizierten Sintergläser (Raschigringe) in 100 ml Schüttelkolben und bereitet für jede zu untersuchende Zellsuspension einen Referenzkolben mit 20 g gewöhnlichen Glas-Raschigringen vor. Zu Beginn des Versuches werden jeweils 40 ml Zellsuspension in die Kolben gegeben, die Gläser in einem Vakuumschrank

entgast und die Kolben auf einem Schüttler (Lab-Shaker, Braun, Melsungen) bei Raumtemperatur mit 160 U/min bewegt. In immer längeren Zeitabständen werden Proben genommen. Die adsorbierte Zellmasse errechnet sich aus der Differenz der frei suspendierten Biomasse zwischen Referenzkolben und Sinterglaskolben.

3.3. Herstellung der oberflächenmodifizierten Gläser

Alle Modifizierungsvorschriften dieses Kapitels sind in Tabelle 3.6 und 3.7 auf Seite 51 zusammengestellt. Versuchsdurchführung der Vergleichsversuche s. Kap. 3.1.3.

3.3.1. Gläser für adsorptive Bindung der Mikroorganismen

1) Säurebehandlung der Gläser

Vorschrift: 250 g poröses Glasmaterial wird mit 500 ml 5 %iger Salpetersäure überschichtet, im Wasserstrahlvakuum entgast und vier Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach einer mindestens 12-stündigen Wäsche mit fließendem dest. Wasser wird das Material bei 150°C getrocknet.

3.3.1.1. Kovalent gebundene niedermolekulare funktionelle Gruppen

2) Behandlung mit *gamma*-Aminopropyltriethoxysilan (Aminosilan) in Aceton

Chemismus der Kopplung von Aminosilan an Glas siehe Abb. 2.5 (S. 19).

Vorschrift: 250 g Säure-behandeltes Glasmaterial wird mit 500 ml einer 2 %igen Lösung von *gamma*-Aminopropyltriethoxysilan (Art. 13165, Serva, Heidelberg) in Aceton überschichtet, im Wasserstrahlvakuum entgast und für etwa 30 h bei 50°C gehalten. Das Glas wird dreimal mit Aceton gewaschen, dann im Trockenschrank bei 50°C von Aceton befreit und 12 h bei 110°C getrocknet. Anschließend wird mit dest. Wasser für mehrere Stunden gewaschen und dann getrocknet.

Diese Vorschrift bezieht sich auf Angaben von Weetall (1976). Später stellte sich jedoch heraus, daß Aceton zum Teil mit der Aminogruppe des Silans in der unten angegebenen Weise reagiert (Guilleth, 1986). Man muß damit rechnen, daß ein Teil der Aminogruppen für weitere Kopplungsreaktionen nicht mehr in reaktiver Form vorliegt:



G: Glasoberfläche

3) Behandlung mit *gamma*-Aminopropyltriethoxysilan (Aminosilan) in Ethanol

Vorschrift: 450 ml Ethanol und 25 ml *gamma*-Aminopropyltriethoxysilan (Art. 13165, Serva, Heidelberg) werden zusammengegeben, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 5 eingestellt und auf 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. 200 g unbehandeltes oder Säure-behandeltes Glasmaterial wird hinzugegeben, unter Wasserstrahlvakuum entgast und 4 h unter Rückfluß gekocht. Nach einer Wäsche unter fließendem dest. Wasser für 3 h wird das Material mindestens 12 h bei 110°C getrocknet. Anschließend wird nochmal für 12 h gewaschen und dann getrocknet.

4) Behandlung mit Triamino-funktionellem Trimethoxysilan (Triaminosilan) in Methanol

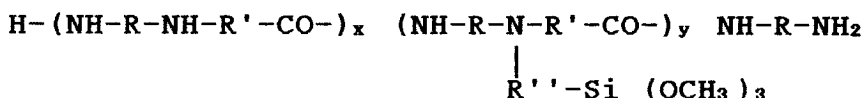
Das Silan (Art. A-1130, Union Carbide, Düsseldorf) besitzt zwei sekundäre und eine primäre Aminogruppe:



Vorschrift: 450 ml Methanol und 25 ml Triaminosilan werden zusammengegeben, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 5 eingestellt und auf 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. 110 g unbehandeltes oder Säure-behandeltes Glasmaterial wird hinzugegeben und im übrigen so verfahren, wie in Vorschrift 3 beschrieben.

5) Behandlung mit Polyazamid-Trimethoxysilan (Polyaminosilan) in Methanol

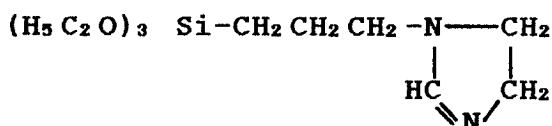
Die Substanz (Typ Y-5987, Union Carbide, Düsseldorf) enthält mehrere Silangruppen in einem Molekül, was die Stabilität und die Gleichmäßigkeit der Beschichtung erhöhen soll (Guilleth, 1986).



R, R', R'' sind Alkylgruppen. Die Polymerisationsgrade *x* und *y* werden vom Hersteller nicht angegeben.

Vorschrift: 425 ml Methanol und 50 ml Polyaminosilan (50 %ige Methanollösung) werden zusammengegeben, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 5 eingestellt und auf 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. 110 g unbehandeltes oder Säure-behandeltes Glasmaterial wird hinzugegeben und im übrigen so verfahren, wie in Vorschrift 3 beschrieben.

6) Behandlung mit 3-4,5-Dihydroimidazol-1-yl-propyltriethoxysilan (Imidazolsilan) in Ethanol



Vorschrift: 450 ml Ethanol und 25 ml Imidazolsilan (DYNASILAN IMEO, Dynamit Nobel, Troisdorf) werden zusammengegeben, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 5 eingestellt und auf 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. 110 g unbehandeltes Glasmaterial wird hinzugegeben und im übrigen so verfahren, wie in Vorschrift 3 beschrieben.

7) Behandlung mit Trimethylchlorsilan (Trimethylsilan) in Chloroform

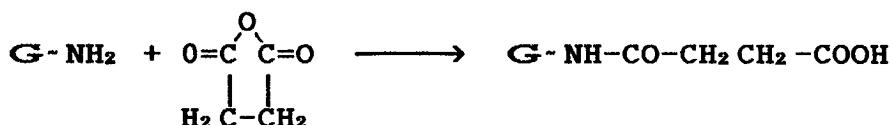


G: Glasoberfläche

Vorschrift: 200 g Säure-behandeltes Glasmaterial wird mit 475 ml Chloroform und 25 ml Trimethylchlorsilan (Art. 37055, Serva, Heidelberg) überschichtet, entgast und 4 h unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird dreimal gründlich mit Chloroform gewaschen und 48 h bei 50°C im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Das Glasmaterial wird mit fließendem dest. Wasser für mindestens 12 h gewaschen und dann getrocknet.

8) Herstellung von Carboxyl-funktionellem Glas aus Amino-funktionellem Glas (Lynn, 1975)

Bei der Ringöffnung des Bernsteinsäureanhydrids bildet eine der beiden Carboxylgruppen mit einer primären Aminogruppe auf der Glasoberfläche eine Amidbindungen aus.

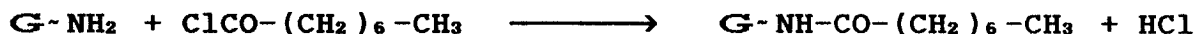


G: Glasoberfläche

Vorschrift: 110 g Amino-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 2 bzw. 3, wird mit 1000 ml frischer 1 %iger Bernsteinsäureanhydrid-Lösung, die mit gesättigter Natronlauge auf pH 6.2 gebracht worden ist, überschichtet, entgast und 12 h bei 25°C gehalten. Danach wird mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser gewaschen und 12 h bei 110°C getrocknet.

9) Herstellung von n-Heptyl-funktionellem Glas aus Amino-funktionellem Glas

Caprylsäurechlorid bildet mit den primären Aminogruppen auf der Glasoberfläche unter Salzsäure-Abspaltung Amidbindungen nach folgender Reaktionsgleichung aus:



G: Glasoberfläche

Vorschrift: 60g Amino-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 2, wird mit 190 ml Chloroform und 10 ml Caprylsäurechlorid (Art. 21700, Fluka, Neu-Ulm) überschichtet, entgast und 2 h unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wird dekantiert und das Material dreimal mit Chloroform gewaschen und bei 75°C

im Vakuum getrocknet. Danach wird mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser gewaschen und 12 h bei 110°C getrocknet.

10) Herstellung von Phenylmethyl-funktionellem Glas aus Amino-funktionellem Glas



G: Glasoberfläche

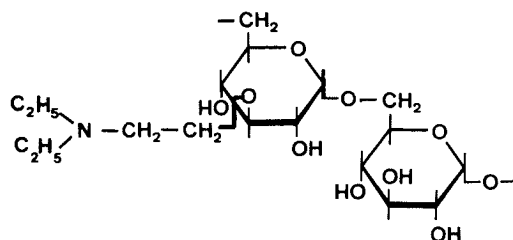
Vorschrift: 60g Amino-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 2, wird mit 192 ml Chloroform und 8 ml Phenylacetylchlorid (Art. 77830, Fluka, Neu-Ulm) überschichtet und im übrigen so behandelt, wie in Vorschrift 9 beschrieben.

3.3.1.2. Adsorptiv gebundene kationische Polymere

Glasmaterialien besitzen generell eine negative Ladung auf ihren Oberflächen. Auf ihnen können sich daher Substanzen mit positiv geladenen chemischen Gruppen elektrostatisch anlagern. Die Bindungsstärke ist abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke des umgebenden Mediums. Methoden zur Oberflächenbehandlung von Glas mit Chitosan (Champluvier et al., 1987), kationischer Stärke (Thonart et al., 1982) oder Polyethylenimin (D'Souza et al., 1986) wurden publiziert.

11) Behandlung mit DEAE-Dextran

Bei DEAE-Dextran handelt es sich um Polysaccharide, die aus linear α -1,6-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten mit wenigen kurzen α -1,3-glycosidisch gekoppelten Seitenketten bestehen. Etwa jede zweite Glucose-Einheit ist in C3-, zu einem kleineren Anteil auch in C2- und C4-Position, über Etherbindungen mit monomeren und dimeren Diethylaminoethyl-Gruppen verbunden (Schwengers, 1987):



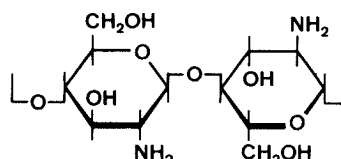
Es kommen Produkte der Firmen Sigma (Deisenhofen), Art. D 9885 (3.2 % N; Mol. Gew.: 500.000) und Pfeifer & Langen (Dormagen), Art. Dormacid Standard (3.3 % N; Mol. Gew.: 600.000) und Dormacid Wi 63 (3.4 % N; Mol. Gew.: 1.000.000) zur Anwendung. Methoden zur Oberflächenmodifizierung von Gläsern mit DEAE-Dextran für die Immobilisierung von Mikroorganismen wurden zum Patent angemeldet (Büchs et al., 1987a).

Vorschrift: 250 g unbehandeltes oder Säure-behandeltes Glasmaterial wird mit 500 ml einer, wenn nicht anders angegeben, 3 %igen DEAE-Dextran-Lösung überschichtet, im Wasserstrahlvakuum entgast und 20 min bei 121°C

autoklaviert. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

12) Behandlung mit Chitosan

Chitosan wird aus Chitin durch Deacetylierung hergestellt. Es handelt sich dabei um ein β -1,4-glycosidisch verknüpftes Polyglucosamin mit einem Molekulargewicht von etwa 1 - 2 Millionen:

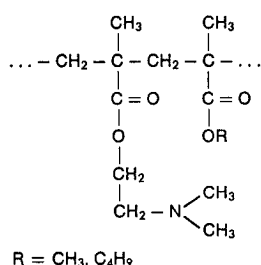


Chitosan flockt aus essigsaurer Lösung bei Zugabe von kleinen Mengen Sulfat wieder aus. Das im verwendeten Sintermaterial enthaltene Kaliumsulfat kann durch Zugabe von Calciumchlorid abgefangen werden.

Vorschrift: 110 g Säure-behandeltes und im Ultraschallbad gewaschenes Glasmaterial wird in eine Lösung von 0.5 g CaCl₂/l gegeben, entgast und 12 h bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wird gewaschen und getrocknet. Eine wässrige Lösung aus 2.5 g Chitosan (Art. C 3646, Sigma, Deisenhofen), 0.13 g CaCl₂ und 2.5 ml 96 %iger Essigsäure in 250 ml wird hergestellt (pH ~ 4.0) und über das vorbereitete Glas gegeben, entgast und 12 h bei Raumtemperatur bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

13) Behandlung mit EUDRAGIT E

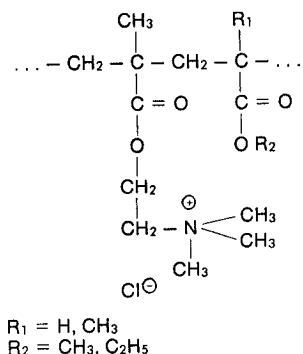
Bei EUDRAGIT E (Mol. Gew. 150.000) handelt es sich um ein Copolymerisat auf Basis von Dimethylaminoethylmethacrylat und neutralen Methacrylsäureestern (Röhm, Darmstadt):



Vorschrift: Aus 5 g EUDRAGIT E und 2 ml 96 %iger Essigsäure wird eine wässrige Lösung in 250 ml hergestellt (pH ~ 3.8) und filtriert. 110 g Säure-behandeltes Glas wird hinzugegeben, entgast und 12 h bei Raumtemperatur bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

14) Behandlung mit EUDRAGIT RL

Bei EUDRAGIT RL (Mol. Gew. 150.000) handelt es sich um ein Copolymerisat auf Basis von Acryl- und Methacrylsäureestern mit einem Gehalt an quartären Ammoniumgruppen von etwa 10 % (Röhm, Darmstadt). Die Substanz ist nicht in wässrigen Medien löslich, aber quellbar:



Vorschrift: 110 g unbehandeltes Glas wird in 250 ml einer 0.25 %igen Lösung aus EUDRAGIT RL in Aceton gegeben, im Wasserstrahlvakuum entgast und bei Raumtemperatur mehrere Tage stehengelassen. Ein Zentrifugenröhrchen wird halb mit saugfähigem Papier gefüllt, das Glasmaterial darübergeschichtet und kurz ausgeschleudert. Dann wird das Material 12 h bei Raumtemperatur, anschließend 4 h bei 75°C getrocknet. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

15) Behandlung mit Polyethylenimin (D'Souza et al., 1986)

Bei Polyethylenimin handelt es sich um lineare Moleküle folgender Struktur:



Vorschrift: 110 g Säure-behandeltes Glas wird in eine wässrige Lösung aus 2.5 ml Polyethylenimin (50 %ige Lösung, Art. P 3143, Sigma, Deisenhofen) in 250 ml gegeben, entgast und 12 h bei Raumtemperatur bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet. Carboxyl-funktionelles Glas gemäß Vorschrift 8 wird in der gleichen Weise adsorptiv beschichtet.

3.3.1.3. Quervernetzung adsorbierter kationischer Polymere

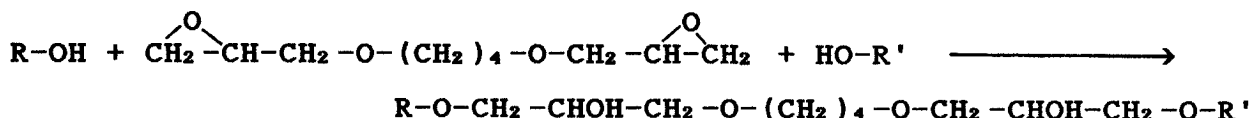
Durch Adsorption kationischer Polymere hergestellte Oberflächenmodifizierungen lassen sich durch eine Quervernetzung der Makromoleküle stabilisieren. Die Beschichtung erhält dadurch in sich eine größere Festigkeit, während die Haftung auf der Unterlage nicht verändert wird.

16) Quervernetzung von DEAE-Dextran mit 1,4-Butandiol diglycidylether (Sundberg und Porath, 1974)

Bei 1,4-Butandiol diglycidylether handelt es sich um ein bifunktionelles Reagenz mit zwei Epoxygruppen folgender Struktur:



Die Substanz greift Hydroxygruppen in den Polysaccharidketten an. Dabei öffnen sich die Epoxyringe und koppeln über eine Etherbindung auf folgende Weise:



R und R' können zwei verschiedene oder auch ein identischer DEAE-Dextran-Polymerfaden sein.

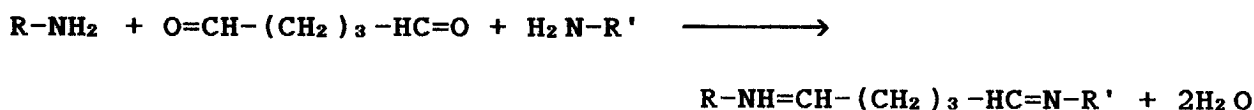
Vorschrift: 50 g DEAE-Dextran behandeltes Glas, gemäß Vorschrift 11, wird mit 50 ml 1,4-Butandiol diglycidylether (Art. 12,419-2, Aldrich, Steinheim) und 50 ml 0.6 M Natronlauge, in der 0.1 g Natriumborhydrid (NaBH₄) gelöst wurde, überschichtet. Das Material wird im Wasserstrahlvakuum entgast und 8 h bei 25°C bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

Da Epoxygruppen in wässrigem Medium hydrolysieren können, kann alternativ in organischen Lösungsmitteln gearbeitet werden (Tayot et al., 1981).

Vorschrift: 50 g DEAE-Dextran behandeltes Glas, gemäß Vorschrift 11, wird mit 150 ml Diethylether, in dem 2.3 ml 1,4-Butandiol diglycidylether gelöst wurden, überschichtet und 12 h bei 25°C bewegt. Die Lösung wird dekantiert und das Glasmaterial im Wasserstrahlvakuum 2 h bei 25°C, anschließend 12 h bei 75°C getrocknet. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

17) Quervernetzung von Polyethylenimin mit Glutardialdehyd

Die Aldehydgruppen an beiden Enden des Glutardialdehyd-Moleküls reagieren mit den endständigen primären Aminogruppen des Polyethylenimins unter Ausbildung von Schiff'schen Basen:



R, R': Polyethylenimin-Polymerfäden

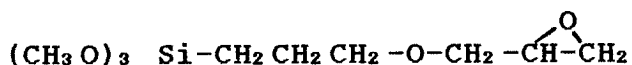
Vorschrift: 50 g Polyethylenimin-behandeltes Glas, gemäß Vorschrift 15, wird mit 25 ml Glutardialdehyd 25 %ig (Art. 4239, Merck, Darmstadt) und 100 ml Wasser überschichtet, im Wasserstrahlvakuum entgast und 8 h bei Raumtemperatur bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

3.3.1.4. Kovalent gebundene kationische Polymere

Dauerhafte Oberflächenmodifizierungen lassen sich durch eine kovalente Kopplung der Polymere erzielen. Die Glaskörper werden dafür durch eine Vorbehandlung mit Silanen aktiviert. Die kovalente Bindung von kationischen Polymeren zur Immobilisierung von Mikroorganismen wurde zum Patent angemeldet (Büchs et al., 1987b).

18) Kopplung von DEAE-Dextran an Epoxy-funktionellem Glas

Die Glasoberfläche wird zunächst mit *gamma*-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (Glycidylsilan), (Art. GLYMO, Dynamit Nobel, Troisdorf) behandelt:



Vorschrift: 110 g Säure-behandeltes Glas wird mit 10 ml Glycidylsilan und 490 ml wasserfreiem Aceton überschichtet, unter Wasserstrahlvakuum entgast und einen Tag bei Raumtemperatur bewegt. Das Material wird dreimal mit Aceton gewaschen und dann 2 h bei 60°C und einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird mit dest. Wasser für mindestens 12 h gewaschen und dann getrocknet.

Die Epoxy-Gruppe kann anschließend mit den Glucose-Einheiten des DEAE-Dextrans nach folgender Reaktionsgleichung reagieren:



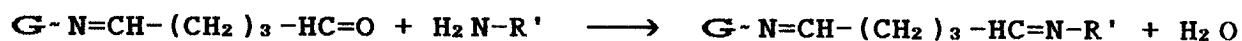
G: Glasoberfläche; **R:** DEAE-Dextranmolekül

In wässrigem Medium können die Epoxygruppen hydrolysieren, ohne daß eine Kopplung des DEAE-Dextrans zustande kommt. Alternativ kann Dimethylsulfoxid verwendet werden, in welchem sich Dextran gut löst (Ibrahim et al., 1985) und die Epoxygruppen eine gute Stabilität besitzen (Sundberg und Porath, 1974).

Vorschrift: 50 g Epoxy-funktionelles Glas wird mit 200 ml einer 3 %igen wässrigen Lösung von DEAE-Dextran (Art. Dormacid Standard, Pfeifer & Langen, Dormagen), die mit gesättigter Natronlauge auf pH 8 eingestellt wurde, überschichtet. Das Material wird im Wasserstrahlvakuum entgast, drei Tage bei Raumtemperatur und anschließend einen Tag bei 60°C bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet. Alternativ wird über Molekularsieb getrocknetes Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel eingesetzt.

19) Kopplung von Polyethylenimin an Amino-funktionellem Glas mit Glutardialdehyd

Eine der beiden Aldehydgruppen des Glutardialdehyds bildet mit der Aminogruppe auf der Glasoberfläche eine Schiff'sche Base aus. Die zweite Aldehydgruppe steht für eine ebensolche Bindung mit der endständigen primären Aminogruppen des Polyethylenimins zur Verfügung. Die Polymerfäden werden daher jeweils an den Enden gekoppelt, was zu einer günstigen Orientierung auf der Glasoberfläche führt. Die Bindung muß in einer Zweischnittreaktion erfolgen, da Glutardialdehyd die Polyethyleniminmoleküle sonst miteinander verketteten würde.

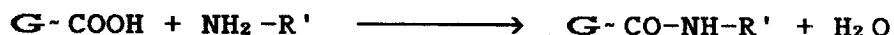


G: Glasoberfläche; **R'**: Polyethylenimin-Rest

Vorschrift: 50 g Amino-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 3, wird mit 25 ml Glutardialdehyd 25 %ig (Art. 4239, Merck, Darmstadt) und 100 ml Wasser überschichtet, kurz im Wasserstrahlvakuum entgast und 4 h bei Raumtemperatur bewegt. Das Material wird 4 h unter fließendem dest. Wasser gewaschen und bei 25°C im Vakuum getrocknet. Anschließend wird das Glas in eine 1 %ige wässrige Lösung von Polyethylenimin 50 %ig (Art. P 3143, Sigma, Deisenhofen) gegeben, entgast und 12 h bei 37°C bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet.

20) Kopplung von Polyethylenimin an Carboxyl-funktionellem Glas mit Carbodiimid (Lynn, 1975)

Carbodiimid wirkt als wasserentziehendes Mittel und katalysiert dadurch die Bildung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe auf der Glasoberfläche und der endständigen primären Aminogruppe des Polyethylenimins:



G: Glasoberfläche; **R'**: Polyethylenimin-Rest

Vorschrift: 50 g Carboxyl-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 8, wird mit 125 ml einer wässrigen Lösung von 1.25 ml Polyethylenimin 50 %ig (Art. P 3143, Sigma, Deisenhofen) und 1.25 g N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat (CME-CDI) (Art. 29470, Fluka, Neu-Ulm), die mit 6 M Salzsäure auf pH 4.6 gebracht wurde, überschichtet. Der Ansatz wird im Wasserstrahlvakuum entgast und 4 h bei Raumtemperatur bewegt. Nach einer Wäsche von mindestens 12 h unter fließendem dest. Wasser wird das Material bei 75°C getrocknet. Achtung, Carbodiimid ist sehr giftig!

3.3.2. Gläser für kovalente Bindung der Mikroorganismen

Die publizierten Methoden zur kovalenten Bindung von Mikroorganismen greifen fast ausschließlich an den freien Aminogruppen (z.B. des Lysins) der Proteine auf den Zellwänden an. Die Glasoberfläche wird durch Silane vorbehandelt. Einschrittreaktionen sind für die Bindung von lebenden Mikroorganismen unbrauchbar, da sie bei diesen Methoden mit den toxischen Kopplungschemikalien direkt in Berührung kommen. Es muß außerdem steril gearbeitet werden, da sich das einmal aktivierte Glasmaterial nicht mehr autoklavieren läßt.

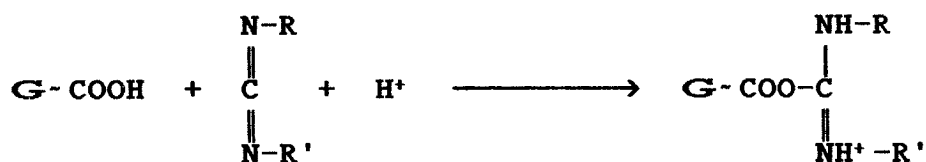
21) Bindung an Amino-funktionellem Glas mit Glutardialdehyd (Monsan, 1977)

Der Reaktionschemismus entspricht Vorschrift 19.

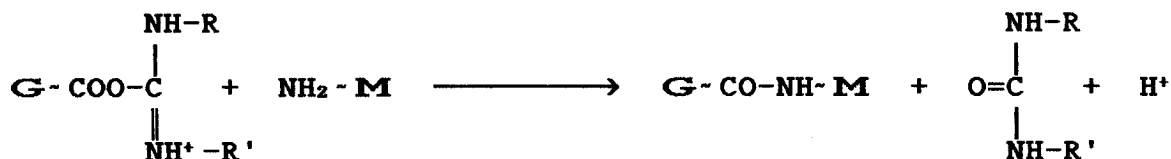
Vorschrift: 50 g Amino-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 3, wird in einem 200 ml-Weithalskolben mit Wattestopfen 20 min bei 121°C autoklaviert und 12 h bei 75°C getrocknet. Das Material wird mit einer Mischung aus 25 ml Glutardialdehyd 25 %ig (Art. 4239, Merck, Darmstadt) und 100 ml sterilem dest. Wasser überschichtet, im Vakuumschrank entgast und 4 h bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wird das aktivierte Glas mindestens 10 mal unter Schütteln mit sterilem dest. Wasser gewaschen und bei 25°C im Vakuum getrocknet. Im übrigen wird verfahren, wie in Kap. 3.1.3 beschrieben.

22) Bindung an Carboxyl-funktionellem Glas mit Carbodiimid (Jack und Zajic, 1977b)

Der Reaktionschemismus ähnelt Vorschrift 20. Die Kopplung muß jedoch wegen der Giftigkeit von Carbodiimid als Zweischnittreaktion erfolgen. Im ersten Schritt bildet das im Überschuß zugegebene Carbodiimid mit der Carboxyl-Funktion auf dem Glas einen Pseudoharnstoff aus:



Dieser zerfällt bei Kontakt mit den primären Aminogruppen auf der Oberfläche der Mikroorganismen in einen substituierten Harnstoff, welcher sich ablöst. Es resultiert eine Amidbindung zwischen Glas und Mikroorganismus:

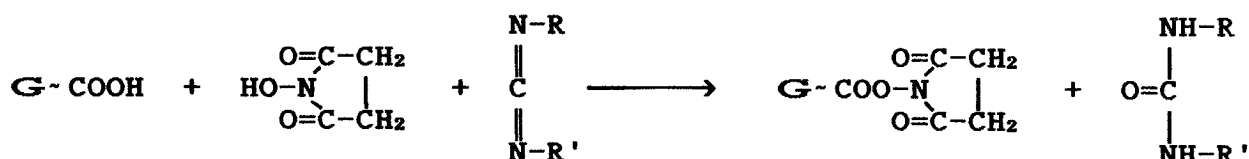


G: Glasoberfläche; **M:** Mikroorganismus; **R, R':** Reste des CME-CDI

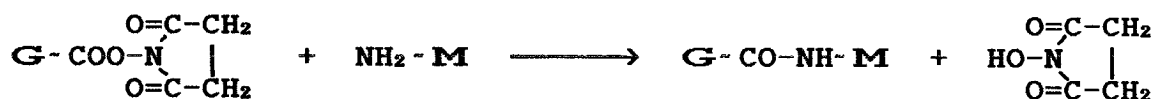
Vorschrift: 50 g Carboxyl-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 8, wird in einem 200 ml-Weithalskolben mit Wattestopfen 20 min bei 121 °C autoklaviert und 12 h bei 75°C getrocknet. Das Material wird mit 200 ml einer sterilen wässrigen Lösung von 2 g N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat (CME-CDI) (Art. 29470, Fluka, Neu-Ulm), die mit 6 M Salzsäure auf pH 4.6 eingestellt wurde, überschichtet. Der Ansatz wird im Wasserstrahlvakuum entgast und 4 h bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wird das aktivierte Glas mindestens 10 mal unter Schütteln mit sterilem dest. Wasser gewaschen und bei 25°C im Vakuum getrocknet. Im übrigen wird verfahren, wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Achtung, Carbodiimid ist sehr giftig!

23) Bindung an Carboxyl-funktionellem Glas über einen "aktiven Ester" (Lynn, 1975)

N-Hydroxysuccinimid wird an die Carboxylgruppe auf dem Glas unter Bildung eines Esters gekoppelt. Carbodiimid katalysiert diese Reaktion durch seine Wasser-entziehende Wirkung:



Bei Kontakt mit den primären Aminogruppen auf der Oberfläche der Mikroorganismen löst sich das N-Hydroxysuccinimid wieder ab, wobei die Mikroorganismen über eine Amidbindung mit der Carboxyl-Funktion auf dem Glas verbunden werden:



G: Glasoberfläche; **M**: Mikroorganismus; **R, R'**: Reste des DCC

Vorschrift: 50 g Carboxyl-funktionelles Glas, gemäß Vorschrift 8, wird in einem 200 ml-Weithalskolben mit Wattestopfen 20 min bei 121 °C autoklaviert und 12 h bei 75°C getrocknet. Das Material wird mit 200 ml einer Lösung von 4 g N-Hydroxysuccinimid (Art. 56480, Fluka, Neu-Ulm) und 8 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (Art. 36650, Fluka, Neu-Ulm) in Dioxan überschichtet, im Vakuumschrank entgast und 4 h bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wird das aktivierte Glas je viermal mit Dioxan, Methanol und sterilem Wasser unter Schütteln gewaschen und bei 25°C im Vakuum getrocknet. Im übrigen wird verfahren, wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Achtung, das verwendete Carbodiimid ist als besonders Krebs-erregend beschrieben!

Vorschrift	Funktionelle Gruppe	Maßgebende Oberflächeneigenschaft	
		Ladung	Energie
Kovalent gebundene niedermolekulare funktionelle Gruppen			
1	Hydroxyl	(-)	hydrophil
2,3	Amino	+	
4	Triamino	+	
5	Polyamino	+	
6	Imidazol	+	
7	Methyl	keine	hydrophob
8	Carboxyl (Amid)	- (+)	
9	n-Heptyl (Amid)	(+)	hydrophob
10	Phenylmethyl (Amid)	(+)	hydrophob
Adsorptiv gebundene kationische Polymere			
11	DEAE-Dextran	+	
12	Chitosan	+	
13	EUDRAGIT E	+	
14	EUDRAGIT RL	+	
15	Polyethylenimin	+	
Quervernetzte adsorbierte kationische Polymere			
16	DEAE-Dextran	+	
17	Polyethylenimin	+	
Kovalent gebundene kationische Polymere			
18	DEAE-Dextran	+	
19,20	Polyethylenimin	+	

Tabelle 3.6: Liste der oberflächenmodifizierten Gläser zur adsorptiven Bindung der Mikroorganismen

Vorschrift	Funktionelle Gruppe auf dem Glas	Aktivierung
21	Amino	Glutardialdehyd
22	Carboxyl	Carbodiimid
23	Carboxyl	Aktiver Ester

Tabelle 3.7: Liste der oberflächenmodifizierten Gläser zur kovalenten Bindung der Mikroorganismen

3.4. Aufbau der Versuchsanlagen

3.4.1. Festbettreaktoren für Vergleichsversuche

Die Wirksamkeit der Oberflächenmodifizierungen der Sintergläser wird in 5 bis 6 parallel betriebenen, baugleichen Festbettreaktoren (Flüssigkeitsfüllvolumen 100 ml) ermittelt. Eine photographische Darstellung von fünf Reaktoren mit pO_2 -Meßeinrichtung ist in Abb. 3.2 zu sehen. Sie werden ohne äußeren Flüssigkeitsumlauf und ohne pH-Titrierung im Batch-Betrieb eingesetzt. (Konstruktionszeichnung der Reaktorgefäße mit Erläuterung siehe Anhang A.2.)

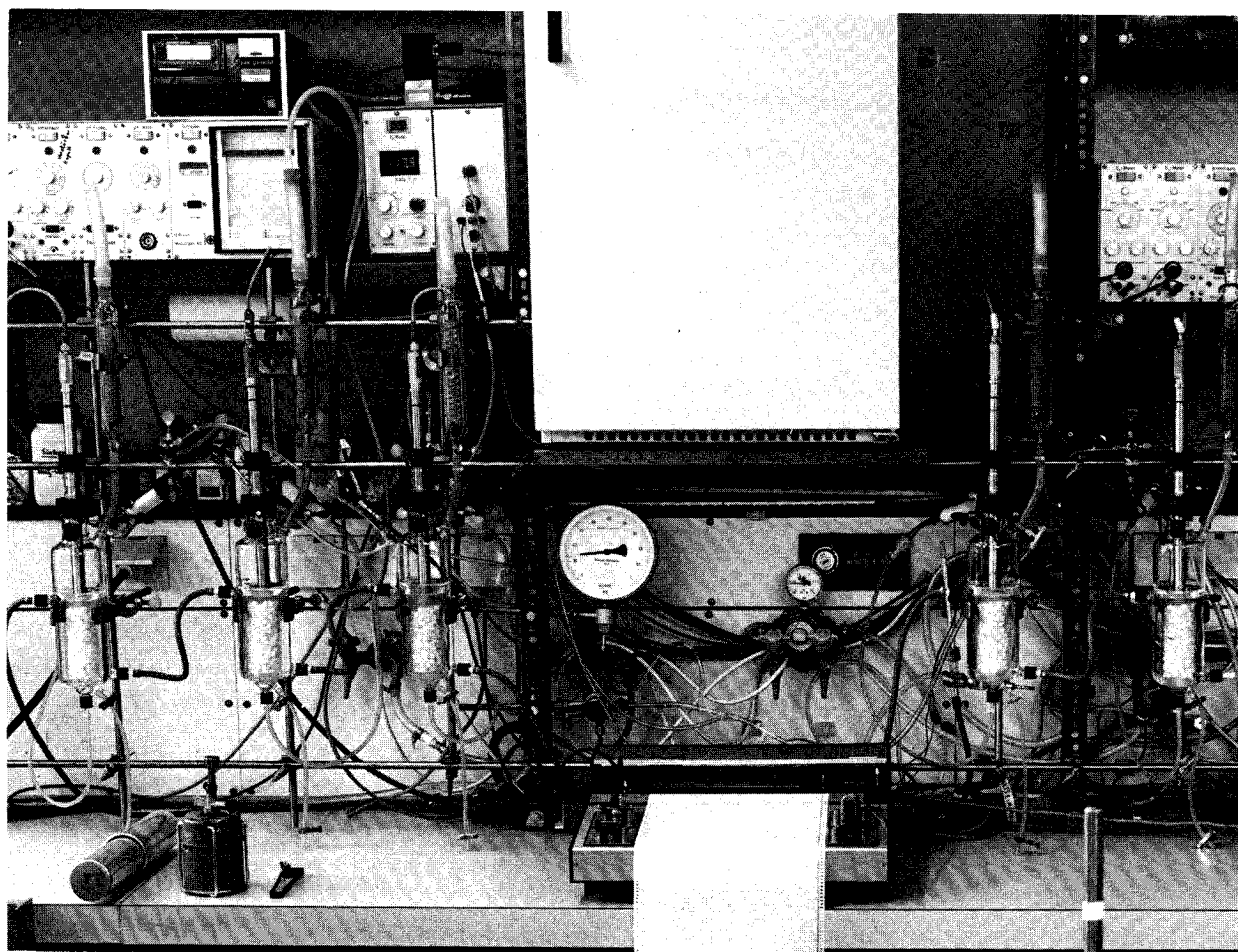


Abb. 3.2: Photographische Ansicht von fünf Festbettreaktoren (mit pO_2 -Meßeinrichtung) zum Vergleich von verschieden oberflächenbehandelten Gläsern

Zur Begasung dient reiner Sauerstoff, der nachweislich keinen negativen Einfluß auf die Zellen hat. Er wird einer 20 l Flasche entnommen und durch einen Druckminderer auf 1.3 bis 2 bar gedrosselt. Über ein einstellbares Präzisionsnadelventil und den Vorfilter, ein mit Watte gefülltes Glasrohr, gelangt

der Sauerstoff unter die Fritte (Filterplatte D3, Porenweite 16-40 µm, Schott, Mainz) und wird in der Fermentationsflüssigkeit dispergiert. Das Abgas verläßt den Reaktor über den Rücklaufkühler, auf dem ein mit Watte gefüllter Sterilfilter sitzt. Zu Beginn eines Versuches werden alle Einheiten auf die gleiche Begasungsrate (ca. 0.7 vvm) justiert. Dazu schließt man oben an die Abgasfilter ein Schwebekörperdurchflußmesser an und stellt den Gasstrom der Reaktoren der Reihe nach mit den Nadelventilen ein.

Die Reaktoren können mit einer pO₂-Meßeinrichtung versehen werden. Dazu befestigt man sterilisierbare pO₂-Elektroden mit Klemmverschraubungen in den zentralen Einfüllöffnungen, so daß die Membranen der Elektroden gerade oberhalb der Schüttung in die Flüssigkeit eintauchen. Die Elektroden werden mit Auswertegeräten verbunden und das Signal auf einen Schreiber gegeben.

Die Thermostatisiermäntel der Reaktoren sind in Reihe geschaltet. Eine zusätzlich eingebaute Zahnradpumpe sorgt für eine gute Zirkulation des Thermostatenwassers. Zum Sterilisieren werden die Zugasleitungen mit ihrem Schraubanschluß von den Vorfiltern genommen, die Reaktoren vom Haltegestell gelöst und als Ganzes in den Autoklaven gelegt. Die Probenahme erfolgt durch eine Propangasflamme hindurch mit 1 ml Glas-Pipetten.

3.4.2. Rührkesselreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche

Erste kontinuierliche Fermentationsversuche wurden in einem Standard-Rührkesselreaktor Typ L 1523 mit einem Gesamtvolumen von 7 l der Firma Bioengineering (Wald, Schweiz) durchgeführt.

Der Reaktor ist mit Meßeinrichtungen für pO₂ und Redoxpotential und mit Regeleinrichtungen für pH, Temperatur, Drehzahl und Reaktorinnendruck versehen. Der Substratzulauf erfolgt durch eine Thermofalle. Der Fermenter ruht halbseitig auf einer Wägeeinrichtung, deren Signal zur Füllstandsregelung ausgewertet wird. Die Anlage wird chemostatisch betrieben. Substrat- und Laugeverbrauch werden über Waagen registriert. Ein mobiles Gerät mit thermischen Massendurchflußmessern (Durchflußmesser 5810 N, Ventil 5835 N, Steuergerät 4252; Brooks, Veerendaal, Holland) regelt die Begasungsrate. Das gleiche Gerät erfaßt mit einem zusätzlichen Durchflußmesser den Abgasvolumenstrom. Zur Abgasanalyse dienen ein paramagnetisches Sauerstoffmeßgerät (Typ Magnos 2T) und ein Infrarot-CO₂-Meßgerät (Typ Uras 7 N, Hartmann & Braun, Frankfurt). Beide Geräte werden jede Woche mit Prüfgasen geeicht.

Für die Berechnung der Sauerstoffaufnahmerate Q_{O_2} [mol/l/h] aus den Eingas- und Abgasströmen v_e bzw. v_a [Nl/h] und den entsprechenden O₂-Volumenanteilen $y_{O_2,e}$ bzw. $y_{O_2,a}$ [-] gilt:

$$Q_{O_2} = (v_e \cdot y_{O_2,e} - v_a \cdot y_{O_2,a}) / V_R - V_{m0} \quad [\text{mol/l/h}] \quad (\text{Gl. 3.6})$$

mit V_R = Fermenterinhalt [l]

V_{m0} = Molares Normvolumen [22.4 Nl/mol]

Die spez. Sauerstoffaufnahme rate der Mikroorganismen q [mol/gTS/h] errechnet sich mit der Biotrockenmasse X [g/l] zu:

$$q = Q_{O_2}/X \quad [\text{mol/gTS/h}] \quad (\text{Gl. 3.7})$$

Unter folgenden Bedingungen wurde im Rührkesselfermenter gearbeitet:

Medium:	Medium Alt (s. Tab. 3.5)
Fermenterinhalt:	3.5 l
Temperatur:	30°C
pH-Wert:	7.4
Fermenterinnendruck:	1.5 bar
Rührerdrehzahl:	600 - 800 U/min
Begasungsrate:	0.35 - 0.55 vvm

3.4.3. Festbettumlaufreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche

Die kontinuierlichen Fermentationsversuche erfolgen in Glasreaktoren (Glasbläserei der Kernforschungsanlage Jülich). Diese werden mit einem äußeren Flüssigkeitsumlauf betrieben, um Gradienten im Reaktor zu vermeiden und um eine ausreichende Begasung zu gewährleisten. Anschlüsse und Elektroden, die im Reaktor keinen Platz finden, können im Umlauf untergebracht werden. Die periphere Meß- und Regelungstechnik besteht aus Einzelsystemen verschiedener Hersteller (s.u.). Eine photographische Ansicht, ein Grundfließbild und eine detaillierte schematische Darstellung der kontinuierlichen Fermentationsanlage sind in Abb. 3.3, Abb. 3.4 bzw. Abb. 3.5 zu sehen.

3.4.3.1. Reaktorgefäß und äußerer Umlauf

Eine Konstruktionszeichnung des Reaktorgefäßes mit Erläuterung ist im Anhang A.3 beigelegt. Das Flüssigkeitsfüllvolumen der gesamten Fermentationsanlage beträgt je nach Ausgestaltung zwischen 175 und 190 ml.

Aus dem oberen, aufgeweiteten Teil des Reaktors wird seitlich Fermentationsflüssigkeit mit einem Volumenstrom von 0.8-1.2 l/min abgepumpt, durch den äußeren Umlauf geleitet und unten in den Reaktor zurückgeführt (s. Abb. 3.4). Auch bei hohen Substrat-Durchflußraten durch den gesamten Reaktor ist der Strom durch den Umlauf wesentlich (>500 mal) höher. Dadurch erhält der Reaktor die Charakteristik eines vollständig durchmischten Rührkesselfermenters.

Im Flüssigkeitsstrom des äußeren Umlaufs liegen der Reihe nach: pO_2 -Elektrode pO_2E , Probenahmeseptum und Abzweigung zur kontinuierlichen OD-Messung PN, pH-Elektrode pHE mit Einleitung von Säure, Lauge und Rücklauf des OD-Meßkreises, Umlaufpumpe UP, Abzweigung zur Antischaumeinleitung, Reaktorablauf und Bodenantischaumelektrode AE (s. Abb 3.5).

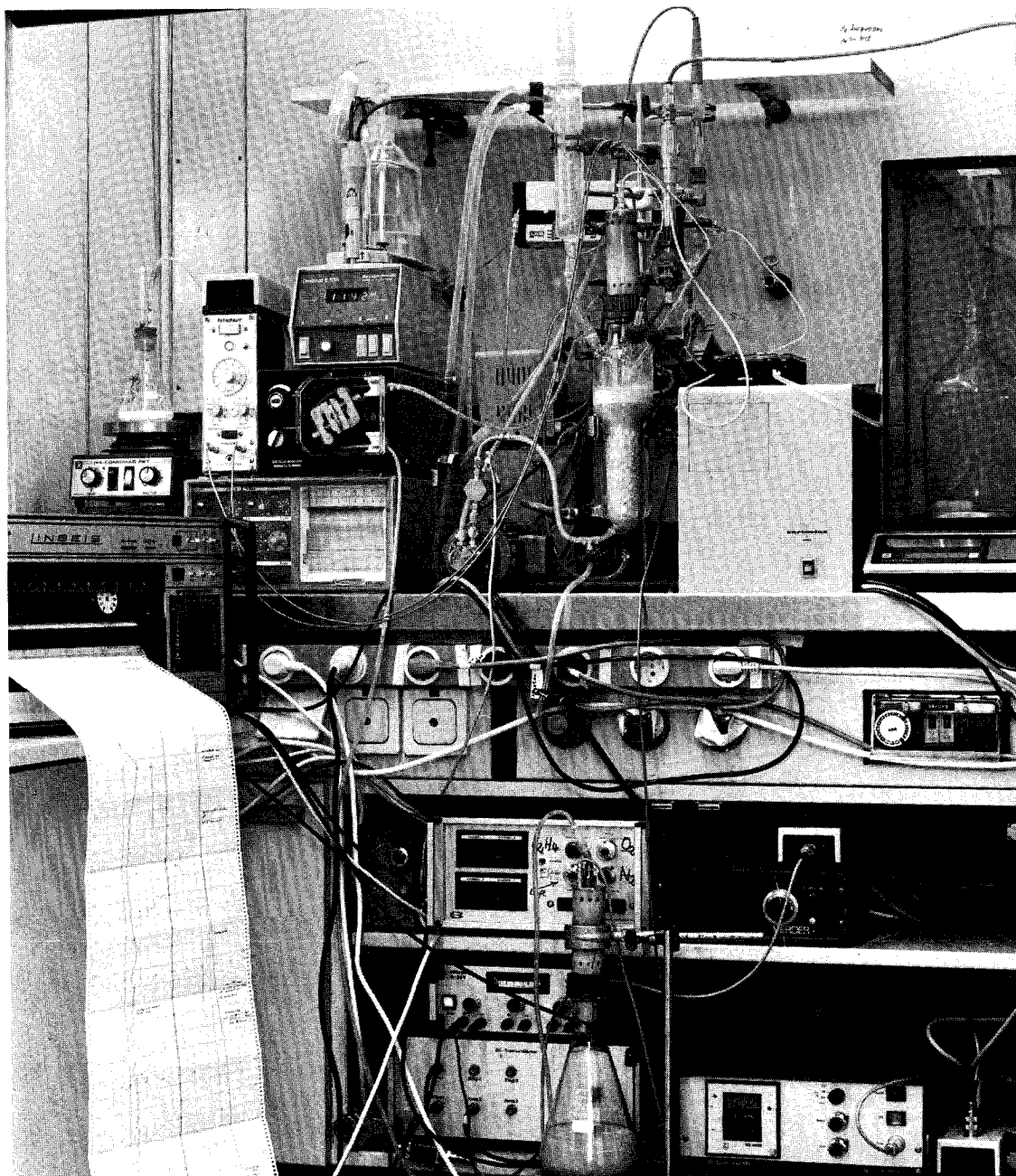


Abb. 3.3: Photographische Ansicht einer kontinuierlichen Fermentationsanlage mit Festbettumlaufreaktor

Das Flüssigkeitsvolumen in der Absaugleitung zwischen dem belüfteten Teil des Reaktors und der Membran der autoklavierbaren pO_2 -Elektrode (Typ 322 756701, Ingold, Frankfurt) beträgt etwa 2.5 ml. Bei einem Volumenstrom von > 800 ml/min bleibt der Abfall des pO_2 auf der Strecke bis zur pO_2 -Elektrode gering.

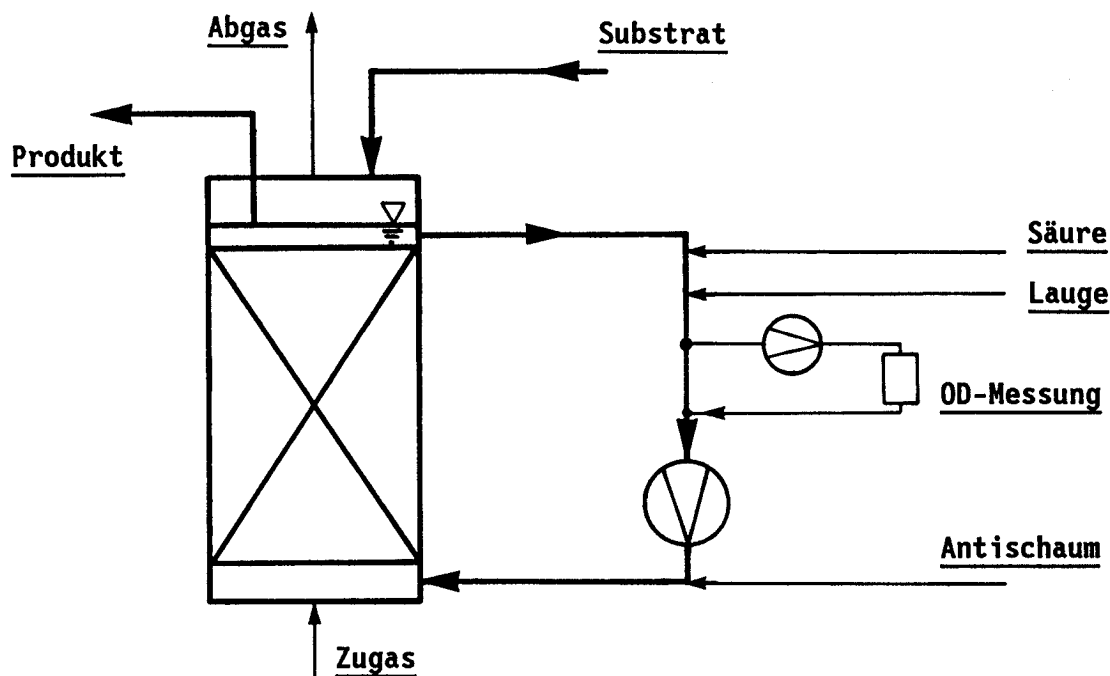
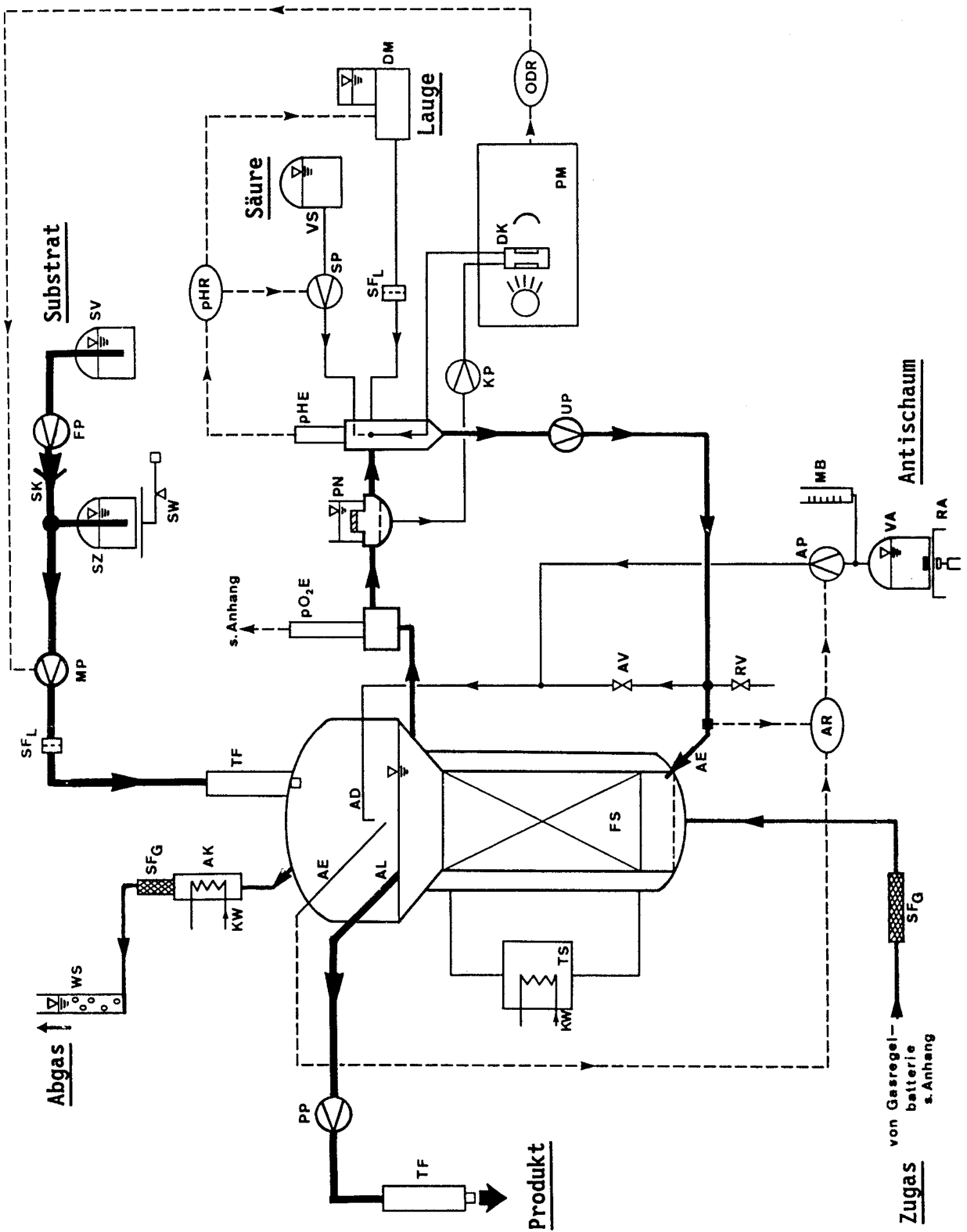


Abb. 3.4: Grundfließbild der kontinuierlichen Fermentationsanlage mit Festbettumlaufreaktor

Abb. 3.5: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Fermentationsanlage mit Festbettumlaufreaktor

AD:	Antischaumdüse	PN:	Probenahmeseptum
AE:	Antischaumelektrode	pO ₂ E:	pO ₂ -Elektrode
AK:	Abgaskühler	PP:	Produktpumpe
AL:	Absauglanze für Produktlösung	RA:	Magnetrührerantrieb
AP:	Antischaumpumpe	RV:	Reaktorablaufventil
AR:	Antischaumregler	SFG:	Sterilfilter (Gas)
AV:	Ventil für Antischaumkreislauf	SFL:	Sterilfilter (Flüssigkeit)
DK:	Durchflußküvette	SK:	Sterilkupplung
DM:	Dosimat für Lauge	SP:	Säurepumpe
FP:	Auffüllpumpe	SV:	Substratvorlage
FS:	Füllkörperschüttung	SW:	Substratwaage
KP:	Küvettenkreislaufpumpe	SZ:	Substrat-Zwischenlager
KW:	Kühlwasser	TF:	Thermofalle
MB:	Meßbürette	TS:	Thermostat
MP:	Mediumpumpe	UP:	Umlaufpumpe
ODR:	OD-Regler	VA:	Antischaumvorlage
pHE:	pH-Elektrode	VS:	Säurevorlage
pHR:	pH-Regler	WS:	Wassersäule
PM:	Photometer		



Zur Probenahme dient ein Septum aus Silikongummi, das mit einer sterilen Injektionsnadel durchstochen werden kann. Um auch nach langem Betrieb Keimfreiheit zu gewährleisten, wird der Raum über dem Septum ständig unter iso-Propanol gehalten. Unter der Anstichstelle ist eine grobe Fritte (Filterplatte D00, Porenweite 250–500 µm, Schott, Mainz) eingeschmolzen, über die Flüssigkeit für die kontinuierliche OD-Messung abgezogen wird. Die Fritte verhindert das Eindringen von Schmutzpartikeln in den sehr engen Küvettenkreislauf und dient zur Beruhigung und damit Ausgasung der Flüssigkeit.

Die Einspeisungsstelle für Säure und Lauge befindet sich kurz vor der Glasmembran der pH-Elektrode. Die Ansprechzeit ist daher sehr kurz, und es kann nicht zum Übertitrieren kommen.

Als Umlaufpumpe wird eine regelbare, magnetisch gekoppelte Zahnrادpumpe (Typ V.096.07, Verder, Düsseldorf) verwendet. Der Pumpenkopf ist abnehmbar und läßt sich zusammen mit dem Reaktor autoklavieren. Kurz hinter der Umlaufpumpe zweigt eine Schlauchleitung ab und mündet in einer Düse oberhalb des Flüssigkeitsspiegels im Reaktor AD. Eine Schlauchklemme AV begrenzt den Volumenstrom. In diese Nebenleitung gelangt das konzentrierte Antischaummittel. Es vermischt sich mit Fermentationsflüssigkeit und wird auf diese Weise in verdünnter Form auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgesprüht.

Der mit Wasser gefüllte Reaktor läßt sich zusammen mit dem Haltegestell autoklavieren. Anschließend wird der äußere Umlauf abgeklemmt und das Wasser nur aus dem Reaktor abgelassen. Man erwärmt die feuchte Füllkörperschüttung mit dem Thermostaten auf 90°C und trocknet sie durch sterile Luft. Die Sinterglaskörper saugen dadurch die Zellsuspension beim Animpfen besser auf.

3.4.3.2. Kontinuierliche OD-Messung

Aus dem äußeren Umlauf des Reaktors wird ein Nebenstrom von 25–30 ml/min für die kontinuierliche OD-Messung entnommen. Eine Schlauchpumpe KP (Typ Mini-S, Ismatec, Zürich, Schweiz) mit einem Maprenschlauch $\phi_1 = 3.2$ mm (Watson & Marlow, Cornwall, England) drückt die Fermentationsflüssigkeit durch eine Durchflußküvette DK mit einer Schichtdicke von 0.2 mm (Typ 170-QS, Hellma, Müllheim/Baden). Die Verbindungsschläuche sind aus Teflon mit einem Innendurchmesser von 1 mm. Die hohe Strömungsgeschwindigkeit (>0.5 m/sec) im ganzen Kreislauf verhindert weitgehend ein Anwachsen von Mikroorganismen, so daß ein Betrieb über mehrere Monate möglich ist. Die Trübung der Fermentationsflüssigkeit wird in einem Spectrophotometer PM (Typ UV 140, Shimadzu, Düsseldorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Das Signal ist über Monate reproduzierbar und läßt sich für eine turbidostatische Regelung (s. unten) ausnutzen.

3.4.3.3. Substratzugabe und Produktableitung

Das sterile Medium wird in einer 2 l-Vorratsflasche SZ zwischengelagert, welche zur Mengenregistrierung auf einer elektronischen Waage SW (Typ 1507 MP8, Sartorius, Göttingen) steht. Ein D/A-Wandler (Typ 7287) formt das Signal für die Meßwerterfassung um. Von der Substratvorlage SZ gelangt das Medium durch eine

Schlauchpumpe **MP** in ein Mikrofilter **SF_L** (Membranfilter SM 11107, Vorfilter SM 13430, Filtergehäuse SM 16254, Sartorius), wo Schmutzpartikel und evtl. Kontaminationen zurückgehalten werden. Das Substrat wird in den Glasreaktor über eine auf der zentralen Einfüllöffnung montierten Thermofalle **TF** (Art. 3823261-8, Braun, Melsungen) eingeleitet. Die Substratvorlage **SZ** auf der Waage kann über eine durch Sterilkupplung **SK** wechselbare große Mediumflasche **SV** mit Hilfe einer Schlauchpumpe **FP** aufgefüllt werden. Die gesamte Substratzuführung wird zusammen mit dem Reaktor autoklaviert.

Die Steuerung der Substratpumpe **MP** erfolgt chemostatisch oder turbidostatisch. Bei der turbidostatischen Betriebsweise wird die Pumpe über den Regler **ODR** kontrolliert. Er wertet das OD-Signal des Photometers **PM** im Küvettenkreislauf aus. Steigt das elektrische Signal über einen am Regler eingestellten Wert an, so schaltet er die Substratpumpe **MP** ein. Die Mikroorganismensuspension im Reaktor wird durch Medium verdünnt und die OD sinkt ab. Bei Unterschreiten der Schaltschwelle wird die Pumpe wieder ausgeschaltet.

Das Füllniveau im Reaktor wird durch eine Lanze **AL**, die auf die Flüssigkeitsoberfläche ragt, bestimmt. Die Lanze ist mit einer Schlauchpumpe **PP** (Typ 501 U/R, Watson & Marlow, Cornwall, England) verbunden. Sie pumpt mit relativ hoher Geschwindigkeit so lange Flüssigkeit aus dem Reaktor ab, bis der Spiegel unter die Absaugöffnung fällt und Gas nachströmt. Die Füllhöhe bleibt dadurch konstant. Der Ablauf der Produktleitung ins Freie (Produktauffangflasche) ist mit einer Thermofalle **TF** (s.o.) versehen, um ein Zurückwachsen von Fremdkeimen in den Reaktor zu unterbinden. Ein regelbares Netzgerät versorgt beide Thermofallen. Zu hohe Heizleistungen führen zum Festbacken von Substrat- bzw. von Produktlösung und damit zum Verstopfen.

3.4.3.4. pH-Regelung

Die pH-Messung der Fermentationsflüssigkeit erfolgt durch eine sterilisierbare pH-Elektrode **pHE** mit abnehmbarem Meßkabel (Typ 405-60-M8-K9-BW, Ingold, Frankfurt). Das Signal gelangt in einen pH-Regler **pHR** (Typ 561/1-565/1, Metrohm, Herisau, Schweiz), welcher einen Dosimaten **DM** (Typ 535, Metrohm) mit 5 ml Glaszylinder für Lauge (2n NaOH) und eine Schlauchpumpe **SP** (Typ 101 U/R, Watson & Marlow, Cornwall, England) für Säure betätigt. Der Teflonkolben des Herstellers wird zweckmäßigerweise durch einen gedrehten Metallkolben mit zwei Silikondichtringen ersetzt (Institutswerkstatt). Die Ansteuerung des Dosimaten erfolgt über den Tastereingang. Das Gerät registriert die verbrauchte Laugemenge und gibt das Signal auf den Plotter. Die Lauge wird über ein in der Zuleitung eingebautes Membranfilter **SF_L** sterilfiltriert. Es kommt ein neues Nylonmaterial (Art. SM 20007, Sartorius, Göttingen) in einem Schraubgehäuse aus Stahl (Typ FM 025/0, Schleicher & Schüll, Dassel) zum Einsatz. Das Vorratsgefäß und die Zuleitungen für Säure **VS** werden zusammen mit dem ganzen Reaktor autoklaviert.

Die zutitrierte Laugemenge macht einen beträchtlichen Teil (bis über 10 %) des gesamten Flüssigkeitsstroms durch den Reaktor aus. Das Substrat wird abhängig von den Volumenströmen durch die Lauge "verdünnt". Die Berechnung der Durchflußrate (bzw. mittleren Verweilzeit) erfolgt daher auf Grund des Gesamtstromes.

3.4.3.5. Begasung, pO_2 -Regelung und Innendruckeinstellung

Die Begasung des Reaktorinhaltes erfolgt durch eine Fritte (Filterplatte D3, Porenweite 16-40 μm , Schott) im Boden. Steriles Sauerstoff-Luft-Gemisch wird über einen Vorfilter **SF_c**, ein mit Watte gefülltes Glasrohr, zugeführt. Die Mengeneinstellung erfolgt durch ein Reglersystem mit thermischen Massendurchflußmessern. Dieses System wird wiederum von einem pO_2 -Regler beeinflusst. Details sind im Anhang A.5 beschrieben.

Das Abgas verläßt den Reaktor über einen Rücklaufkühler **AK**, auf dem ein Sterilfilter **SF_c** sitzt. Es ist aus einem Rohr aufgebaut, welches mit Glaswolle gefüllt ist. Das Material neigt im Gegensatz zu Watte nicht zum Quellen und zum Verstopfen, wenn es mit Feuchtigkeit in Berührung kommt. An den Abgasfilter läßt sich eine Wassersäule **WS** von bis zu 2 m anschließen, um den Innendruck im Reaktor zu erhöhen.

3.4.3.6. Schaumkontrolle

Im Reaktor sind am Bodeneinlauf und im Gasraum oberhalb des Flüssigkeitsspiegels Schaumsonden **AE** (Platindraht in Glas eingeschmolzen) eingebaut, die mit einem Antischaumregler-Einschub **AR** (Typ 881 202, Braun, Melsungen) verbunden sind. Wird durch aufsteigenden Schaum eine leitende Verbindung zwischen beiden Elektroden für eine wählbare Standzeit hergestellt, so löst der Regler die Antischaumzugabe aus. Die Schaltschwelle ist einstellbar. Die Schlauchpumpe **AP** (Typ 101 U/R, Watson & Marlow) fördert Antischaummittel aus einem Vorratsgefäß **VA**, bzw. einer Meßbürette **MB** für eine wählbare Zeit in den Reaktor. Anschließend wird der Regler für eine einstellbare Pausenzeit abgestellt, um die Wirkung der Antischaumzugabe abzuwarten. Der Magnetrührer **RA** hält das Antischaummittel in Emulsion. Das Vorratsgefäß, die Meßbürette und die Versorgungsleitungen für Antischaummittel werden zusammen mit dem ganzen Reaktor autoklaviert.

Von acht getesteten Antischaummitteln erwies sich der Typ OC 6003 der Firma Bayer (Leverkusen) als das wirksamste. Toxische Nebenwirkungen der Substanz waren nicht feststellbar. Bei optimal eingestelltem Antischaumregler ließ sich der Verbrauch auf unter 0.1 g/l Substrat reduzieren.

Der Antischaumregler enthält eine zusätzliche Schaltung (Institutswerkstatt), mit welcher der Zeitpunkt und die Anzahl der Antischaumzugaben registriert und auf den Plotter gegeben werden kann.

3.4.3.7. Datenerfassung

Folgende Meßwerte werden auf einem analogen 12-Punkteplotter (Typ LP 12, Linseis, Selb) aufgezeichnet: OD, pH, Laugeverbrauch, pO_2 , Sauerstoffstrom, Luftstrom, Antischaummenge und Substratgewicht.

3.4.4. Wirbelschichtreaktor für kontinuierliche Fermentationsversuche

Das Reaktorgefäß des Wirbelschichtreaktors entspricht im grundsätzlichen Aufbau den oben beschriebenen Festbettreaktoren (Details siehe Anhang A.4). Der Reaktionsraum ist mit 52 g gesiebten Sinterglaskugeln ($\varnothing$ 1-1.4 mm) gefüllt. Das Flüssigkeitsfüllvolumen beträgt 195 ml. Bei Begasung und einem Volumenstrom des Umlaufs von 1 l/min ergibt sich eine Bettausdehnung etwa 50 %. Die Peripherie und Ausrüstung des Wirbelschichtreaktors entspricht den oben beschriebenen Festbettanlagen.

4. Ergebnisse & Diskussion

4.1. Mikrobiologie

4.1.1. Stoffwechsel

4.1.1.1. Bilanzierung des Prozesses

Bis vor kurzem wurde angenommen, daß bei Aminosäure-produzierenden coryneformen Bakterien die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase nur schwach ausgebildet ist (s. Kap. 2.1.3). Bei der Leucinbildung aus α -Ketoisocapronsäure müßten folglich mit dem Leucin molare Mengen einer Substanz des Citronensäure-Cyclus ins Medium ausgeschieden werden. Um diese Frage zu klären und evtl. unentdeckte Nebenprodukte aufzuspüren, wurde der Fermentationsprozeß vollständig bilanziert.

Dazu diente ein kontinuierlicher Versuch in einem Rührkesselreaktor, der mit einer Gasanalytik ausgerüstet war. Bei verschiedenen stationären Zuständen wurden Proben gezogen, analysiert und mit den Gaswerten in die Bilanzierung aufgenommen.

Aus Literaturdaten (Harris und Adams, 1979; Bailey und Ollis, 1986) läßt sich folgende verkürzte chemische Summenformel für Mikroorganismen abschätzen:



Der C-Gewichtsanteil an der gesamten Zelltrockenmasse kann mit 50 % angesetzt werden. Aus dem Molekulargewicht von Kohlenstoff (12 g/mol) folgt ein formales Molekulargewicht der Mikroorganismen von 24 g/mol.

4.1.1.1.1. Kohlenstoffbilanz

Tabelle 4.1 zeigt die Aufstellung der C-Bilanz (Methode s. Anhang A.6) für sechs Proben. Es sind die in den Reaktor ein- und ausfließenden Kohlenstoffströme $\dot{C}_{\text{ein}}$ bzw. $\dot{C}_{\text{aus}}$ gegenübergestellt. Die Abweichungen sind als prozentuale Fehler angegeben. Die erste Probe der Tabelle repräsentiert Fermentationsbedingungen mit einem sehr tiefen $p\text{O}_2$. Die dabei ausgeschiedenen anaeroben Stoffwechselprodukte (Lactat, Acetat und Succinat) wurden mit berücksichtigt.

Abb. 4.1 veranschaulicht am Beispiel von Probe-Nr. 2 (Tab. 4.1) die ein- und ausströmenden Kohlenstoffmengen. Die Energie- und Kohlenstoffquelle der Zellen (Glucose) und der "precursor" (α -Ketoisocapronsäure) sind getrennt dargestellt.

Die Bilanzdeckung in Tabelle 4.1 beträgt über 92 %. Wachsende Mikroorganismen scheiden eine Vielzahl von Substanzen in kleinen Mengen aus, die wahrscheinlich in ihrer Summe den bei der Bilanz fehlenden Teil von < 8 % ausmachen.

Eine zur Leucinbildung equimolare Ausscheidung einer nicht berücksichtigten Substanz (s.o.) ist auszuschließen.

Nr.	<u>C_{ein}</u> [g/h]			<u>C_{aus}</u> [g/h]							Fehler %
	Gluc	Keto	Σ_{ein}	Gluc	Lac,Ac Suc	Zellen	CO _{2,g}	CO _{2,l} HCO ₃ ⁻	Keto Leuc	Σ_{aus}	
1	7.24	3.13	10.37	0.33	1.02	2.15	2.86	0.15	3.04	9.55	-7.9
2	6.65	2.87	9.52	0.04	-	2.40	4.07	0.15	2.71	9.37	-1.6
3	7.64	3.30	10.94	1.38	-	2.23	3.17	0.15	3.14	10.07	-7.8
4	7.55	3.26	10.81	2.29	-	1.91	2.76	0.12	3.06	10.14	-6.2
5	5.24	2.26	7.50	0.12	-	1.86	3.51	0.12	2.19	7.80	+4.0
6	5.39	2.33	7.72	0.51	-	1.66	3.06	0.11	2.19	7.53	-2.5

Tabelle 4.1: Geschlossene Kohlenstoffbilanz einer sich im Fließgleichgewicht befindlichen kontinuierlichen Kultur

Ein- und ausströmende Kohlenstoffmengen C_{ein} bzw. C_{aus}, verursacht durch Glucose (Gluc), α -Ketoisocapronsäure (Keto), Lactat + Acetat + Succinat (Lac, Ac, Succ), Zelltrockenmasse (Zellen), CO₂-Gas (CO_{2,g}), gelöstes CO₂ + Bicarbonat (CO_{2,l}, HCO₃⁻) und α -Ketoisocapronsäure + Leucin (Keto, Leuc)

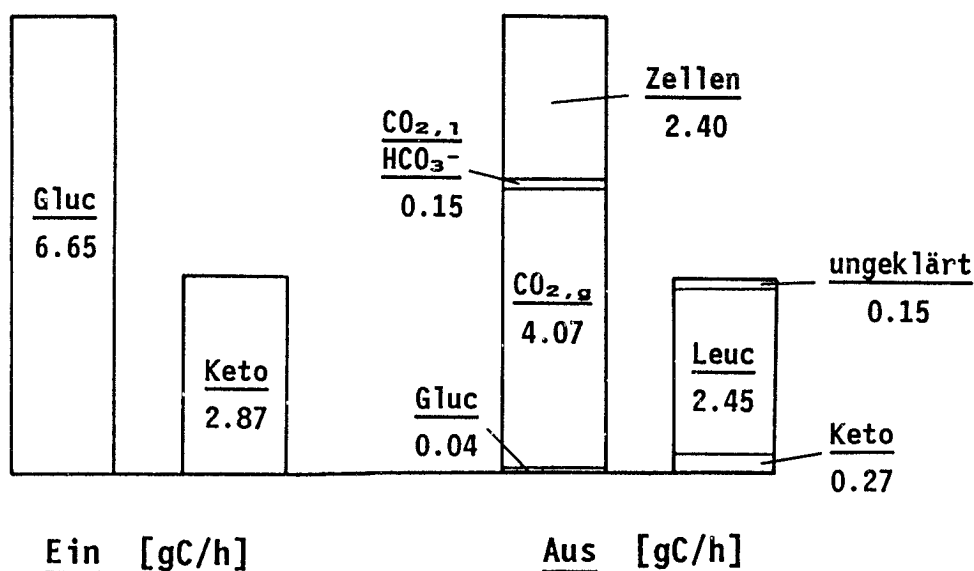


Abb. 4.1: Ein- und ausströmende Kohlenstoffmengen [gC/h] eines kontinuierlichen Rührkesselreaktors im Fließgleichgewicht

Beispiel: Probe-Nr. 2 von Tab. 4.1; Zeichenerklärung s. Tab. 4.1

4.1.1.1.2. Redoxbilanz

Tabelle 4.2 zeigt die Aufstellung der Redoxbilanz (Methode s. Anhang A.6) an einem Beispiel. Die ein- und ausstömenden Redoxflüsse sind gegenübergestellt. Für die Mikroorganismen wurde die oben aufgeführte Summenformel zugrunde gelegt. Es ergibt sich eine geringe Abweichung von 2.8 %.

	Substanz	Reduktionsgrad [mol/mol]	Stoffstrom [mmol/h]	Redoxfluß [mmol/h]	Σ [mmol/h]
Ein	Glucose	24	92	2208	2068
	O ₂	-4	308	-1232	
	NH ₃	0	184	-	
	Ketosäure	28	39	1092	
Aus	Glucose	24	0.5	12	2010
	Ketosäure	28	3.9	109	
	Leucin	30	35	1050	
	Zellen	4.3	195	839	
	CO _{2,ges}	0	351	-	
Fehler %					-2.8

Tabelle 4.2: Geschlossene Redoxbilanz einer sich im Fließgleichgewicht befindlichen kontinuierlichen Kultur
Berechnung des Reduktionsgrades gemäß Definition s. Anhang A.6.

Mit den beiden Formen der Bilanzierung ist nachgewiesen, daß alle mengenmäßig relevanten Substanzen in der meßtechnischen Erfassung des Prozesses berücksichtigt wurden. Die von den Mikroorganismen aufgenommene Glucose, die nicht zur Zellmaterial-Synthese dient, wird vollständig zu CO₂ oxidiert. Die Leucinbildung läuft bei vollständig funktionsfähigem Citronensäure-Cyclus ab, d.h. die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase arbeitet (s. Kap. 2.1.3.).

4.1.1.2. Stöchiometrische Größen (Ausbeutekoeffizienten)

(Die wichtigsten Zahlenwerte dieses Kapitels sind am Ende in Tab. 4.5; S. 69 zusammengefaßt.)

4.1.1.2.1. Ausbeutekoeffizient bzw. Zellertrag $Y_{x/s}$ [gTS/gGlu]

Dieser Wert gibt die gebildeten g Biotrockenmasse pro g verbrauchte Kohlenstoffquelle (Glucose) an.

Wachstum ohne Leucinbildung

$Y_{x/s}$ wurde zunächst für reines Wachstum der Zellen ohne gleichzeitige Leucinbildung auf Medium ohne α -Ketoisocaprinsäure bestimmt. Bei Batch-Versuchen ergab sich sowohl im Schüttelkolben, als auch im Festbettreaktor mit Kalk bzw. pH-Titration ein Wert von $Y_{x/s} = 0.38 \text{ gTS/gGlu}$. Bailey und Ollis (1986) geben für verschiedene Mikroorganismen $Y_{x/s}$ -Werte an, die für Wachstum auf Glucose zwischen 0.38 – 0.5 gTS/gGlu liegen.

Wachstum mit Leucinbildung

Bei aerobem Wachstum mit gleichzeitiger Leucinbildung in Medien mit α -Ketoisocaprinsäure ist $Y_{x/s}$ generell erniedrigt (s. Tab. 4.3). Acetat aus dem zulaufenden Medium bzw. Lactat und Acetat als bei niedrigem pO_2 auftretende anaerobe Stoffwechselprodukte wurden auf folgende Weise berücksichtigt: Ein Mol Glucose wird beim anaeroben Abbau in zwei Mol Lactat bzw. Acetat gespalten, die ausgeschieden werden (s. Kap. 2.1.4.). Beide Säuren befinden sich im Stoffwechsel "oberhalb" des Citronensäure-Cyclus, in dem der überwiegende

Kulturbedingung	Medium	Zellertrag $Y_{x/s}$ [gTS/gGlu]
Schüttelkolben	verschiedene	0.24 – 0.29
Chemostatisch, Glucose-limitiert	Alt	0.25
Chemostatisch P-, S-limitiert	P-lim, S-lim	0.27
Turbidostatisch	Normal, Acetat	0.27

Tabelle 4.3: Der Zellertrag $Y_{x/s}$ unter verschiedenen Kulturbedingungen
Wachsende Zellen mit Leucinbildung; Medien s. Tab. 3.2 und 3.5

Teil der Energie gewonnen wird und die für die Leucinbildung entscheidende NADPH-liefernde Reaktion liegt. Gröger (1986) hatte festgestellt, daß für die Leucinbildung doppelt so viel Acetat wie Glucose benötigt wird. Zwei Mol Lactat bzw. Acetat sind in etwa gleichwertig mit einem Mol Glucose. Die molare Menge an diesen Säuren wurde daher durch zwei dividiert und der unverbrauchten Glucosemenge zugeschlagen.

Wie Tabelle 4.3 zeigt, ist der Zellertrag $Y_{x/s}$ weitgehend unabhängig von den Kulturbedingungen.

4.1.1.2.2. Molarer Ausbeutekoeffizient $Y_{L/s}'$ [molLeu/molGlu]

Dieser Wert gibt die gebildeten Mole Leucin pro Mol verbrauchte Glucose an.

Wachsende Zellen

Der molare Ausbeutekoeffizient betrug bei Schüttelkolbenversuchen generell $Y_{L/s}' = 0.4$ mol/mol. Der gleiche Wert wurde in kontinuierlicher Kultur im Chemostaten (leicht limitiertes Wachstum) und im Turbidostaten (unlimitiertes Wachstum) ermittelt. Temperaturänderungen und Acetatmedium hatten keinen signifikanten Einfluß auf $Y_{L/s}'$.

Stark wachstumsgehemmte bzw. ruhende Zellen

Unter Wachstumsbedingungen wird ein Teil der Glucose zur Synthese neuer Zellmasse und für den Energiestoffwechsel verwendet. Da aber der Zellertrag $Y_{x/s}$ bei Zugabe von α -Ketoisocapronsäure absinkt, wird offensichtlich ein weiterer, zusätzlicher Anteil zur Leucinbildung benötigt. Diese Annahme hat folgenden biochemischen Hintergrund:

Zur Bildung von Leucin muß vom Stoffwechsel der Mikroorganismen Glutamat bereitgestellt werden (s. Kap. 2.1.). Dieser Aminosäure kommt eine Schlüsselrolle bei der Synthese von Proteinen zu. Das Wachstum und die Leucinbildung konkurrieren demnach um die Syntheseleistung für das Glutamat. Ein zusätzlicher Bedarf bedingt einen zusätzlichen Verbrauch an Glucose. Der Wert von $Y_{L/s}'$ bei wachsenden Zellen ist daher gegenüber dem von ruhenden Zellen um den Glucoseverbrauch für das Zellwachstum erniedrigt.

Bei dem in Abb. 4.2 dargestellten Schüttelkolbenversuch wurde Medium B (s. Tab. 3.2) mit den auf der Abszisse angegebenen Phosphatkonzentrationen angesetzt. Es ist zu erkennen, daß unterhalb einer anfänglichen PO_4 -Menge von etwa 1.5 mM das Wachstum infolge des P-Mangels abnimmt. Im gleichen Maße steigt der molare Ausbeutekoeffizient $Y_{L/s}'$ von etwa 0.4 mol/mol aus an (s. Abb. 4.2a). (Die anaeroben Stoffwechselprodukte wurden in der oben beschriebenen Art und Weise bei der Berechnung von $Y_{L/s}'$ mit berücksichtigt.) Die Erhöhung von $Y_{L/s}'$ scheint proportional zur Wachstumshemmung zu sein.

Tabelle 4.4 faßt die in verschiedenen Versuchen mit stark wachstumslimitierten bzw. ruhenden Zellen gewonnenen Daten zusammen. Der theoretische Wert wurde unter der Annahme berechnet, daß der Glucoseverbrauch der Zellen für das Wachstum einerseits und für die Leucinbildung andererseits unabhängig voneinander sind und sich zum Gesamtverbrauch addieren. Er stimmt mit den experimentell gefundenen Daten in etwa überein und bekräftigt damit die oben gemachte Annahme.

Der molare Ausbeutekoeffizient $Y_{L/s}'$ liegt bei Zellen mit sehr geringem Wachstum bei Werten um 0.9 mol/mol und erreicht bei absolut ruhenden Zellen etwa 1.3 mol/mol. Von der Stöchiometrie des Stoffwechsels her müßten eigentlich 2 Mol Leucin pro Mol Glucose gebildet werden (s. Kap. 2.1.6.). Der Unterschied zwischen diesem und den gemessenen Werten ist vermutlich auf NADPH-Verluste durch noch stattfindende Biosynthese oder Verwertung in der Atmungskette der Mikroorganismen zurückzuführen. In Abb. 4.3 sind die molaren Ausbeutekoeffizienten $Y_{L/s}'$, die sich unter den verschiedenen Kulturbedingungen ergeben, zusammenfassend dargestellt.

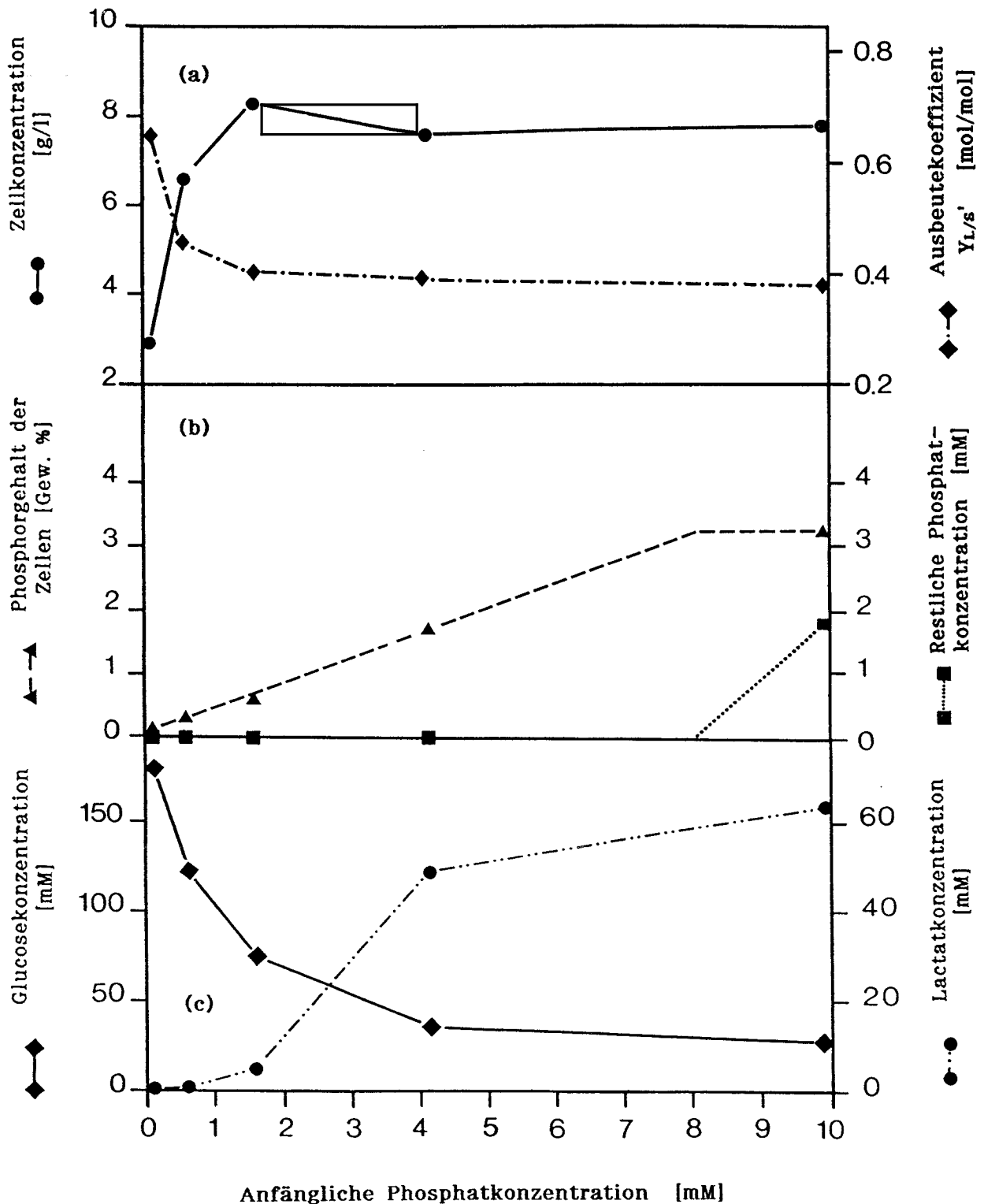


Abb. 4.2: Der Einfluß der Phosphat-Konzentration im Medium auf Wachstum und Stoffwechsel

(a): Wachstum (Zellkonzentration) und molarer Ausbeutekoeffizient $Y_{L/s}$

(b): Phosphorgehalt der Zellen und restliche Phosphatkonzentration (s. Kap. 4.1.2.4.2.)

(c): Glucose- und Lactatkonzentration (s. Anhang A.7)

Schüttelkolben mit Medium B (s. Tab. 3.2) + 200 mM MOPS-Puffer, aber mit anfänglichen Phosphat-Konzentrationen, wie auf der Abszisse angegeben. Inkubationszeit 28 h

Zellmaterial	Wachstum (qualitativ)	$Y_{L/s}'$ [mol/mol]
Normal wachsend	un- bzw. leicht limitiert	0.4
2 - 4 Tage ohne PO_4^1	sehr gering	0.7 - 0.85
Tetracyclin behandelt ²	sehr gering	~0.85
Hoher osmotischer Druck ³	sehr gering	0.96
Rifampicin behandelt ²	kein	~1.0
Metall- und P-limitiert ⁴	sehr gering	1.01 - 1.5
11 - 15 Tage ohne PO_4^1	kein	1.07 - 1.52
Theoretisch berechnet ⁵	kein	1.38

Tabelle 4.4: Molarer Leucin-Ausbeutekoeffizient $Y_{L/s}'$ von stark wachstumslimitierten bzw. ruhenden Zellen

¹: Batch-Versuche im Festbettreaktor (s. Kap. 3.4.1.) mit 100 ml Produktionsmedium A (s. Tab. 3.4)

²: s. Tab. 4.11; S. 88

³: s. Kap. 4.1.2.3.

⁴: Werte von Gröger (1986)

⁵: Berechnet aus $Y_{L/s}'$ (wachsende Zellen), $Y_{x/s}$ (mit Leucinbildung) und $Y_{x/s}$ (ohne Leucinbildung); siehe Anhang A.8

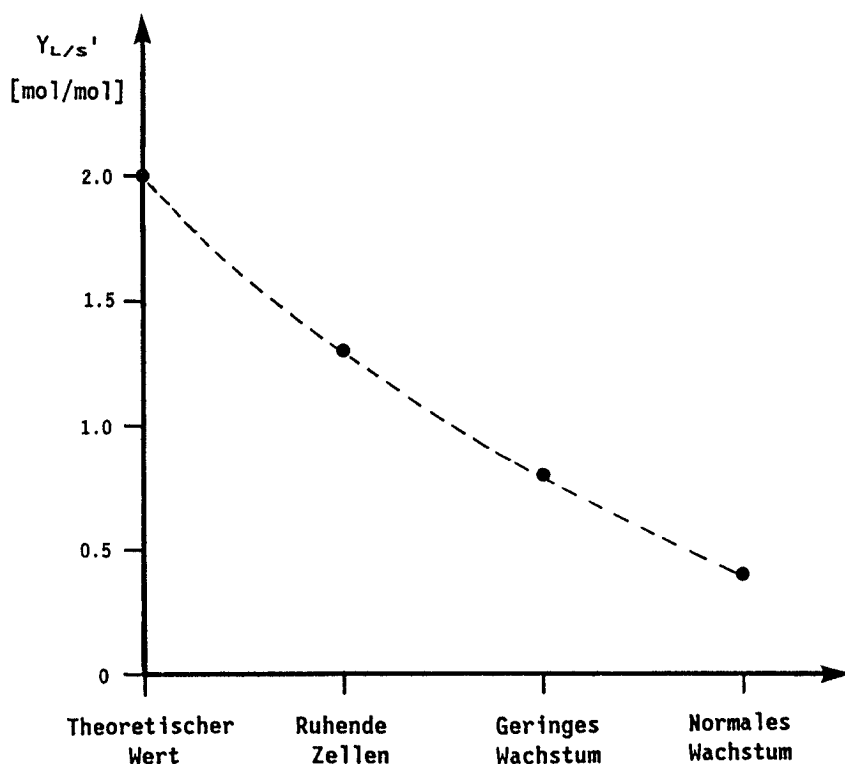


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des molaren Ausbeutekoeffizienten $Y_{L/s}'$ in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen

4.1.1.2.3. Molarer Ausbeutekoeffizient $Y_{L/K'}$ [molLeu/molKet]

Der molare Ausbeutekoeffizient (oder Selektivität) $Y_{L/K'}$ gibt die gebildeten Mole Leucin pro Mol verbrauchte α -Ketoisocapronsäure an.

Ein Wert von etwa $Y_{L/K'} = 0.95$ mol/mol wurde generell bei allen durchgeführten Versuchen gefunden. Die Ketosäure wird also fast vollständig zum gewünschten Produkt umgewandelt. Nebenprodukte (s. Kap. 4.1.3.2.) und Einbau in die Zellmasse spielen mengenmäßig keine große Rolle.

4.1.1.2.4. Ausbeutekoeffizient Y_{X/O_2} [gTS/gO₂]

Dieser Wert gibt den auf Sauerstoff als Substrat bezogenen Zellertrag an. Er wurde in einer kontinuierlichen Fermentation im Rührkesselfermenter mit $Y_{X/O_2} = 0.55$ gTS/gO₂ bestimmt. Er ist im Vergleich zu 0.68 gTS/gO₂, der sich aus $Y_{X/S}$ (Wachstum ohne Leucinbildung) abschätzen läßt, und zu Literaturwerten für Wachstum auf Kohlenhydraten von etwa 0.85 - 1.50 gTS/gO₂ (Bailey und Ollis, 1986) relativ niedrig. Daraus kann man schließen, daß neben den Aufwendungen für das Wachstum der Zellen, zusätzlich Glucose und zu ihrer Oxidation Sauerstoff für die Leucinbildung verbraucht werden (s.o.).

Zellen und Kulturbedingung	$Y_{X/S}$ [g/g]	$Y_{L/S'}$ [mol/mol]	$Y_{L/K'}$ [mol/mol]	Y_{X/O_2} [g/g]
Wachsende Zellen ohne Leucinbildung	0.38	–	–	~0.68
Wachsende Zellen mit Leucinbildung	0.27	0.4	0.95	0.55
Ruhende Zellen mit Leucinbildung	–	1.3	0.95	–

Tabelle 4.5: Zusammenstellung der Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$, $Y_{L/S'}$, $Y_{L/K'}$ und Y_{X/O_2} bei verschiedenen Kulturbedingungen

$Y_{X/S}$ (gebildete Zellmasse/verbrauchte Glucose), $Y_{L/S'}$ (gebildetes Leucin/verbrauchte Glucose), $Y_{L/K'}$ (gebildetes Leucin/verbrauchte Ketosäure) und Y_{X/O_2} (gebildete Zellmasse/verbrauchter Sauerstoff). Die Werte beziehen sich auf 30°C, pH 7.2 - 7.5

4.1.1.3. Kinetische Größen

Die kinetischen Daten der Leucinbildung aus α -Ketoisocapronsäure wurden noch nicht systematisch vermessen, da *C. glutamicum* in den bisherigen Medien nicht stabil fermentiert werden konnte. Mit den in Kap. 4.1.3. beschriebenen Medienoptimierungen können die Zellen jetzt in kontinuierlicher Kultur gehalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch keine exakten kinetischen Messungen mehr durchgeführt. In diesem Kapitel werden daher Anhaltswerte für eine Modellierung (s. Kap. 4.4.) angegeben, die am Ende in Tabelle 4.8 (s. S. 74) zusammengefaßt sind.

4.1.1.3.1. Maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$

Die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ reagiert empfindlich auf Änderungen im Medium und in den Kulturbedingungen. Gröger (1986) gibt für Medium ohne α -Ketoisocapronsäure einen Wert von $\mu_{\max} = 0.64/\text{h}$ an. Bei Zugabe von α -Ketoisocapronsäure ist die maximale Wachstumsrate stark erniedrigt. Weiterhin wachstumshemmend wirken sich ungenügende O_2 -Versorgung und hoher osmotischer Druck aus (s. Kap. 4.1.2.3.). Die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ in kontinuierlicher Kultur (Medien Tab. 3.5) wurde mit etwa $0.11/\text{h}$ bestimmt.

4.1.1.3.2. Spez. Produktbildungsrate oder spez. Produktivität p' [mmolLeu/gTS/h]

Diese Größe gibt die molare Menge Leucin an, die pro g Zellmasse (Trockensubstanz) in einer Stunde gebildet wird. Bei Batch-Versuchen muß die mittlere Zellmasse als Bezugsgröße eingesetzt werden. Je nach Wachstumsverlauf wird ein geometrisches oder logarithmisches Mittel gewählt.

Wachsende Zellen

In Schüttelkolbenversuchen wurden Werte von $p' = 0.65 - 1.1 \text{ mmol/gTS/h}$ innerhalb der ersten 15 h ermittelt. In chemostatisch, Glucose-limitierter Kultur und in turbidostatischer Kultur ergab sich bei kurzen Verweilzeiten ein Wert von etwa $p' = 0.85 \text{ mmol/gTS/h}$.

Stark wachstumsgehemmte bzw. ruhende Zellen

Bei ruhenden Zellen wird die sonst für das Wachstum eingesetzte Stoffwechselleistung nicht mehr benötigt. Es war zu prüfen, ob die dadurch frei gewordene Kapazität zu einer Erhöhung der spez. Produktbildungsrate führt.

Tabelle 4.6 zeigt einen Vergleich zwischen normal wachsenden Zellen und solchen, die durch Phosphor, Schwefel oder Kalium limitiert sind (s. OD_{600}). Die Kalium-Limitierung wurde untersucht, da von Tempest und Neijssel (1980) bekannt war, daß ein Kalium-Mangel zu einem erhöhten Energiestoffwechsel der Mikroorganismen führt. Diese versuchen die lebenswichtige hohe Kalium-Konzentration in den Zellen ($>50 \text{ mM}$) mit Hilfe ihrer aktiven Transportmechanismen, die ATP benötigen, aufrechtzuerhalten. Ein erhöhter Energiestoffwechsel müßte zu einer gesteigerten NADPH-Produktion führen und damit die Leucinbildung günstig beeinflussen.

Die spez. Produktbildungsrate p' läßt in Tabelle 4.6 trotz der verschiedenen physiologischen Bedingungen keine großen Unterschiede erkennen. Die K-limitierten Zellen weisen erwartungsgemäß einen erhöhten Glucose-Verbrauch auf (unter Berücksichtigung der gebildeten Zellmasse), produzieren aber nicht mehr Leucin.

Bei dem in Tabelle 4.12 (s. S. 92) wiedergegebenen Versuch wurden die Mikroorganismen durch Antibiotika zum Ruhen gebracht. Es ergeben sich keine Unterschiede in der spez. Produktbildungsrate. Der Glucoseverbrauch korrespondiert mit dem Wachstum.

Medium ¹	OD ₆₀₀	spez. Produkt- bildungsrate [mmol/gTS/h]	spez. Glucose- verbrauchsrate [mmol/gTS/h]
B	41.0	0.63	1.52
C (ohne PO ₄)	24.4	0.69	1.12
D (ohne S)	17.5	0.64	1.27
B (ohne K) ²	19.6	0.61	1.58

Tabelle 4.6: Der Einfluß von reduziertem Wachstum auf die spezifische Produktbildungsrate und Glucoseverbrauchsrate

¹: Medien s. Tab. 3.2 mit 200mM MOPS-Puffer; ²: Medium B ohne KH₂PO₄, aber mit 10 mM NaH₂PO₄. Die Inkubationszeit betrug 28 h.

p' ist ebenfalls unabhängig von der Wachstumsrate, wenn die Zellen durch erhöhte Temperaturen zum Ruhen gebracht wurden (s. Abb. 4.6; S. 77).

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß nicht die Lieferung von NADPH bzw. Glutamat den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, sondern daß andere Mechanismen die spez. Produktbildungsrate kontrollieren (s. Kap. 4.1.4).

Abhängigkeit von der (mittleren) Verweilzeit

Generell war festzustellen, daß die spez. Produktbildungsrate im Laufe einer Batch-Kultur sowohl bei wachsenden (s. Abb. 4.6; S. 77) als auch ruhenden Zellen (s. Abb. 4.10; S. 83) abnimmt. Die gleichen Rückschlüsse lassen sich aus Ergebnissen von Gröger (1986) ableiten. Nach einem Mediumwechsel wird die anfängliche hohe spez. Produktbildungsrate des ersten Ansatzes wieder erreicht (s. Abb. 4.10). Auch in kontinuierlicher Kultur konnte ein Abfallen von **p'** bei mittleren Verweilzeiten > 10 h beobachtet werden, was nicht auf eine Substratlimitierung zurückzuführen war. Dieses Verhalten ist unabhängig vom Zustand der Zellen und scheint nur vom Alter des Ansatzes bzw. von der Kontaktzeit der Zellen mit dem Medium beeinflußt zu werden. Nach den Ergebnissen von Gröger (1986) ist eine Produktinhibierung auszuschließen. Der Grund für das Abfallen der spez. Produktbildungsrate konnte experimentell nicht geklärt werden (s.a. Kap. 4.1.4.).

4.1.1.3.3. Spez. Sauerstoffaufnahme q [mmol/gTS/h]

Der kritische pO₂, bei dem die Zellen nicht mehr genug Sauerstoff aufnehmen können und dann z.T. auf einen anaeroben Stoffwechsel übergehen, wurde in einem Rührkesselreaktor untersucht. Der pO_{2,krit} liegt sehr niedrig und kann mit einer pO₂-Elektrode nicht exakt erfaßt werden. Herausragendes Merkmal für O₂-Mangel ist die Lactatbildung. Bei einer kontinuierlichen Fermentation zeigte sich bei einem pO₂ von 4.2 % Luftsättigung noch kein Lactat, während bei 1.2 - 1.7 % organische Säuren im Medium nachweisbar waren. Die Bestimmung der O₂-

Aufnahmerate in einer Sauerstoffmeßzelle (s. Kap. 3.2.8.) zeigt einen konstanten Verbrauch bis zu einem pO_2 von etwa 1 %. Hirose und Shibai (1980b) haben für Aminosäure-Fermentationen generell extrem kleine kritische Sauerstoffkonzentrationen ermittelt.

Nach den experimentellen Befunden und nach der Interpretation des Stoffwechsels müssen die Kulturen zur optimalen Leucinbildung aus α -Ketoisocapronsäure ausreichend begast werden. Für die Leucinbildung aus Glucose hingegen ist eine suboptimale O_2 -Versorgung als vorteilhaft erkannt und theoretisch belegt worden (Akashi et al., 1977).

Die Bestimmung der spez. O_2 -Aufnahmerate wurde nach drei verschiedenen Methoden versucht:

- 1) Dynamische Messung im Fermenter. Die Luftversorgung wird schlagartig abgestellt und der Abfall des pO_2 -Elektrodensignals aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgt entsprechend Kap. 3.2.8. nach (Gl. 3.5), allerdings ohne Berücksichtigung einer Zell-Verdünnung.
- 2) Auswertung der Daten der Gasanalytik (s. Kap. 3.4.2.)
- 3) Externe Bestimmung in einer Sauerstoffmeßzelle (s. Kap. 3.2.8)

Die folgende Aufstellung gibt die Ergebnisse von parallel durchgeführten Vergleichsmessungen mit dem gleichen Zellmaterial nach allen drei Methoden wieder. Es sind beträchtliche Unterschiede zu erkennen:

Methode	Medium	q [mmol/gTS/h]
1)	Fermenterinhalt (Medium Alt)	0.8
2)	Fermenterinhalt (Medium Alt)	5.1
3)	Medium Alt (s. Tab. 3.5)	6.6
	Vollmedium (s. Tab. 3.1)	8.8

Die erste Methode erwies sich als unbrauchbar. Die Abfallkurven des pO_2 -Signals flachten bereits bei 30 % Luftsättigung ab, also weit vor der kritischen Konzentration von etwa 1 %. Offenbar kommt es nach dem Abschalten der Belüftung zu anhaltendem Sauerstoffeintrag ins Medium durch nur langsam aufsteigende Luftblasen. Die zweite und dritte Methode zeigen eine gewisse Übereinstimmung, solange mit dem gleichen Medium gearbeitet wird.

Um den Einfluß des Mediums auf die Sauerstoffaufnahmerate zu untersuchen, wurde eine Meßreihe nach Methode 3) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 als relative Änderung der Sauerstoffaufnahmerate im Vergleich zu einem Bezugsmedium angegeben.

Medium	Relative Sauerstoffaufnahme [%]
(a) X	100
X + 50 bis 250 mM Na-Acetat	134
X jedoch ohne Glucose + 50 mM Na-Acetat	130
X + 100 mM Ketosäure	90
X + 50 mM Na-Acetat + 50 mM Ketosäure	126
X + 100 mM NaCl	100
X + 510 mM NaCl	84
Vollmedium (s. Tab. 3.1)	135
Gasbilanz Fermenter	120
(b) Normal	100
Acetat	133 - 164
Reaktorfiltrat	166

Tabelle 4.7: Relative Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit von der Mediumzusammensetzung

(a): Messung in Sauerstoffmeßzelle mit Medium X: 20 g Glucose, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g KH_2PO_4 , 10 ml Spurenelementelösung A (s. Tab. 3.3) auf 1 l, mit Zusätzen, wie angegeben. Im Vergleich Ergebnisse der Gasbilanz des Rührkesselfermenters, aus dem das Zellmaterial entnommen wurde.

(b): Messung in Sauerstoffmeßzelle mit frischen Medien (entsprechend Tab. 3.5) und Mediumfiltrat des Reaktors, aus dem das Zellmaterial entnommen wurde.

Aus Tabelle 4.7a ist zu erkennen, daß Acetat wie auch Komplexanteile (Vollmedium) die Sauerstoffaufnahme steigern. α -Ketoisocaproinsäure (Ketosäure) und sehr hohe Ionenkonzentrationen üben einen hemmenden Einfluß auf die Atmung aus. Die Werte der Gasbilanz sind vergleichsweise leicht erhöht.

Tabelle 4.7b zeigt das gleiche Bild in Bezug auf Acetatanteile im Medium. Die hohen Werte ergaben sich bei Zellen, die längere Zeit unter Sauerstoff-Limitierung gestanden hatten. Die höchsten Atmungsraten wurden im Reaktorfiltrat, also der gewohnten Umgebung der Zellen, gemessen. Eine gegenüber Glucosemedium erhöhte spez. Sauerstoffaufnahme auf Lactat und Acetat wird für *Brevibacterium ammoniagenes* berichtet (Oishi et al., 1970).

Die Sauerstoffaufnahme ist sehr stark vom Medium und von der Vorgeschichte der Mikroorganismen abhängig. Die absoluten Zahlenwerte schwanken entsprechend stark. Mittelwerte lagen um $q = 10$ mmol/gTS/h. Es wurde ein Maximalwert bestimmt von $q_{\text{max}} = 19$ mmol/gTS/h.

Er liegt im Vergleich zu Standardwerten von 4 - 11 mmol/gTS/h (Brown, 1970) sehr hoch. Reiling et al. (1985) haben für das Wachstum von *E. coli* auf Komplexmedium 25 mmol/gTS/h und auf Mineralmedium 9 mmol/gTS/h bestimmt. Hirose et al. (1965) geben für die L-Glutamat-Fermentation eine maximale spez. Sauerstoffaufnahme von umgerechnet etwa 8 mmol/gTS/h an.

Maximale Wachstumsrate [1/h]	0.11 ¹
Spez. Produktbildungsrate [mmol/gTS/h]	0.85 ²
Spez. Glucoseverbrauchsrate [mmol/gTS/h]	~1.5
Spez. Sauerstoffaufnahme [mmol/gTS/h]	~10 (19 ³)

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der kinetischen Parameter

¹: Gültig für Wachstum auf Medien nach Tab. 3.5; ²: Bei kurzen Verweilzeiten in kontinuierlicher Kultur; ³: Maximalwert

4.1.1.4. Bedeutung von CO₂ für das Anwachsen angeimpfter Kulturen

Der ursprünglich in den Medien für die Schüttelkolbenversuche enthaltene Kalk mußte für Versuche mit Glassintermaterial durch eine lösliche Puffersubstanz ersetzt werden. Ohne Kalk wuchsen die angeimpften Kolben jedoch nicht an.

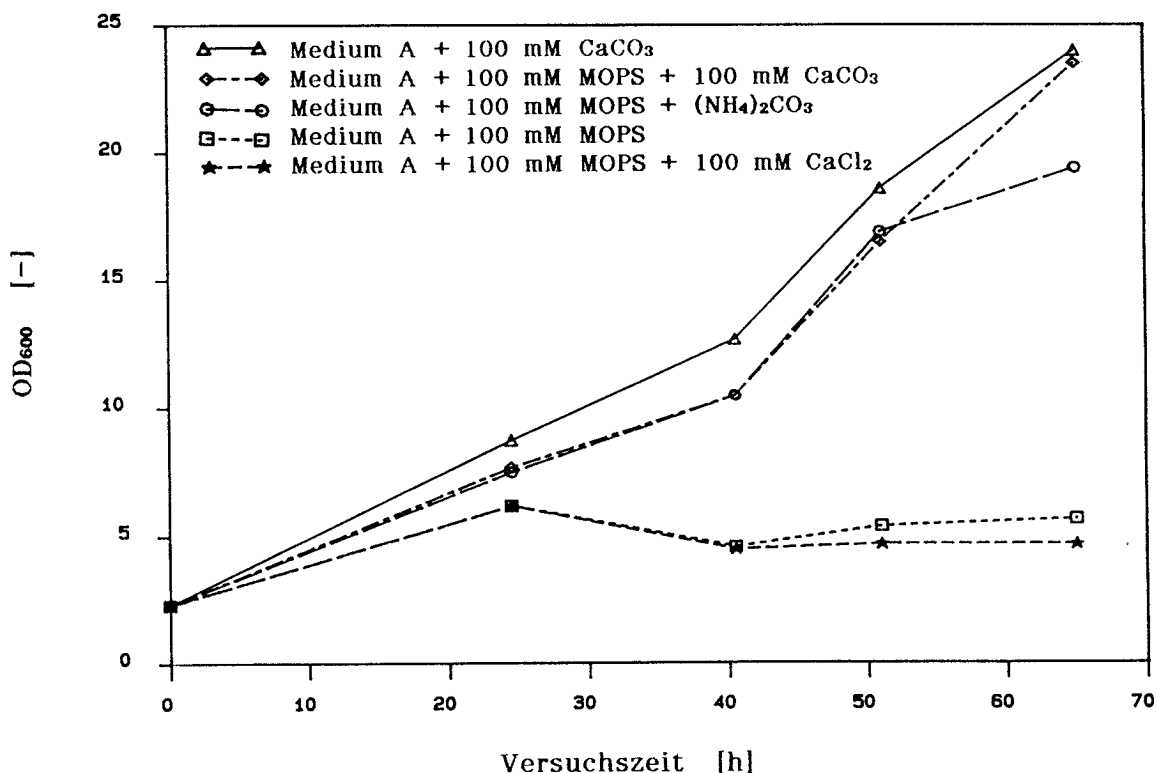


Abb. 4.4: Bedeutung von CO₂ für das Anwachsen angeimpfter Kulturen
 Medium A (s. Tab. 3.2), Supplementierung wie angegeben, Füllvolumen der Schüttelkolben 100 ml

Diese Substanz mußte also neben der Pufferwirkung noch eine weitere, bisher unberücksichtigte Funktion im Medium erfüllen.

Abb. 4.4 zeigt die Ergebnisse eines Schüttelkolbenversuches mit Medium A (s. Tab. 3.2), welches wie angegeben mit Kalk, MOPS-Puffer, CaCl_2 bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ supplementiert worden war. Kulturen, die keine Carbonat-Ionen enthielten, wuchsen nicht an. Die anderen drei Kulturen wiesen hingegen ein übereinstimmend gutes Wachstum auf. Zum Anwachsen der Kulturen ist demnach gelöstes CO_2 bzw. Carbonat erforderlich.

Biochemisch läßt sich der CO_2 -Bedarf in der Anwachsphase der Zellen mit den anaplerotischen Auffüllreaktionen des Citronensäure-Cyclus erklären (s. Kap. 2.1.5.). Kinoshita (1963) wies die Bedeutung dieser CO_2 -fixierenden Reaktionen mit ^{14}C -markiertem Carbonat für coryneforme Bakterien nach. Die Reaktionen werden dann aktiviert, wenn die Mikroorganismen besonders viele organische Grundbausteine für die Biosynthese von Zellmaterial benötigen. Bereits wachsende und metabolisierende Zellen bilden selber ausreichend CO_2 .

Den Medien für die Schüttelkolbenversuche wurde daraufhin 5 g/l Harnstoff zugegeben. *Corynebacterium glutamicum* besitzt eine sehr hohe Urease-Aktivität und kann den Harnstoff in den Zellen hydrolytisch in CO_2 und NH_3 spalten. Der Zusatz von löslichem anorganischen Carbonat zum Medium ist nicht sinnvoll, da durch die Belüftung der Fermentationsflüssigkeit CO_2 ausgetrieben wird und der pH stark ansteigt. Eine detaillierte Untersuchung des CO_2 -Einflusses auf das Anwachsverhalten könnte in einem Fermenter mit pH-Regelung und definiertem CO_2 -Partialdruck im Gas erfolgen.

4.1.2. Optimierung der Kulturbedingungen

Die optimalen Kulturbedingungen sind in Tabelle 4.13 (s. S. 95) zusammengefaßt.

4.1.2.1. Temperatur

Der Einfluß der Temperatur auf *C. glutamicum* wurde sowohl unter dem Aspekt der Produktivitätssteigerung als auch der Wachstumsentkopplung untersucht. Bei hohen Temperaturen ist Leucin außerdem besser löslich.

In Abb. 4.5 ist ein Versuch in einem Temperaturgradienteninkubator (Typ TN-3, Toyo Kagaku Sangyo, Tokyo, Japan) dargestellt. Die Zellen wurden in einem Schüttelkolben mit 100 ml Medium A (s. Tab. 3.2) angezogen, gewaschen und in 200 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Davon wurden je 5 ml (Bei größeren Füllvolumen werden die Ergebnisse durch starke Lactatbildung verfälscht!) in die Inkubationsgläser gegeben und bei Temperaturen zwischen 28 und 45.5°C inkubiert. Es zeigt sich ein abrupter Einbruch des Wachstums bei 39°C. Die spez. Produktbildungsrate bleibt bis etwa 42°C auf hohem Niveau, um dann ebenfalls abzusinken. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist also eine vollständig wachstumsentkoppelte Leucinproduktion bei etwa 40°C möglich.

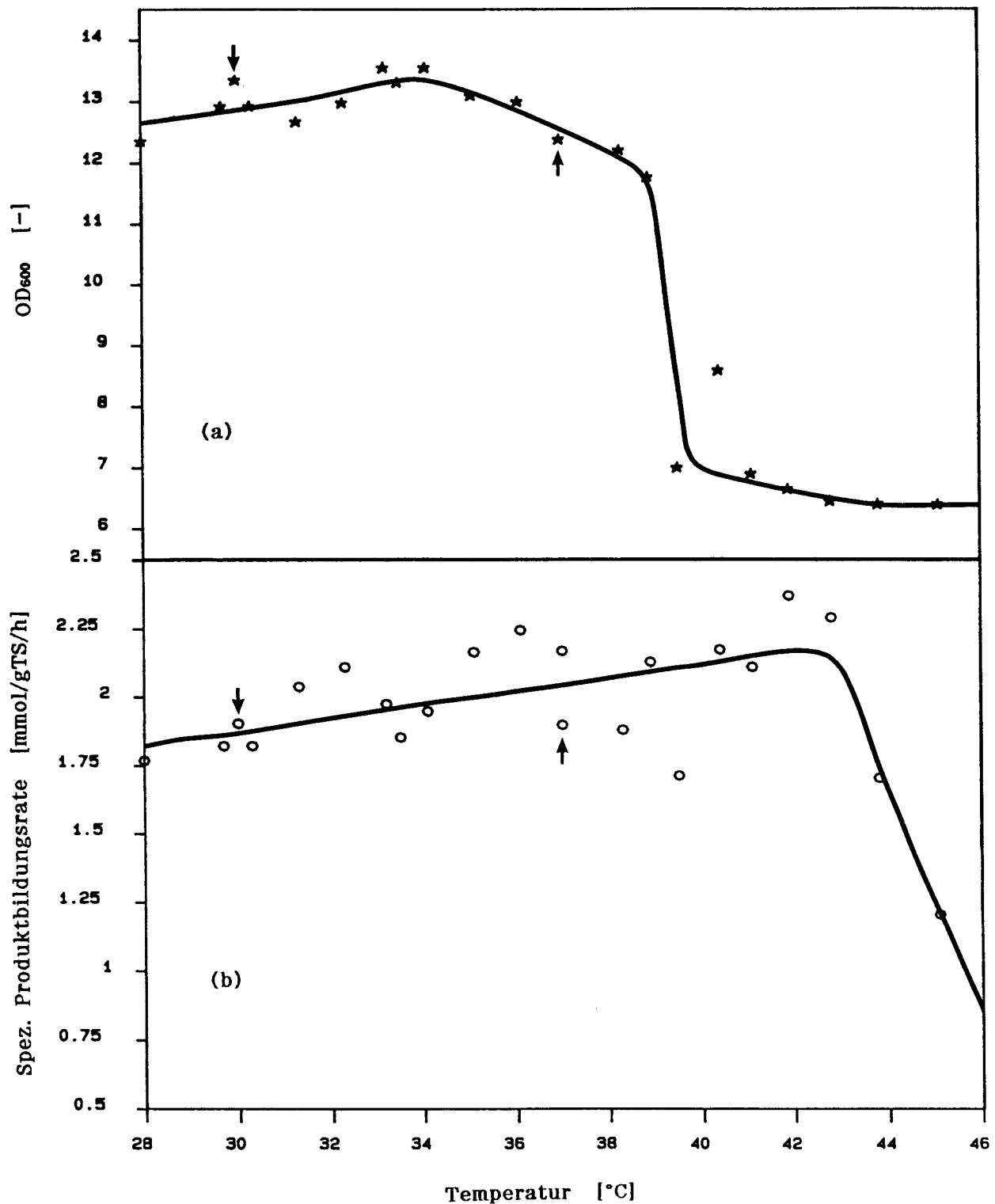


Abb. 4.5: Einfluß der Inkubationstemperatur auf das Wachstum (a) und die spez. Produktbildungsrate (b)
 OD₆₀₀ zu Beginn des Versuches: 7.0. Die markierten Werte (↑) wurden mit dem gleichen Ansatz in Schüttelkolben mit 50 ml Füllung gewonnen. Inkubationszeit 11 h.

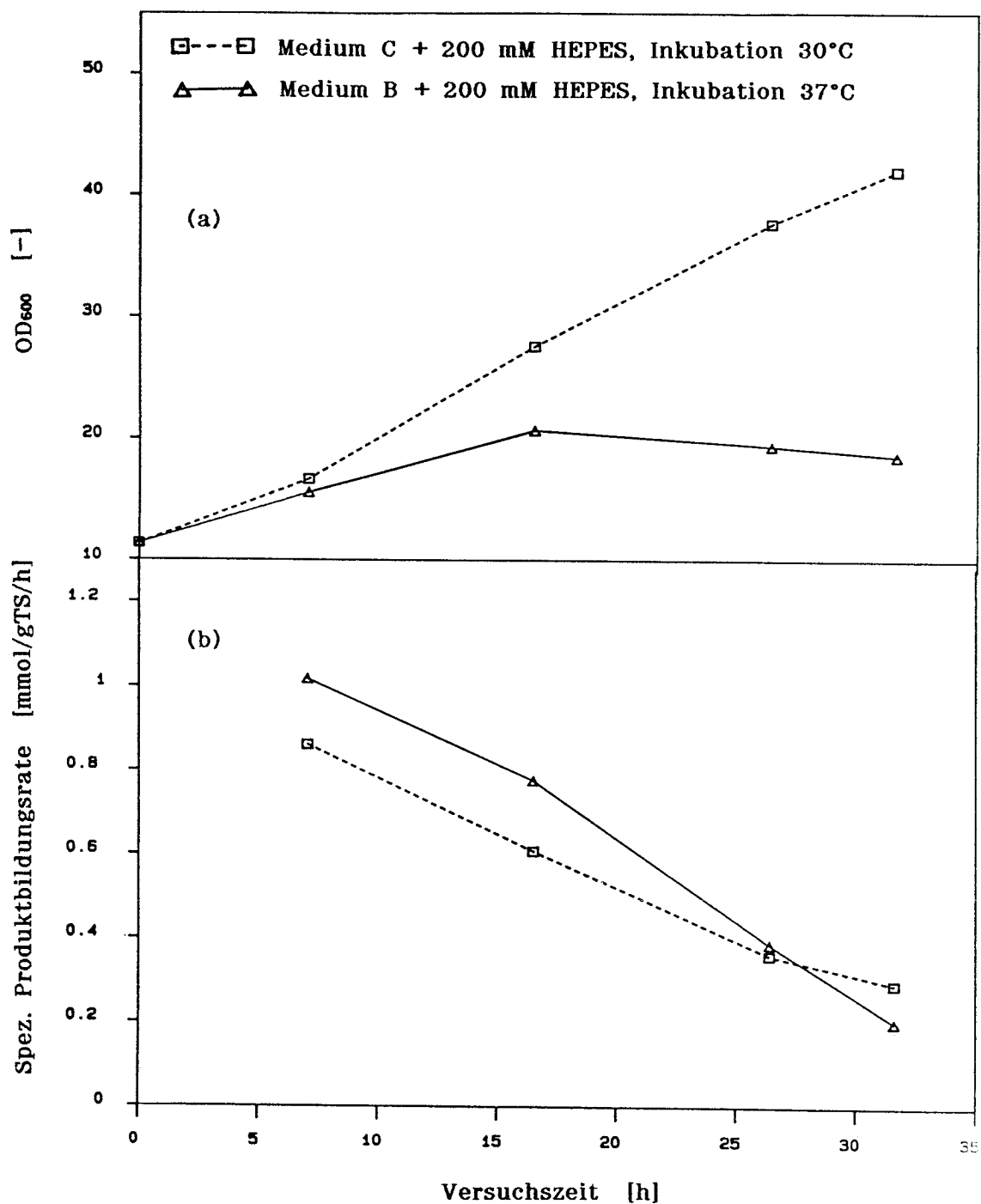


Abb. 4.6: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum (a) und die spez. Produktbildungsrate (b)
Medien s. Tab. 3.2; Die Zellen wurden in Medium B aufgezogen, abzentrifugiert, in Saline aufgenommen und 5 %ig in die angegebenen Medien (pH 8.0) inokuliert (OD₆₀₀ = 11.4).

Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht auf längere Produktionszeiträume übertragen. Die Temperatur wurde daher in mehreren Versuchen stufenweise gesenkt. In Abb. 4.6 zeigt der bei 37°C inkubierte Schüttelkolben in den ersten 11 h noch gutes Wachstum, welches in der Folge jedoch zum Ruhen kommt. Die spez. Produktbildungsrate ist in dem dargestellten Zeitraum noch vergleichbar hoch. Nach Abzentrifugieren und Resuspendieren in frischem Medium war jedoch keine merkliche Aktivität mehr vorhanden. Die Zellen sind bei den hohen Temperaturen offenbar nicht mehr in der Lage, ihren Enzymapparat zu regenerieren.

Die maximale Temperatur, bei der ein Wachstum von *C. glutamicum* gerade noch möglich ist, wurde schließlich in kontinuierlicher Kultur mit etwa 36.8°C ermittelt (s. Abb. 4.39; S. 141). Ein Wert von 37°C wird von Momose und Takagi (1978) für einen Wildstamm von *Brevibacterium lactofermentum* angegeben. Ein signifikanter Einfluß der Temperatur auf Wachstum und Produktbildungsrate (bzw. Raum-Zeit-Ausbeute) konnten in Abb. 4.5 bzw. Abb. 4.39 nicht beobachtet werden. Hilliger et al. (1984) beschreiben allerdings eine deutliche Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit von *C. glutamicum* bei ansteigenden Temperaturen. Gleichzeitig wurde eine Abnahme der L-Lysin-Produktivität auf Grund von Exkretionshemmungen durch Änderungen in der Zellmembran beobachtet (Hänel et al., 1986).

Unter dem für die Immobilisierung wichtigen Aspekt der besseren Sauerstofflöslichkeit bei 30°C wurde diese Temperatur für die weiteren Versuche gewählt.

4.1.2.2. pH-Wert

Coryneforme Bakterien werden üblicherweise bei einem pH von etwa 7.2 - 7.5 kultiviert. Gröger (1986) hatte jedoch in Kurzzeitexperimenten ein scharfes Maximum der spez. Produktbildungsrate bei einem pH-Wert von 8.0 gefunden. Dieser stimmt mit dem pH-Optimum der bisher als limitierend angesehenen Transaminase B überein.

Abb. 4.7 zeigt eine turbidostatisch geregelte Fermentation im Festbettumlaufreaktor mit immobilisierten Mikroorganismen. (Es ist möglich, daß sich die Einflüsse des pH's auf die Physiologie der Zellen und auf die Immobilisierung überlagern.) Während einer Versuchszeit von 16 Tagen wurden 25 Meßwerte aufgenommen. Jeder Betriebspunkt wurde im Laufe der Fermentation mehrmals angefahren und hohe und tiefe pH-Werte abwechselnd eingestellt. Durchflußrate und Raum-Zeit-Ausbeute sind über dem pH der Fermentationsflüssigkeit aufgetragen. Die Durchflußrate (im Turbidostaten proportional zur Wachstumsrate) steigt von pH 6.6 aus deutlich an und läuft oberhalb von 7.4 in ein flaches Plateau (Abb. 4.7a).

In Abb. 4.8 ist die spez. Sauerstoffaufnahme q von frei suspendierten Zellen über dem pH-Wert aufgetragen. q steigt von niedrigen Werten bei pH 6.5 auf ein Maximum zwischen pH 7.7 und 8.0 an. Der Verlauf korreliert gut mit dem der Durchflußrate in Abb. 4.7. Wachstumsrate und Sauerstoffaufnahme sind demnach proportional.

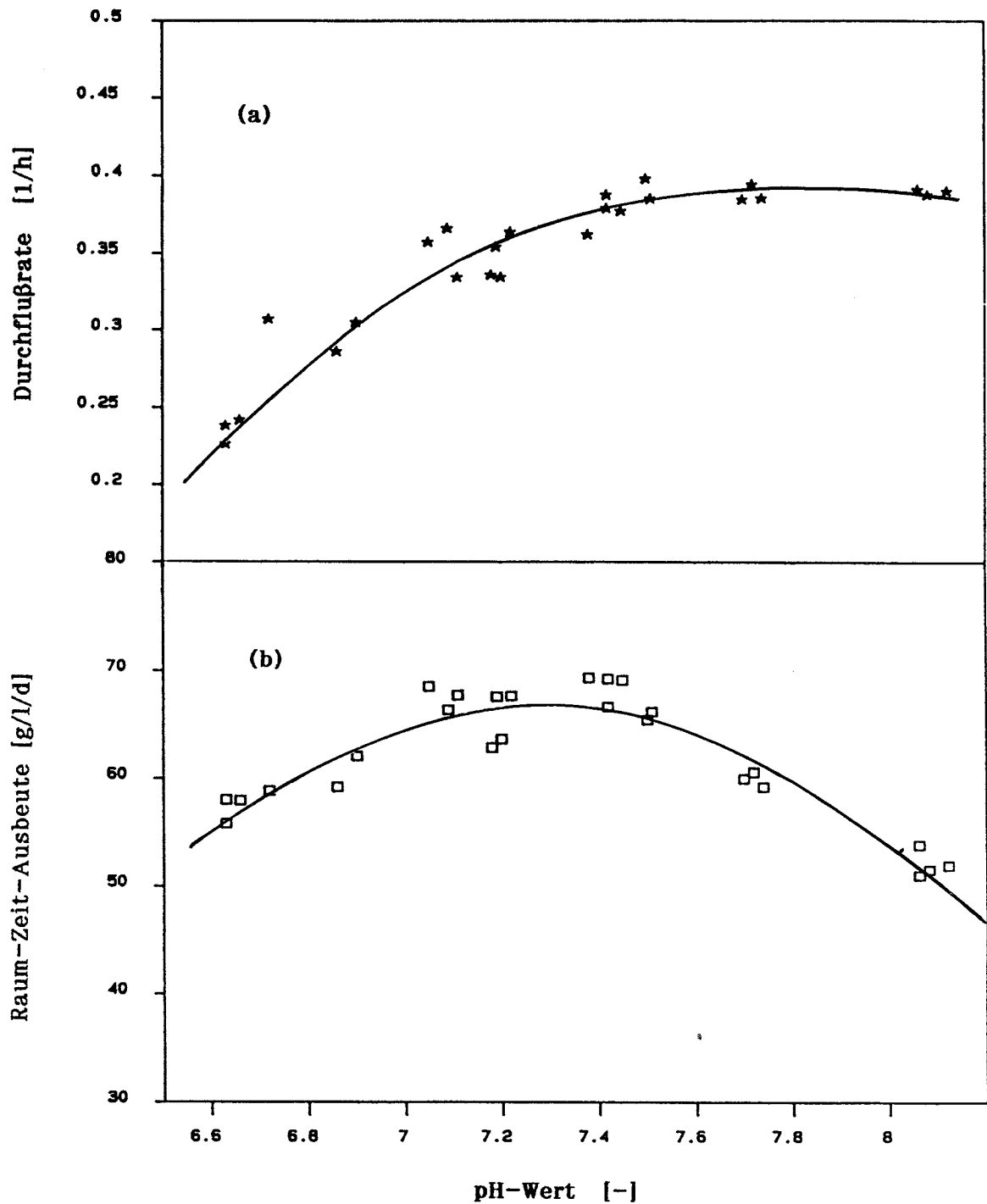


Abb. 4.7: Einfluß des pH-Wertes der Fermentationsflüssigkeit auf Wachstum (a) und Raum-Zeit-Ausbeute (b)
 Kontinuierlicher, turbidostatisch geregelter Festbettumlaufreaktor; Medium Normal (s. Tab. 3.5); jeder Punkt repräsentiert ein Fließgleichgewicht

Die Raum-Zeit-Ausbeute zeigt in Abb. 4.7b ein flaches Optimum bei etwa 7.2 - 7.4 und einen Abfall bei hohen pH-Werten. Man kann davon ausgehen, daß sich die Menge der immobilisierten Biomasse mit dem pH nicht ändert und daher die Raum-Zeit-Ausbeute proportional zur spez. Produktbildungsrate ist. Der Verlauf der in Abb. 4.7b dargestellten Raum-Zeit-Ausbeute widerspricht daher den Ergebnissen von Gröger (1986). Offenbar lassen sich die in Kurzzeitexperimenten gemachten Ergebnisse nicht auf kontinuierliche Kulturen übertragen.

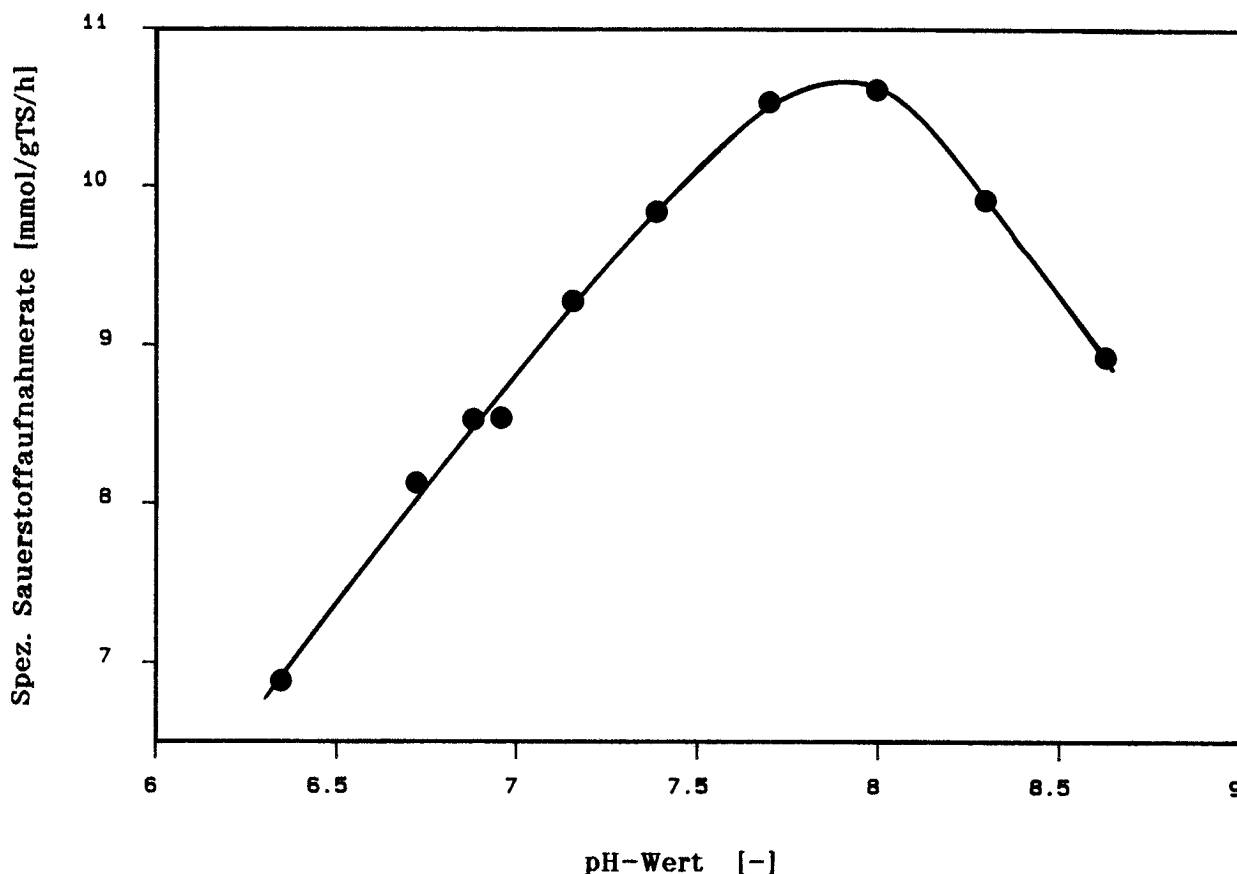


Abb. 4.8: Einfluß des pH-Wertes auf die Sauerstoffaufnahme

Messung in Sauerstoffmeßzelle mit Medium Normal (s. Tab. 3.5), welches auf pH-Werte, wie angegeben, eingestellt wurde. Zellmaterial aus kontinuierlicher Fermentation ($pO_2 = 15\%$)

4.1.2.3. Osmotischer Druck

Beim Einsatz von löslichen pH-Puffern wurde ein schlechteres Wachstum festgestellt als mit Kalk. Der gleiche Effekt trat bei Zugabe von NaCl zum Medium auf (s. Anhang A.9). Es wurde daher untersucht, ob die Wachstumshemmung durch spezifische Mechanismen oder durch die osmotische Wirkung der zugegebenen Substanzen zustande kommt.

Für den osmotischen Druck π_0 kann man in erster Näherung die Gleichung von van't Hoff (Hummel, 1983) ansetzen:

$$\pi_0 = C_{\text{Ges}} \cdot T \cdot R \quad [\text{bar}] \quad (\text{Gl. 4.1})$$

mit C_{Ges} = Konzentration aller Teilchen in der Flüssigkeit [mol/l]

T = Absolute Temperatur [K]

R = Gaskonstante: 0.08314 l·bar/mol/K

π_0 ist proportional zur Teilchenzahl im Medium und unabhängig von Art und Molekulargewicht der Teilchen. Bei dissoziierenden Substanzen muß mit der Anzahl der entstehenden Ionen gerechnet werden.

In Abb. 4.9a ist das Wachstum (OD_{600}) über dem osmotischen Druck des Mediums zu Beginn des Versuches aufgetragen. Der osmotische Druck wurde mit den angegebenen Zusätzen eingestellt. Es ergibt sich eine eindeutige Korrelation. Lediglich der Wert für die Kultur, welche zusätzlich Ketosäure enthielt, fällt etwas heraus. Die spez. Produktbildungsrate zeigt ein deutliches Maximum (s. Abb. 4.9b). Sie ist auffällig erhöht, wenn zusätzliche Ketosäure vorgelegt wird.

Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren Versuch reproduziert. Bei einem osmotischen Druck von 90 bar kam die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen zum Erliegen. Der molare Ausbeutekoeffizient $Y_{L/s'}$ wies eine der Wachstumshemmung umgekehrt proportionale, ansteigende Tendenz auf (vergleiche Abb. 4.2a; S. 67). Bei einem osmotischen Druck von 65 bar wurde $Y_{L/s'} = 0.96$ mol/mol ermittelt.

Um auszuschließen, daß der osmotische Druck indirekt durch das verminderte Wachstum auf die spez. Produktbildungsrate wirkt, wurden Untersuchungen mit ruhenden Zellen durchgeführt. Abb. 4.10 zeigt zwei Batch-Versuche mit Mikroorganismen, deren Wachstum durch Phosphormangel annähernd zum Stillstand gekommen war. Die spez. Produktbildungsrate fällt jeweils in der typischen Weise im Laufe des Versuches ab (s. Kap. 4.1.1.3.2.). Zu den markierten Zeiten wurden Ketosäure- bzw. KCl-Lösungen zugesetzt. In jedem Fall wird ein deutlicher Wiederanstieg der spez. Produktbildungsrate verzeichnet. Es ist bemerkenswert, daß der Anstieg bei Zugabe der Ketosäure zeitverzögert nach 10 - 20 h erfolgt.

Ein Abfallen der Wachstumsrate bei ansteigendem osmotischen Druck wird bei Mikroorganismen häufig beobachtet. Diese versuchen die ungünstigen osmotischen Bedingungen durch eine Erhöhung des internen Aminosäure-Spiegels auszugleichen. Bei Gram-positiven Bakterien spielt besonders Prolin, aber auch Glutamat eine entscheidende Rolle (Measures, 1975). Kitano et al. (1972) finden eine 9-fach erhöhte Glutamatmenge in *Brevibacterium thiogenitalis* Zellen, die mit 2 M NaCl-Lösung anstatt mit Wasser gewaschen wurden. Es ist möglich, daß die hier dargestellten Änderungen der spez. Produktbildungsrate mit einer osmotisch induzierten Anhebung des Aminosäurespiegels in den Zellen in Zusammenhang stehen. Die ungewöhnlich hohe Leucinbildung bei zusätzlich eingesetzter Ketosäure in Abb. 4.9 und der zeitverzögerte Anstieg der spez. Leucinbildungsrate in Abb. 4.10 weisen auf Transportlimitierungen hin (s. Kap. 4.1.4.).

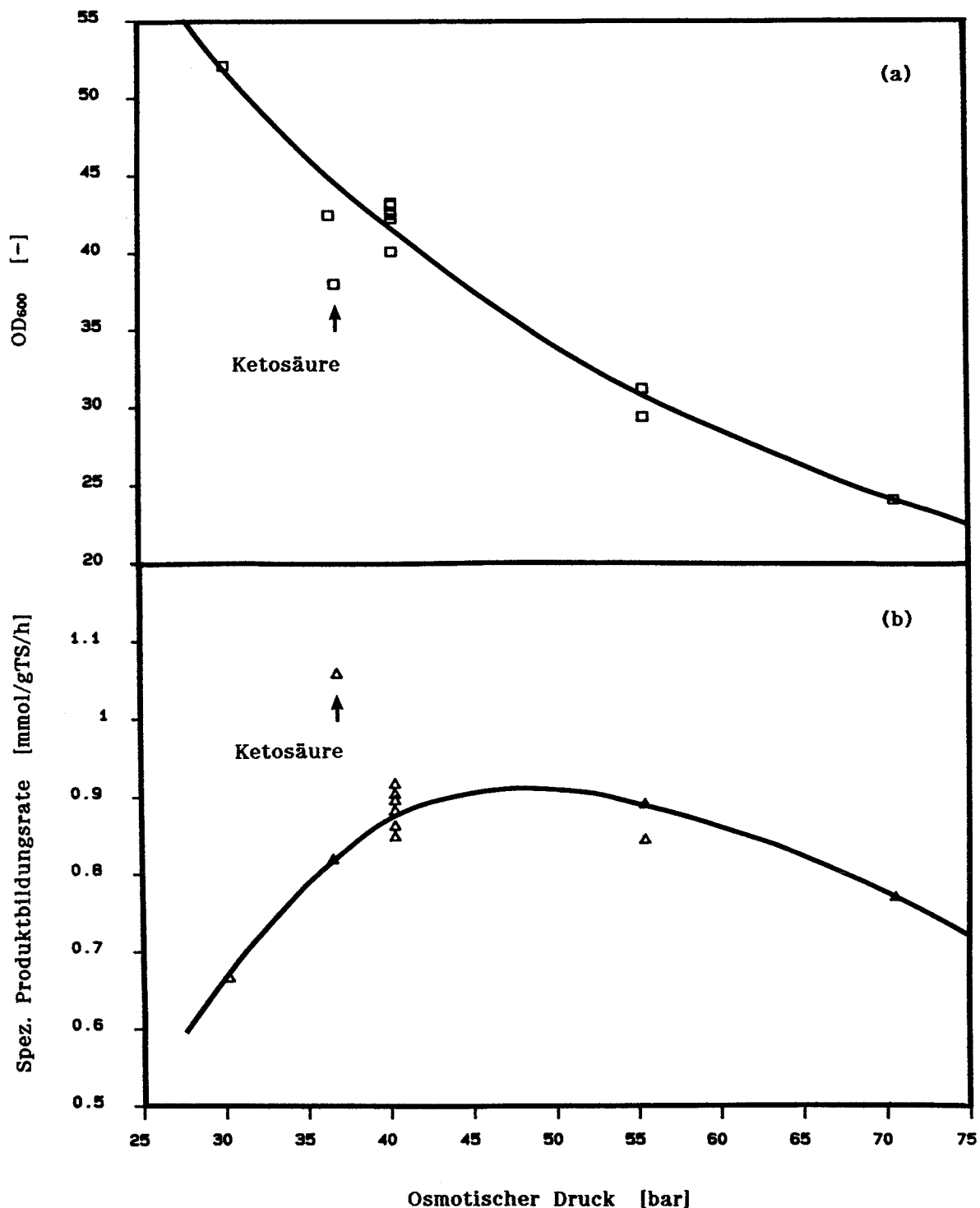


Abb. 4.9: Einfluß des osmotischen Druckes auf Wachstum (a) und spez. Produktbildungsrate (b)

Die Zellen wurden in Medium B (Tab. 3.2) und 180 mM MOPS-Puffer aufgezogen, gewaschen und in Medium C mit 180 mM HEPES-Puffer (pH 8.0) resuspendiert ($OD_{600} = 13.8$). Diesem Medium wurde zur Erhöhung des osmotischen Druckes wahlweise zugegeben: 200 mM NaCl, KCl oder NH_4Cl , 500 mM NaCl oder KCl, 800 mM NaCl, 133 mM K_2SO_4 , Na_2SO_4 oder $(NH_4)_2SO_4$, 131 mM Ketosäure oder 250 mM Glucose. Berechnung des osmotischen Druckes nach (Gl. 4.1). Osmotischer Druck für Medium ohne Zusätze: 30.2 bar

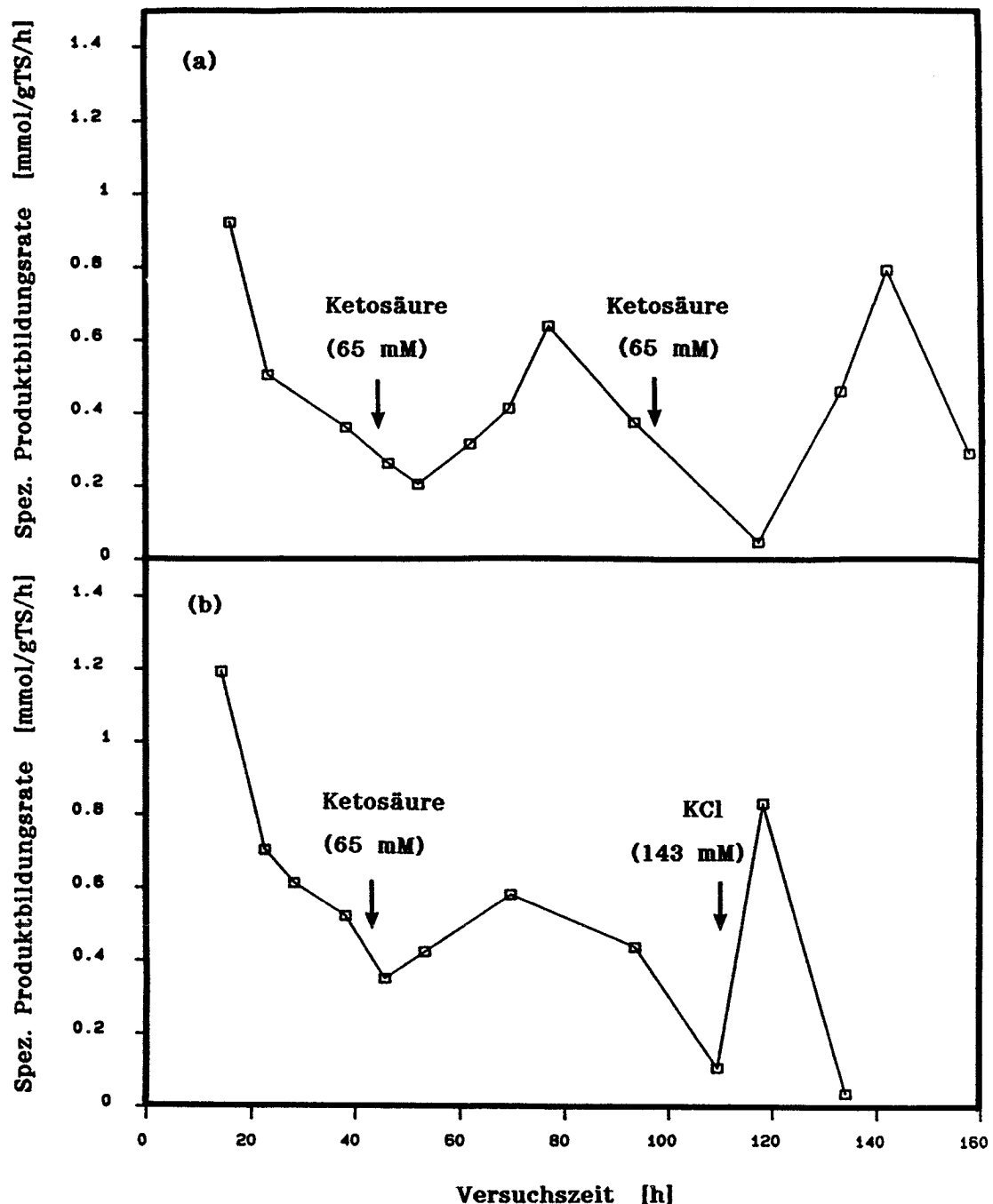


Abb. 4.10: Einfluß des osmotischen Druckes auf die spez. Produktbildungsrate bei ruhenden Zellen

Versuche im Festbettreaktor (s. Kap. 3.4.1.) mit 50 g nichtporösen Glas-Raschigringen; $pO_2 > 5\%$; zu den markierten Zeiten wurden Ketosäure- bzw. KCl-Lösungen zugegeben, so daß sich die angegebenen Konzentrationen ergaben; Verdünnung durch die Supplementierungen wurde berücksichtigt

(a): Die Zellen wurden vor Versuchsstart 18 h in Medium C (s. Tab. 3.2) mit 150 mM MOPS-Puffer inkubiert, gewaschen und im gleichen Medium resuspendiert; OD_{600} während des Versuches = 9.3 - 14.9

(b): Die Zellen wurden 24 h in Medium C inkubiert und so behandelt wie bei (a); OD_{600} während des Versuches = 9.1 - 16.3

Der osmotische Druck kann offenbar als Optimierungsparameter verwendet werden, um den Stoffwechsel der Mikroorganismen in gewünschter Weise zu beeinflussen (Mattiasson et al., 1984). Weitere Untersuchungen des Einflusses des osmotischen Druckes sollten in kontinuierlicher Kultur durchgeführt werden.

4.1.2.4. Wachstumskontrolle

4.1.2.4.1 Auswahl einer geeigneten Methode

Für die Vergleichsversuche unterschiedlich oberflächenmodifizierter Sintergläser werden Zellen benötigt, die produzieren, aber nur ein geringes Wachstum aufweisen (s. Kap. 4.2.). Es bieten sich folgende Methoden der Wachstumskontrolle an:

- 1) Erhöhung der Temperatur
- 2) Zugabe von Wachstum-hemmenden Substanzen
- 3) Anhebung des osmotischen Druckes
- 4) Limitierung eines essentiellen Elementes im Medium

Durch eine Erhöhung der Temperatur können für kurze Zeit ruhende Zellen erzeugt werden (s. Kap. 4.1.2.1.). Diese sind jedoch nicht langfristig stabil. Das gleiche gilt für Methode 2 (Ergebnisse zu Tab. 4.12; S. 92). Offenbar können die Mikroorganismen ihre Aktivität nur dann aufrechterhalten, wenn ihnen nicht die Möglichkeit zur Regenerierung des Enzymapparates (d.h. Proteinsynthese) genommen wird. Mit Methode 3 kann eine Reduktion des Wachstums erfolgen. Die Zellen können jedoch nicht zum Ruhen gebracht werden.

Es bietet sich daher die Limitierung eines für das Wachstum essentiellen Elementes im Medium an. In der folgenden Tabelle sind die dafür in Frage kommenden Elemente mit ihrer ungefähren Mengenverteilung in Bakterien zusammengestellt (Stanier et al., 1976).

Element	C	H	O	N	P	S	K	Na	Mg	Ca	Cl	Fe
Gew. %	50	8	20	14	3	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.2

Bei chemostatischen Fermentationen wird häufig (aus ökonomischen Gründen) die Kohlenstoffquelle in limitierenden Konzentrationen eingesetzt. Aus reaktionstechnischer Sicht ist das allerdings nur dann sinnvoll, wenn die Produktbildung der Mikroorganismen von der Verfügbarkeit einer Kohlenstoff- bzw. Energiequelle unabhängig ist. Die Stickstoffquelle kann nicht begrenzt werden, da Aminosäuren produziert werden sollen. Phosphor, Schwefel und Kalium können zur Wachstumsbegrenzung eingesetzt werden. Natrium wird mit dem Salz der Ketosäure reichlich zugeführt. Ein Magnesium- oder Calcium-Mangel inhibiert offenbar bei Corynebakterien die Aufnahme von Glucose (s. Kap. 4.1.3.1. und 4.1.3.2.). Die anderen Elemente sind in den Zellen in zu geringen Mengen enthalten.

Mit Tabelle 4.6 (s. S. 71) wurde gezeigt, daß eine Begrenzung der Phosphor-, Schwefel- oder Kalium-Quelle grundsätzlich zur Herabsetzung des Wachstums geeignet sind. Der durch Kaliummangel hervorgerufene erhöhte Energiestoffwechsel führte nicht zu einer gesteigerten Produktion (s. Kap. 4.1.1.3.2.). Die Schwefel-Limitierung wurde während einer chemostatisch kontrollierten Fermentation erprobt. Die Zellen wurden in Medium S-lim (s. Tab. 3.5) kultiviert, welches 1.11 mM Sulfat (aus der Spurenelementelösung) enthält. Es ergab sich eine je nach Durchflußrate leicht variierende Zellkonzentration von 9.3 bis 11.2 gTS/l. Daraus errechnet sich ein Ausbeutekoeffizient von etwa 290 gTS/gS bzw. ein Schwefelgehalt der Zellen von 0.35 %. Dieser Wert entspricht den von Reiling et al. (1985) auf die gleiche Weise ermittelten 0.36 % für *E. coli*.

4.1.2.4.2. Verhalten der Zellen bei Phosphor-Mangel

Wachstum

Für Langzeitversuche mit ruhenden Zellen wurde wegen der besten Stabilität (s.u.) die Phosphor-Limitierung ausgewählt. Es läßt sich für diese Art der Wachstumsbegrenzung kein sinnvoller Ausbeutekoeffizient angeben. Die Zellen sind in der Lage, auch nach Erschöpfung des Phosphatvorrates im Medium weiterzuwachsen. Bei Abbruch des in Abb. 4.2 (s. S. 67) dargestellten Versuches ist nur im Kolben mit der höchsten Anfangskonzentration (9.9 mM) noch Phosphat enthalten. Daraus errechnet sich ein Phosphorgehalt der Zellen von 3.2 %, welcher als ein Sättigungswert angesehen werden kann (s. Abb. 4.2b). Luria (1960) gibt ähnliche Werte für *E. coli* an. Der Phosphorgehalt der Zellen in den anderen Kolben ergibt sich aus der vorgelegten Phosphatmenge und der erreichten Zellmasse. Es ist zu erkennen, daß bis zu einem Phosphorgehalt der Zellen von etwa 0.6 % eine konstante OD₆₀₀ erreicht wird. Ähnliche Beobachtungen wurden mit *Brevibacterium ammoniagenes* gemacht (Oishi et al., 1970).

Abb. 4.11 zeigt den Zeitverlauf eines Batch-Versuches, bei dem 10 bzw. 2 mM Phosphat vorgelegt wurden. Nach einem anfänglich exponentiellen Wachstum geht dieses in einen linearen Verlauf über. Bei dem Ansatz mit 10 mM Phosphat tritt der Knickpunkt etwa bei OD₆₀₀ = 41 auf. Daraus errechnet sich ein Phosphorgehalt der Zellen im Moment des Übergangs vom logarithmischen zum linearen Wachstum von 3.2 %. Dieser Wert stimmt mit dem oben gefundenen Sättigungsgehalt der Zellen überein. Man kann schließen, daß der beobachtete Knick in der Wachstumskurve durch eine Erschöpfung des Phosphates im Medium zu erklären ist. Nach diesem Punkt tritt in beiden Kolben, unabhängig vom Phosphorgehalt der Zellen, ein fast parallel verlaufendes, lineares Wachstum auf. Selbst bei Zellen, die bis zu 20 Tagen in Phosphat-freien Medien kultiviert wurden (P-Gehalt ~ 0.01 %), konnte geringes Wachstum beobachtet werden (s.a. Kap. 4.3.).

Bei Corynebakterien kann man in Bezug auf Phosphor nicht im üblichen Sinne von einer Wachstumslimitierung sprechen. Man bezeichnet Zellen unter Phosphor-Mangel daher besser als "Wachstumsrate-limitiert" bzw. Phosphor-verarmt.

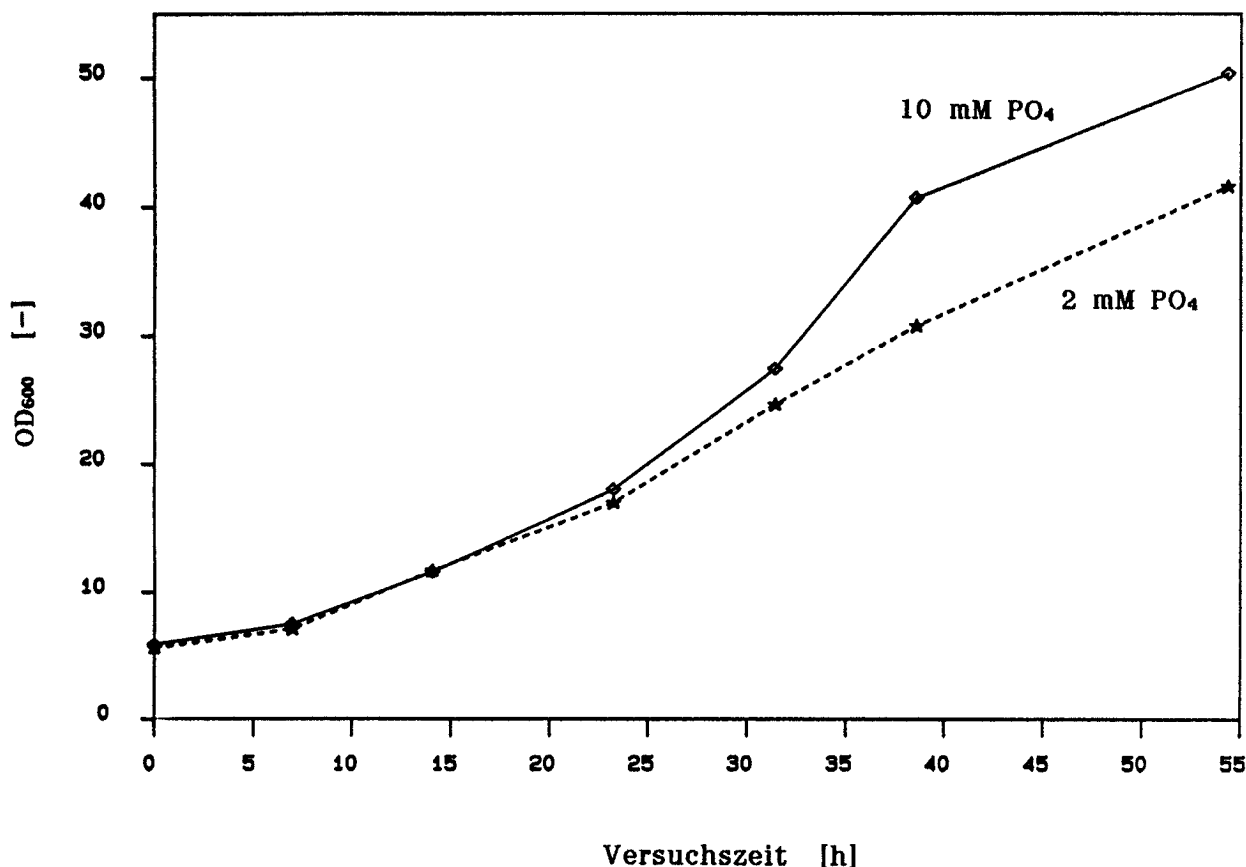


Abb. 4.11: Einfluß der Phosphatkonzentration im Medium auf die Wachstumsgeschwindigkeit
 Festbettreaktor (s. Kap. 3.4.1.) mit nichtporösen Glas-Raschigringen, Medium C (s. Tab. 3.2.) mit Phosphatzusatz, wie angegeben

Fast alle in der Literatur publizierten Medienrezepturen für coryneforme Bakterien enthalten nur etwa 7.3 mM Phosphat. Die daraus resultierenden Zellen sind Phosphor-verarmt.

Produktbildung

Es wurde gezeigt, daß eine Phosphorverarmung von *C. glutamicum* keinen Einfluß auf die spez. Produktbildungsrate hat (s. z.B. Tab. 4.6; S. 71). Das gleiche wurde für die Glutamatbildung mit *Brevibacterium flavum* berichtet (Oishi et al., 1970). Bei den in Abb. 4.10 (s. S. 83) dargestellten Versuchen wurde ein stetiger Anstieg der Leucinkonzentration bis zur Löslichkeitsgrenze dieser Aminosäure nach 6 Tagen beobachtet. Auch bei Zellen, die über 20 Tage ohne Phosphat kultiviert wurden, konnte noch Leucinbildung festgestellt werden. (Über Nebeneffekte bei Phosphor-verarmten Zellen siehe Anhang A.7)

4.1.3. Medienoptimierung

Die optimale Mediumzusammensetzung für kontinuierliche Kultur ist am Ende in Tabelle 4.13 (s. S. 95) zusammengefaßt.

4.1.3.1. Mg-Mangel im Vollmedium

Bei den Vorkulturen im Vollmedium (s. Tab. 3.1) wurde anfänglich nur eine OD_{600} von etwa 10 - 15 erreicht, ohne daß die Glucose dabei verbraucht worden war.

Abb. 4.12 zeigt den Zeitverlauf eines Schüttelkolbenversuches mit Vollmedium und verschiedenen Zusätzen. Das Medium war ganz offensichtlich Magnesium-limitiert. Diese hemmt im Gegensatz zu einer Schwefel- oder Phosphat-Limitierung die Glucoseaufnahme.

4.1.3.2. Ketosäurezersetzung und Stabilisierung

Bei den ersten kontinuierlichen Fermentationen mit Medium Alt (s. Tab. 3.5: S. 29) konnte kein stabiler Betrieb aufrechterhalten werden. Die Wachstumsrate und die spez. Sauerstoffaufnahme der Mikroorganismen sanken mit der Versuchsdauer ab. Wenn frisch bereitetes Medium angeschlossen wurde, erholten sich die Zellen wieder. In einer Sauerstoffmeßzelle wurde schließlich festgestellt, daß Medium Alt ohne Zugabe von Mikroorganismen bereits einen beträchtlichen Sauerstoffverbrauch aufwies, welcher mit dem Alter des Mediums im Zusammenhang stand. Als Auslöser für den Sauerstoffverbrauch wurde die Ketosäure in Kombination mit Manganionen identifiziert.

Der Zerfall der Ketosäure läuft wahrscheinlich nach dem in Abb. 4.13 dargestellten Chemismus ab. Die α -Ketoisocaproensäure decarboxyliert unter Katalyse der Mn^{2+} -Ionen zum iso-Valeraldehyd, welcher unter Sauerstoffaufnahme zur iso-Valeriansäure weiteroxidiert wird. Beide Zersetzungsprodukte konnten gaschromatographisch nachgewiesen werden. Durch eine pH-Absenkung unter 4 und Spülen der Medien mit Argon kann der zweite Reaktionsschritt unterbunden werden, nicht jedoch der erste. Von Schellenberger und Selke (1959) wurde eine Arbeit über die oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren, u.a. durch Mn^{2+} -Ionen, publiziert.

Die Zersetzung der Ketosäure fällt mengenmäßig nicht sehr ins Gewicht. Offensichtlich wurde sie deshalb bei den Schüttelkolbenexperimenten bisher nicht bemerkt. Allerdings wird das Wachstum der Zellen schon durch geringe Mengen iso-Valeraldehyd beeinflusst. Der Aldehyd konnte in Standardlösungen, nicht aber in Kulturproben quantitativ erfaßt werden. Vermutlich bindet der Aldehyd unter Ausbildung von Schiff'schen Basen an den Proteinen der Zellwand.

Zur Stabilisierung der Ketosäure wurde der Einsatz von komplexbildenden Substanzen untersucht. Dadurch sollte die freie Mangankonzentration im Medium soweit verringert werden, daß keine Zersetzung mehr auftritt. Die Bindungsstärke des Komplexbildners darf allerdings nicht so groß sein, daß die Spurenelemente

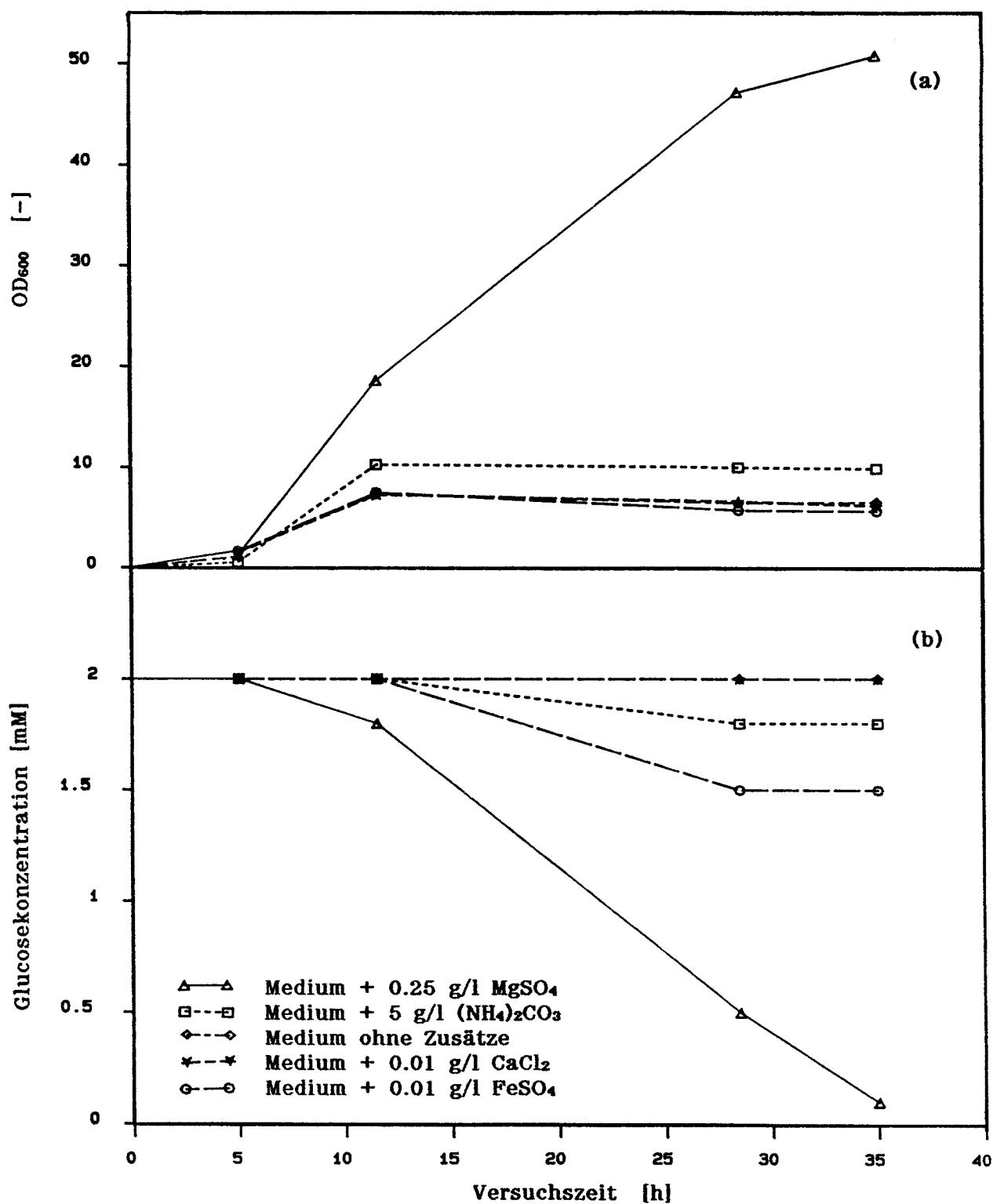


Abb. 4.12: Einfluß von Zusätzen zum Vollmedium auf Wachstum (a) und Glucoseaufnahme (b)
100 ml Vollmedium (s. Tab. 3.1) im Schüttelkolben; Zusätze wie angegeben

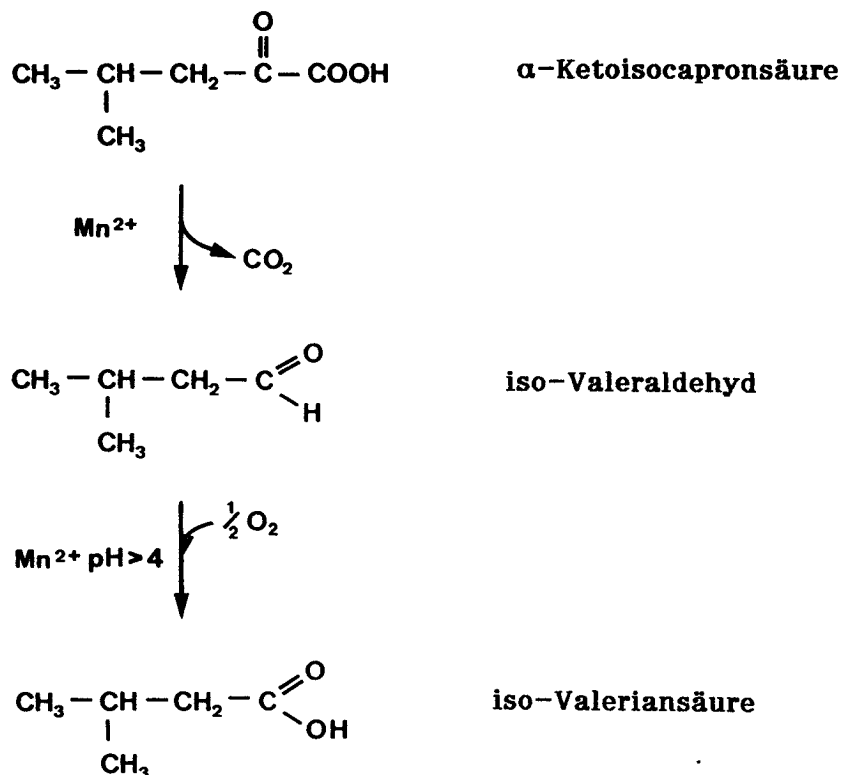


Abb. 4.13: Chemismus der Zersetzung der α -Ketoisocapronsäure durch Katalyse von Manganionen

Element	Komplexbildungskonstanten ($\log K_1$)			
	NTA	EDTA	EGTA	Citronensäure
Mg^{2+}	5.4	8.7	5.2	–
Ca^{2+}	6.4	10.7	11.0	–
Mn^{2+}	7.4	13.8	12.3	–
Fe^{2+}	8.8	14.3	–	–
Fe^{3+}	15.9	25.1	–	25.0
Zn^{2+}	10.7	16.5	12.9	–
Cu^{2+}	13.0	18.8	17.8	18.0

Tabelle 4.9: Komplexbildungskonstanten

($\log K_1$): Zehnerlogarithmus der Gleichgewichtskonstanten, die das Verhältnis der komplexierten zu den nicht komplexierten Metallionen angibt; Werte aus Bjerrum et al. (1957) und Firmenschrift Riedel-de Haen, Idanal, Reagenzien für die Kompleximetrie

von den Mikroorganismen nicht mehr aufgenommen werden können. In Tabelle 4.9 sind einige Substanzen mit ihren Komplexbildungskonstanten aufgeführt. (Für die Citronensäure konnten nur wenige und z.T. nicht konsistente Angaben gefunden werden.)

Bei dem in Abb. 4.14 dargestellten Versuch ohne Mikroorganismen weist der Abfall der Ketosäurekonzentration auf deren Zersetzung in normalem und mit NTA versetztem Medium hin. Dazu korrespondierend wurden iso-Valeraldehyd und iso-Valeriansäure gefunden. Bei Zugabe von EDTA und Citronensäure trat keine Zersetzung auf. (Die Zunahme der Ketosäurekonzentration ist auf Verdunstung von Wasser zurückzuführen.) Offenbar reicht die Bindungsstärke des NTA nicht aus, um die freie Konzentration der Manganionen in ausreichendem Maße zu reduzieren.

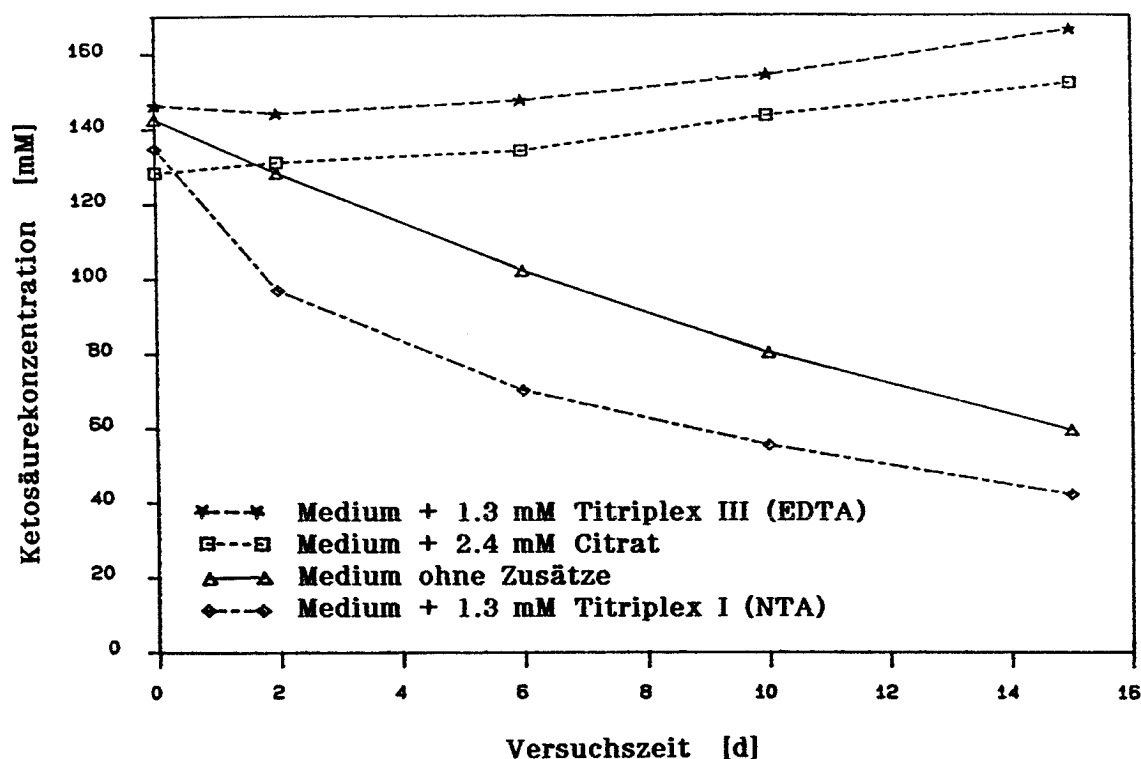


Abb. 4.14: Stabilisierung der α -Ketoisocapronsäure durch Komplexbildner in Gegenwart von Manganionen
Schüttelkolben mit Medium A (s. Tab. 3.2), Zusätze wie angegeben, Schüttelmaschine 37°C

Zwei Versuche zur biologischen Verträglichkeit der Komplexbildner sind in Tabelle 4.10 zusammengefaßt. In Medium A wurde eine erstaunliche Verbesserung des Wachstums bei Zugabe der Komplexbildner beobachtet. Im Vollmedium hingegen trat im Kolben mit 2 mM EDTA überhaupt kein Wachstum auf. Bei 0.2 mM EDTA wuchsen die Zellen bis zu einer OD_{600} von 15 und nahmen dann keine Glucose mehr auf.

Medienzusätze	Konzentration [mM]	Medium A ¹ Wachstum(OD ₆₀₀)	Vollmedium ² Wachstum(OD ₆₀₀)
Keine	-	13.5	42.8
Citronensäure	2.3	24.0	37.2
EDTA	2.0	33.1	1.2
EDTA	0.2	n.b.	15.0

Tabelle 4.10: Wachstum auf Medien mit verschiedenen Komplexbildnern

¹: Schüttelkoben mit insges. 100 ml Medium A (s. Tab. 3.2) mit 100 mM Kalk, Zusätze wie angegeben, Inkubationszeit 48 h

²: Insges. 100 ml Vollmedium (s. Tab. 3.1), Zusätze wie angegeben, Inkubationszeit 17 h

Da im Vollmedium eine ähnliche Hemmung der Glucoseaufnahme durch Mg-Mangel aufgetreten war (s. Kap. 4.1.3.1.), wurde das Vollmedium zusätzlich mit Calcium und Magnesium supplementiert. Wie Tabelle 4.11 zeigt, kann durch einen Überschuß an Ca²⁺-Ionen ein normales Wachstum wiederhergestellt werden. Aus dem gleichen Grund waren die Zellen bei dem oben beschriebenen Versuch in Medium A, welches Kalk-Puffer enthielt, trotz 2 mM EDTA gewachsen. Die Komplexbildungskonstante von EDTA (und EGTA) für Calcium ist also größer als die Affinität der Mikroorganismen für dieses essentielle Element. Die von NTA ist kleiner.

Medienzusätze ¹	Wachstum(OD ₆₀₀)
Keine	30.6
0.2 mM NTA	31.8
0.2 mM EDTA	7.1
0.2 mM EDTA + 1 mM MgCl ₂	9.2
0.2 mM EDTA + 1 mM CaCl ₂	31.6
0.2 mM EGTA	6.5

Tabelle 4.11: Einfluß der Komplexbildungsstärke auf die Verfügbarkeit von Calcium

¹: Schüttelkolben mit insges. 100 ml Vollmedium (s. Tab. 3.1), Zusätze wie angegeben, Inkubationszeit 11 h

Da sich die Citronensäure als mikrobiell verträglich und effektiv für die Komplexierung der Manganionen erwiesen hatte, wurde sie fortan den Medien zugesetzt. Damit wird außerdem das Ausfallen von schwer löslichen Salzen verhindert. Die Citronensäure wird allerdings von den Mikroorganismen metabolisiert und verliert somit im Reaktor ihre Wirkung. In weiteren Experimenten wurde den Medien zusätzlich zur Citronensäure die den Elementen Mangan und Eisen entsprechende molare Menge EDTA beigegeben. Durch die

hohen Komplexbildungskonstanten wird das EDTA vollständig durch diese Metalle gesättigt. Als weitere Maßnahme wurde die Calciummenge erhöht (s. Spurenelementelösung B, Tab. 3.3).

Auf diesem Medium mit EDTA zeigte sich ein deutlich besseres Wachstum als ohne (s. Tab. 4.12, Ansätze ohne Antibiotika). Die Affinität der Mikroorganismen für Mangan und Eisen ist offenbar groß genug, um diese Elemente aus den EDTA-Komplexen bei Bedarf herauszulösen.

Um einen evtl. negativen Einfluß von EDTA auf die Leucinbildung auszuschließen, wurde ein Vergleichsversuch mit ruhenden Zellen (Antibiotika) angesetzt (s. Tab. 4.12). Tetracyclin ist ein Antibiotikum, welches die Proteinsynthese hemmt. Rifampicin ist ein spezifischer Inhibitor der RNA-Polymerase und verhindert damit die Transcription der DNA (Firmenschrift, Boehringer Mannheim). Es ist keinerlei negativer Einfluß von EDTA auf die spez. Leucinbildungsrate zu erkennen. Der molare Ausbeutekoeffizient ist etwas erhöht. Die Medien wurden daher für die weiteren Versuche mit Na-Citrat (0.447 g/l Medium) und EDTA (0.06 g/l Medium) angesetzt (s. Spurenelementelösung B, D und E; S. 27).

Medienzusätze [1/l]	OD ₆₀₀	Ausbeute- koeffizient Y _{L/s} [mol/mol]	spez. Leucin- bildungsrate [mmol/gTS/h]	spez. Glucose- verbrauchsrate [mmol/gTS/h]
ohne EDTA				
Keine	36.4	0.53	0.77	1.46
35 µg Tetracyclin	23.5	0.79	0.76	0.97
50 µg Rifampicin	17.8	0.84	0.84	0.99
50 µg Rifamp.+0.65 g NaCl	15.0	0.97	0.90	0.92
mit EDTA				
Keine	45.1	0.54	0.77	1.43
35 µg Tetracyclin	26.9	0.85	0.81	0.95
50 µg Rifampicin	18.1	0.96	0.85	0.89
50 µg Rifamp.+0.65 g NaCl	15.7	1.16	0.91	0.78

Tabelle 4.12: Einfluß von EDTA auf durch Antibiotika zum Ruhen gebrachte Zellen

Die Zellen wurden in Medium C (s. Tab. 3.2) mit 200 mM MOPS-Puffer aufgezo-gen, gewaschen und in Medium C (mit bzw. ohne EDTA) mit 200 mM HEPES-Puffer resuspendiert (OD₆₀₀ = 14.9). Je 40 ml davon wurde in die Kolben gegeben, welche die angegebenen Zusätze trocken enthielten.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß es trotz der ergriffenen Maßnahmen zu einer leichten Zersetzung der Ketosäure kommt. So wurden geringe Mengen an Iso-Valeriansäure auch in Kulturen mit EDTA gefunden. Neben Metallionen könnten andere Substanzen wie sekundäre Amine eine katalytische Funktion ausüben (Cooper et al., 1983). Auch die Zellen selber könnten an der Decarboxylierung der Ketosäure beteiligt sein.

4.1.3.3. Medienoptimierung im Turbidostaten

Trotz der im letzten Kapitel beschriebenen Verbesserungen des Mediums konnte kein stabiler Betrieb in kontinuierlicher Kultur erzielt werden. So ist auch zu Beginn der in Abb. 4.15 dargestellten turbidostatisch geregelten Fermentation (0 - 230 h) eine allmähliche Abnahme der Durchflußrate zu verzeichnen.

In einem turbidostatisch geregelten Reaktor ohne Zellrückhaltung entspricht die Durchflußrate der maximalen Wachstumsrate der Mikroorganismen (s. Kap. 2.2.3.). An der Durchflußrate wird sofort ersichtlich, wenn sich die Wachstumsbedingungen verbessern. Da der Reaktor bei dem in Abb. 4.15 dargestellten Versuch mit Sinterglas gefüllt war, überlagern sich Änderungen der Wachstumsrate und evtl. des Bindungsvermögens der Zellen an den Trägerkörpern.

Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten wurden die in der Unterschrift von Abb. 4.15 angegebenen Lösungen steril in den Reaktor eingespritzt. Die Zugaben, die zu einer Erhöhung der Durchflußrate führten, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Es ist zu erkennen, daß die Durchflußrate durch Zugabe von Spurenelementelösung C und Thiamin drastisch gesteigert wurde. Ganz offensichtlich waren in den bisher verwendeten Medien für die *Corynebakterien* essentielle Bestandteile noch nicht enthalten.

Die Durchflußrate sank anschließend wieder auf den alten Wert ab, da die wachstumsfördernden Substanzen ausgewaschen wurden. Bis zum Zeitpunkt 7 hatte sich Zink als das hauptsächlich limitierende Element herausgestellt und wurde fest in das Medium übernommen. Die Durchflußrate stieg damit auf das erhöhte Grundniveau 2. Die Reaktion auf eine nochmalige Zugabe von Spurenelementelösung C und Thiamin deuteten an, daß ein weiterer Bestandteil limitierend sein mußte. Dieser wurde zum Zeitpunkt 9 als Kupfer-Ionen identifiziert. Auch durch Thiamin konnte die Durchflußrate weiter gesteigert werden (Zeitpunkt 13). Nachdem das Medium dauerhaft mit Kupfer supplementiert worden war (Spurenelementelösung D), ergab sich das höchste Niveau 3.

Nach Tachiki und Tochikura (1986) erniedrigt sich die Glutamat-Ausscheidung bei einem *Corynebacterium glutamicum* sp. durch Zugabe von Zink, während gleichzeitig die Glutamin-Produktion ansteigt. Nakayama (1982) berichtet, daß die Glutamat-Ausbeute aus Acetat bei *Brevibacterium thiogenitalis* durch Cu^{2+} -Ionen erhöht wird. Positive Auswirkungen von Zink und Kupfer werden auch bei der Glutamat- (Henkel, 1988) und iso-Leucinproduktion (Eggeling, 1987) mit coryneformen Bakterien registriert. Ein signifikanter Einfluß von Zink auf die Adsorptionsrate von *Streptococcus faecalis* wurde von Bhattacharjee (1986) beobachtet.

Zu Beginn des in Abb. 4.39 (s. S. 141) dargestellten Versuches wurde dem mit Zink und Kupfer bereiteten Medium zusätzlich noch Thiamin beigegeben, was eine weitere Steigerung der Wachstumsrate ergab.

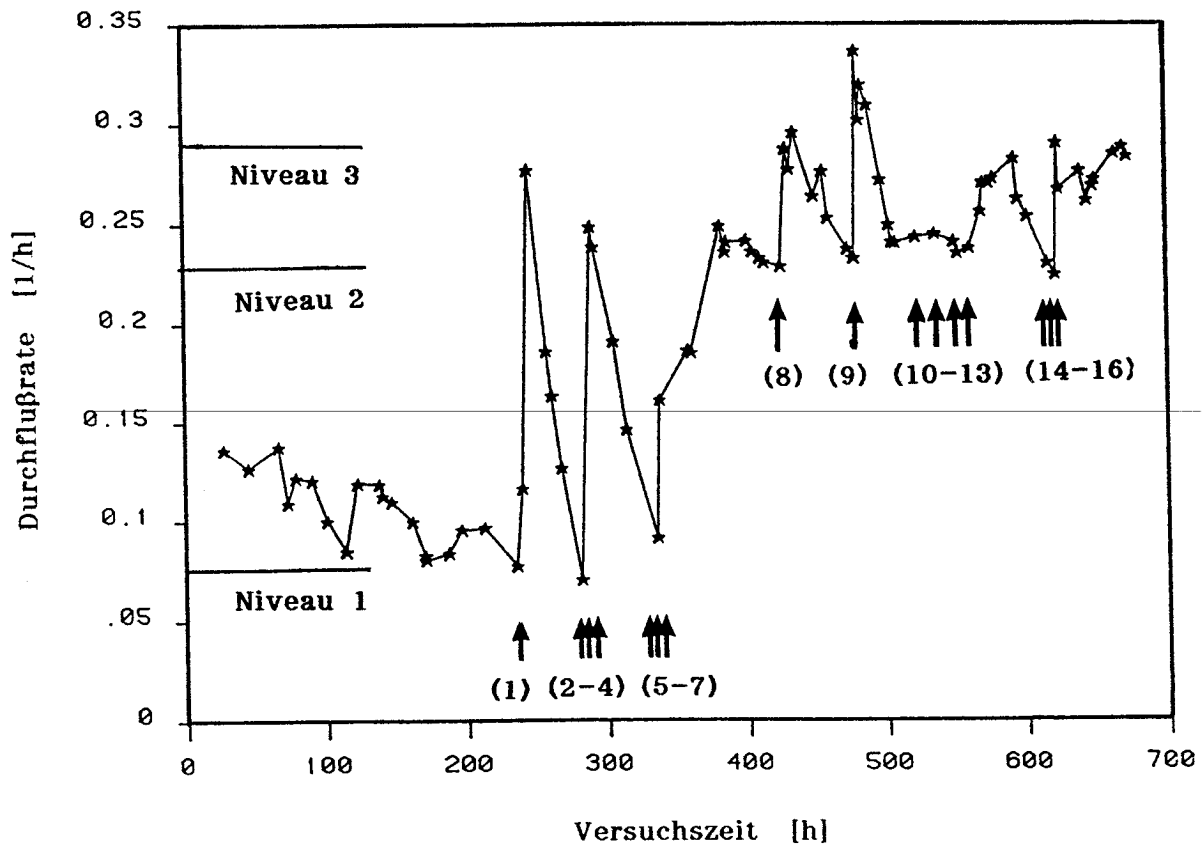


Abb. 4.15 Einfluß von Medienzugaben auf die Durchflußrate in einem turbidostatisch geregelten Festbettumlaufreaktor
Medium Normal (s. Tab. 3.5) mit Spurenelementlösung B (s. Tab. 3.3);
Füllvolumen 185 ml; Einmalige Zugabe von:

- * 1: 4 ml Spurenelementlösung C mit 2 g/l Thiamin
- 2: 1 ml Thiaminlösung 2 g/l
- 3: 2.5 ml Spurenelementlösung B
- * 4: 1.5 ml 1.25 mM Zn^{2+} mit 0.4 mM Cu^{2+}
- 5: 1.5 ml 0.4 mM Cu^{2+}
- * 6: 1.5 ml 1.25 mM Zn^{2+}
- * 7: Medium dauerhaft mit 0.017 mM Zn^{2+}
- * 8: 2 ml Spurenelementlösung C mit 2 g/l Thiamin
- * 9: 1.5 ml 0.4 mM Cu^{2+}
- 10: 1.5 ml 1.4 mM Co^{2+}
- 11: 1.5 ml 0.1 mM Mo^{6+}
- 12: 1.5 ml 0.076 mM Al^{3+}
- * 13: 1.5 ml 4g/l Thiamin
- 14: 1.5 ml 0.3 mM B^{3+}
- 15: 1.5 ml 0.4 mM Cu^{2+}
- * 16: Medium dauerhaft mit Spurenelementlösung D

Zugaben, die zu einer deutlichen Erhöhung der Durchflußrate führten, wurden mit einem Stern (*) markiert

Mit den hier beschriebenen Medienoptimierungen wurden die Voraussetzungen für eine stabile kontinuierliche Fermentation von L-Leucin geschaffen.

Die optimalen Kulturbedingungen und das optimale Medium sind in Tabelle 4.13 zusammengefaßt. Die kontinuierlichen Fermentationen wurden mit normal wachsenden Zellen durchgeführt, um möglichst hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen. Die Vor- und Nachteile von wachsenden und ruhenden Zellen sind in Tabelle 4.14 qualitativ gegenübergestellt (s.a. Kap. 4.2.3.).

Temperatur:	30°C
pH-Wert:	7.2 - 7.4
Osmotischer Druck	
für maximales Wachstum:	so niedrig wie möglich
für maximale Produktion (Batch):	35 - 65 bar ¹
pO ₂ :	> 2 % ²
Medium:	Normal (s. Tab. 3.5)
	Spurenelementel. D (s. Tab. 3.3)

Tabelle 4.13: Die optimalen Kulturbedingungen und das optimale Medium zur kontinuierlichen Kultur von wachsenden Zellen

¹: In kontinuierlicher Kultur noch nicht untersucht

²: Gültig für frei suspendierte Zellen

Kriterien	Wachsende Zellen	Ruhende Zellen
Biologische Stabilität	hoch	niedrig - hoch ¹
Erreichbare Zelldichten	hoch	niedrig
und Raum-Zeit-Ausbeuten ²		
Glucoseausbeute (Y _{L/s}) ³	niedrig	hoch

Tab. 4.14: Qualitative Vor- und Nachteile einer Wachstumsentkopplung der Leucinproduktion

¹: Abhängig von der Methode der Wachstumskontrolle

²: s.a. Kap. 4.2.3.

³: s. Abb. 4.3; S. 68

4.1.4. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Leucinbildung

Als geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Leucinbildung kommen grundsätzlich in Frage (s. Abb. 4.16):

- 1) Die Lieferung von NADPH bzw. Glutamat durch den Stoffwechsel der Mikroorganismen
- 2) Die Aktivität der Transaminase B
- 3) Transport der α -Ketoisocaproinsäure in die Zellen
- 4) Transport des Leucins aus den Zellen

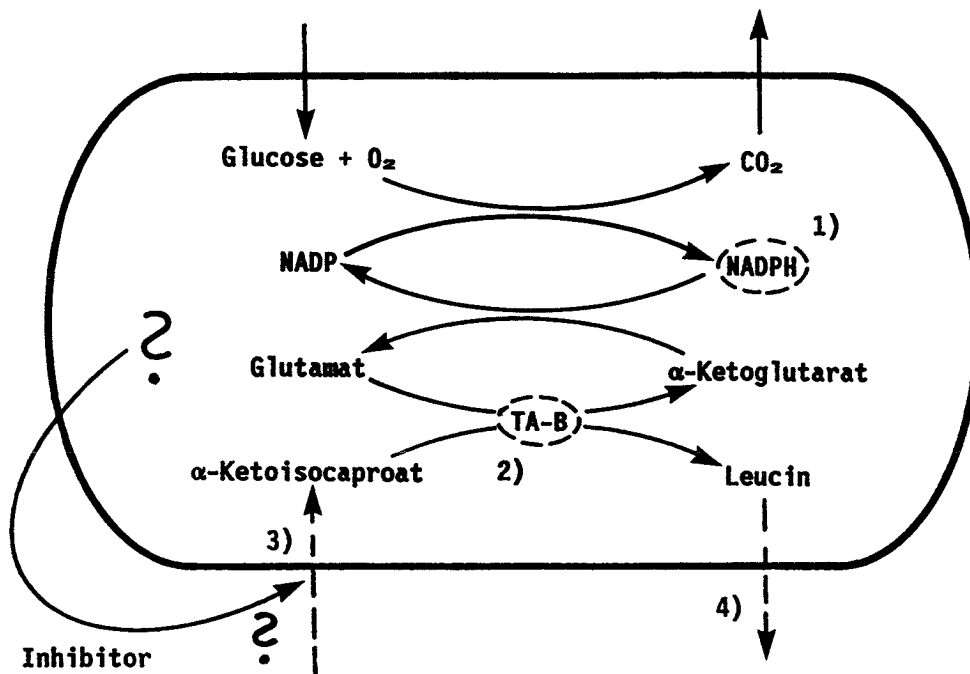


Abb. 4.16: Die möglichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Leucinbildung (gestrichelt; s. Text); TA-B: Transaminase B

Die erste Hypothese ist wenig wahrscheinlich. Werden Zellen zum Ruhen gebracht, müßte Synthesekapazität für NADPH frei sein und zu einer höheren Produktbildungsrate führen. In Experimenten wird das jedoch nicht beobachtet (s. Kap. 4.1.1.3.2.).

Die zweite Hypothese wurde von Gröger (1986) aufgestellt. Nach Shio et al. (1982) ist die Transaminase B in *Brevibacterium flavum* verantwortlich für die Synthese von Leucin, iso-Leucin und Valin. Bei ruhenden Zellen ist der Bedarf

an diesen Aminosäuren stark herabgesetzt, wodurch Transaminase B- Kapazität frei werden müßte. Eine erhöhte Leucinbildung wird bei ruhenden Zellen (unabhängig von der Methode der Wachstumsbegrenzung) jedoch nicht beobachtet. Nassenstein (1987) konnte zeigen, daß eine Anhebung der Transaminase B- Aktivität in *C. glutamicum* durch gentechnische Maßnahmen keine Steigerung der iso-Leucinbildung bewirkt.

Für den limitierenden Einfluß des Transportes der Ketosäure in die Zellen hinein (dritte Hypothese) gibt es einige Hinweise:

- 1) Gröger (1986) konnte nachweisen, daß die Transaminase B einer Substratüberschußinhibierung durch die α -Ketoisocaprönsäure unterliegt ($K_i = 15 \text{ mM}$). Bei ganzen Zellen konnte jedoch bis 250 mM Ketosäure kein hemmender Einfluß auf die Leucinbildung festgestellt werden. Es ist daher anzunehmen, daß die Ketosäurekonzentration in den Zellen relativ niedrig bleibt und die Zellwand eine starke Barriere für diese Substanz darstellt.
- 2) Bei kontinuierlichen Fermentationsversuchen wurde festgestellt, daß bei mittleren und kurzen Verweilzeiten nicht umgesetzte Ketosäure im Medium zurückbleibt. Durch Anhebung der stationären Ketosäurekonzentration im Reaktor auf verschiedene Niveaus wurde eine Monod-Konstante (K_m -Wert) der ganzen Zellen von etwa 6 mM abgeschätzt. Gröger hatte für die Transaminase B jedoch einen K_m -Wert von 0.14 mM ermittelt. Der Unterschied ist nur durch Transportwiderstände in der Zellwand zu erklären.
- 3) Die Transaminase B ist ein durch α -Ketoisocaprönsäure induzierbares Enzym. Gröger (1986) stellte fest, daß die Aktivität der Transaminase B im Laufe einer Batch-Fermentation nach einem anfänglichen Anstieg abnimmt. Der Grund dafür ist bisher unbekannt. Diese Abnahme könnte durch ein Abfallen der zellinternen Ketosäurekonzentration bedingt sein, ausgelöst durch den unten beschriebenen Inhibitor-Mechanismus.
- 4) Bei hohen osmotischen Drucken war eine deutliche Steigerung der Produktbildungsrate durch eine Erhöhung der Ketosäurekonzentration beobachtet worden (s. Kap. 4.1.2.3.).
- 5) In Abb. 4.10 (s. S. 83) trat der Anstieg der spez. Produktbildungsrate zeitverzögert nach Zugabe von Ketosäure auf.
- 6) Die spez. Produktbildungsrate erwies sich als völlig unabhängig vom energetischen und physiologischen Zustand der Zellen (s. z.B. Tab. 4.6; S.71 oder Abb. 4.6; S.77).

Eine Transporthemmung des Leucins (vierte Hypothese) kann ausgeschlossen werden, da sich sonst die Ketosäure in den Zellen aufstauen müßte. In diesem Fall wäre bei einer Erhöhung der Ketosäurekonzentration im Medium eine Erniedrigung der spez. Produktbildungsrate (durch Substratüberschußinhibierung; s.o.) und nicht eine Erhöhung (wie beobachtet; s.o.) zu erwarten. Eine Inhibierung der Produktbildung durch Leucin konnte nicht beobachtet werden.

Es kann daher vermutet werden, daß der Transport der α -Ketoisocaproonsäure durch die Zellwand der Mikroorganismen den limitierenden Faktor darstellt. Eine Klärung dieser Frage läßt sich nur durch eine Bestimmung der zellinternen "pool"-Konzentrationen herbeiführen.

Welcher Mechanismus beeinflußt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Leucinbildung?

In Kap. 4.1.1.3.2. wurde festgestellt, daß die spez. Produktbildungsrate mit der Kontaktzeit zwischen Zellen und Medium stetig abnimmt. Der physiologische Zustand der Zellen (wachsend oder ruhend) scheint keinen Einfluß auf diesen Effekt zu haben. Unter der Annahme, daß der Transport der Ketosäure die Leucinbildung kontrolliert, ist folgende Erklärung denkbar:

- 1) Der Transport der Ketosäure wird durch einen bisher unbekannten Inhibitor gehemmt.
- 2) Diese inhibierende Substanz wird durch die Zellen gebildet, unabhängig von deren Zustand.
- 3) Ruhende und wachsende Mikroorganismen (geringe bzw. hohe Zellkonzentration) werden gleichermaßen gehemmt (s. Abb. 4.6; S. 77). Der entscheidende Faktor ist also nicht die absolute Konzentration des Inhibitors (diese wäre bei hoher Zellkonzentration am größten), sondern die gebildete Inhibitormenge pro Zellmasse. Der Inhibitor muß demnach eine große Affinität zum Transportsystem der Ketosäure besitzen. Die Hemmung ist allerdings reversibel, da die Zellen nach Waschen und Resuspendieren in frischem Medium wieder eine hohe Aktivität besitzen.

In Abb. 4.16 ist dieser mögliche Inhibitormechanismus dargestellt. Aus der Annahme, daß der Transport der Ketosäure limitierend wirkt, resultiert eine geringe Konzentration im Inneren der Zellen. Die Ketosäure kann dort selber daher nicht regulatorisch wirksam werden.

Die Natur des postulierten Inhibitors ist unbekannt. Es ist denkbar, daß es sich um eine sich aufstauende Substanz des natürlichen Leucin-Biosyntheseweges handelt, welcher bei Zugabe der Ketosäure durch die hohe Leucinkonzentration blockiert ist (s. Abb. 1.1). α -Ketoisovaleriansäure konnte experimentell nicht als dieser Inhibitor nachgewiesen werden.

4.2. Einfluß und Optimierung der Oberflächeneigenschaften der Trägerkörper

Erste Versuche zur adsorptiven Bindung von *Corynebacterium glutamicum* hatten gezeigt, daß die Mikroorganismen nicht an unbehandelten Glasoberflächen haften. Es mußte daher eine Oberflächenmodifizierung vorgesehen werden. Um deren Effektivität zu beurteilen, kommen folgende Methoden in Frage:

- 1) Mikroskopische Untersuchung
- 2) Bestimmung der Gewichts Differenz zwischen mit Mikroorganismen beladenen und anschließend ausgeglühten Trägerkörpern
- 3) Bestimmung z.B. des C-, N-, P-, Protein- oder ATP-Gehaltes der Trägerkörper
- 4) Bestimmung der Konzentrationsdifferenz einer Zellsuspension vor und nach Zugabe von Trägerkörpern
- 5) Aktivitätsbestimmung von mit Mikroorganismen beladenen Trägerkörpern

Die erste Methode erlaubt nur qualitative Aussagen über die adsorbierte Zellmenge. Die zweite Methode wurde von Black et al. (1984) bei sehr hohen immobilisierten Zelldichten verwendet. Bei kleinen Zelldichten ist die Genauigkeit gering, da das Gewicht der Trägerkörper im Vergleich zu dem der gebundenen Mikroorganismen dominiert. Die Bestimmung des N-Gehaltes wurde z.B. in der anaeroben Abwasserreinigung eingesetzt (Johnen, 1986). Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erlaubt die Erfassung nur der lebenden Zellen (Messing und Oppermann, 1979). Bei porösen Trägerkörpern besteht das Problem, daß die zu messenden Substanzen vollständig aus den Materialien herausdiffundieren müssen. Die vierte Methode ist einfach durchzuführen und wurde daher von verschiedenen Autoren eingesetzt (Vijayalakshmi et al., 1979; Hattori und Hattori, 1985; Bisping und Rehm, 1986). Sie erfaßt nur den ersten, physikochemischen Adsorptionsschritt der Zellen und charakterisiert damit vor allem die Wechselwirkungen zwischen Glas- und Zelloberfläche. Das Aufwachsen der Mikroorganismen auf Trägerkörpern im Laufe eines kontinuierlichen Versuches wird nicht berücksichtigt.

Die ersten vier Methoden erlauben nur eine Aussage über die Menge der immobilisierten Mikroorganismen, nicht jedoch über deren Aktivität. Es ist bekannt, daß gebundene Mikroorganismen im Vergleich zu frei suspendierten eine andere spez. Aktivität und einen veränderten Stoffwechsel aufweisen können (Hattori und Furusaka, 1959; Navarro und Durand, 1977). Außerdem ist mit Diffusionswiderständen im Inneren der Trägerkörper zu rechnen. Die Bestimmung der Gesamtaktivität der mit Mikroorganismen beladenen Trägerkörper ist daher für eine verfahrenstechnische Beurteilung am sinnvollsten. Auf eine Bestimmung der gebundenen absoluten Zellmasse in kontinuierlicher Kultur wurde in dieser Arbeit bewußt verzichtet.

4.2.1. Aktivitätsbestimmungen von Mikroorganismen-beladenen Trägerkörpern

Abb. 4.17 zeigt die Ergebnisse eines Vergleichsversuches (s. Kap. 3.1.3) im Festbettreaktor (s. Kap. 3.4.1.) mit unbehandelten, Amino-funktionellen und hydrophobisierten Sinterglaskörpern. Das hydrophobisierte Material weist keine Erhöhung der Leucinproduktion gegenüber unbehandeltem Glas auf. Das Amino-funktionelle Material hingegen zeigt eine deutlich gesteigerte Aktivität. Von dem letzteren Material wurden offensichtlich die meisten Zellen gebunden.

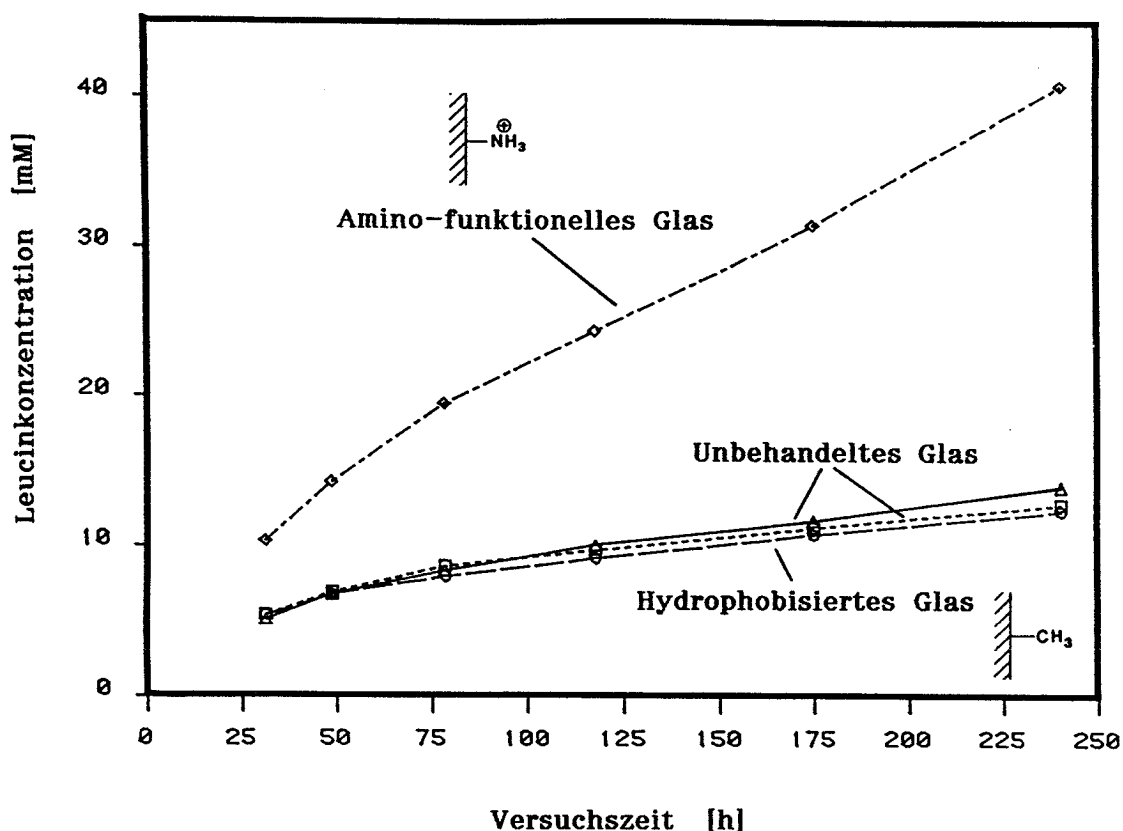
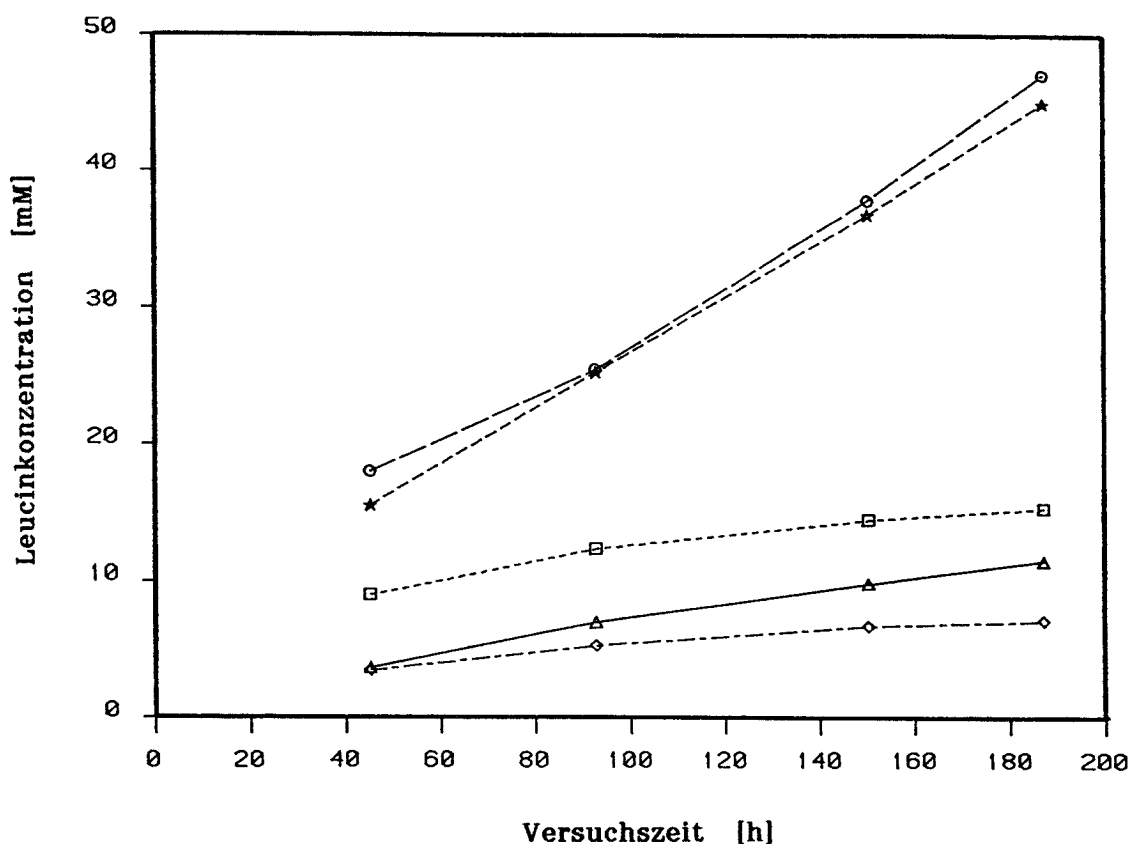


Abb. 4.17: Die Entwicklung der Leucinkonzentration im Vergleichsversuch 1 Batch-Versuch (s. Kap. 3.1.3) im Festbettreaktor; Amino-funktionelles Glas nach Vorschrift 3, Kap. 3.3.1.1.; Hydrophobisiertes Glas n. Vors. 7; Produktionsmedium P1 (s. Tab. 3.4) war bereits einmal ausgetauscht worden

Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß die Corynebakterien eine negativ geladene Oberfläche besitzen, da sie von positiv geladenen Körpern angezogen werden. Ihre Zellwände müssen unter den gegebenen Bedingungen hydrophile Eigenschaften aufweisen, da sie auf hydrophobem Material nicht haften.

Bezieht man die Leucinproduktion auf die Zellkonzentration im Medium, so läßt sich eine scheinbare spez. Produktbildungsrate berechnen. Diese müßte höher sein als die tatsächliche spez. Produktbildungsrate von freien Mikroorganismen, da die unbekannte adsorbierte Biomasse in die Berechnung nicht mit eingeht. Es ergibt

sich jedoch für alle Gläser eine spez. Produktbildungsrate, die etwa der von freien Zellen entspricht. Die vor dem Kontakt mit Produktionsmedium gebundenen Zellen wurden demnach vollständig desorbiert. Dieser Vorgang ist vermutlich durch die sehr hohe Ionenkonzentration des Produktionsmediums P1 zu erklären, wodurch die anziehenden Ladungen der Oberflächen abgeschirmt werden. Die Adsorption der Bakterien erfolgt offensichtlich auf rein elektrostatischem Wege.



○—○ Phenylmethyl-Amino-funktionelles Glas nach Vorschrift 10

★--★ n-Heptyl-Amino-funktionelles Glas n. Vors. 9

□--□ Carboxyl-Amino-funktionelles Glas n. Vors. 8

△—△ Unbehandeltes Glas

◆--◆ Hydrophobisiertes Glas n. Vors. 7

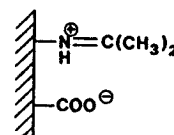
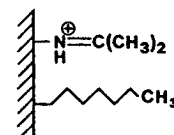
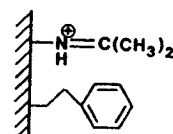


Abb. 4.18: Die Entwicklung der Leucinkonzentration im Vergleichsversuch 2 Produktionsmedium P1 (s. Tab. 3.4) war bereits einmal ausgetauscht worden

In dem in Abb. 4.18 dargestellten Versuch wurden unbehandelte, hydrophobisierte und mit verschiedenen Ladungen, wie angegeben, versehene Sinterglaskörper miteinander verglichen. Das hydrophobe Material weist im Vergleich zu unbehandeltem Glas wiederum keine verbesserte Leucinbildung auf. Die n-Heptyl-Amino- und Phenylmethyl-Amino-funktionellen Trägerkörper zeigen eine deutliche Steigerung der Aktivität. Es ist zu vermuten, daß der Effekt rein auf den positiven Ladungen beruht. Bei dem Carboxyl-Amino-funktionellen Glas ist der adsorptionsfördernde Einfluß der positiven Ladungen durch die zusätzlichen negativen Ladungen fast vollständig aufgehoben.

Da sich positive Ladungen auf den Trägerkörpern für die Adsorption der Corynebakterien als günstig erwiesen hatten, wurde Vergleichsversuch 3 (nicht dargestellt) mit unbehandeltem, Amino-funktionellem (Vorschrift 3, Kap. 3.3.1.1.), Triamino-funktionellem (Vors. 4) und Imidazol-funktionellem Sinterglas (Vors. 6) durchgeführt. Das Triamino-funktionelle Glas wies erwartungsgemäß die höchste Leucinbildung auf. Das Imidazol-funktionelle Glas zeigte im Vergleich zu unbehandeltem Material nur eine geringe Steigerung der Aktivität.

OBERFLÄCHENMODIFIZIERUNG VON GLAS

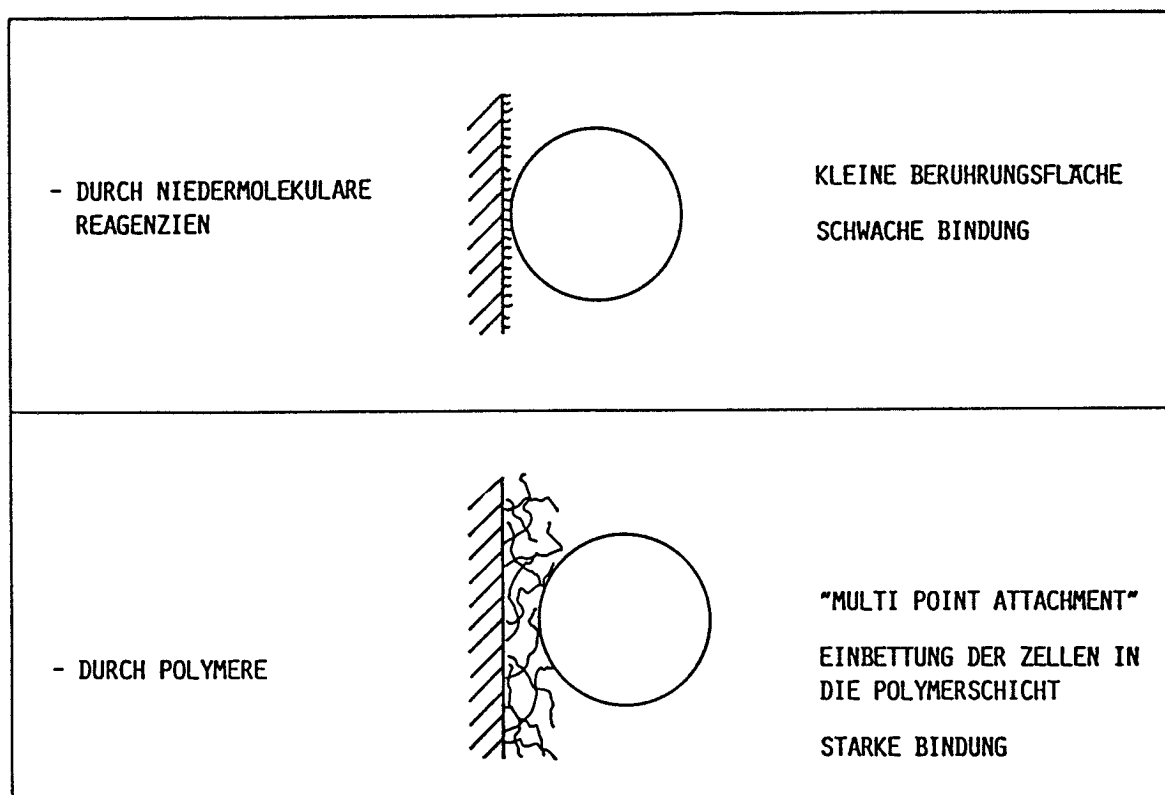


Abb. 4.19: Theoretische Vorteile einer Oberflächenmodifizierung durch makromolekulare Substanzen

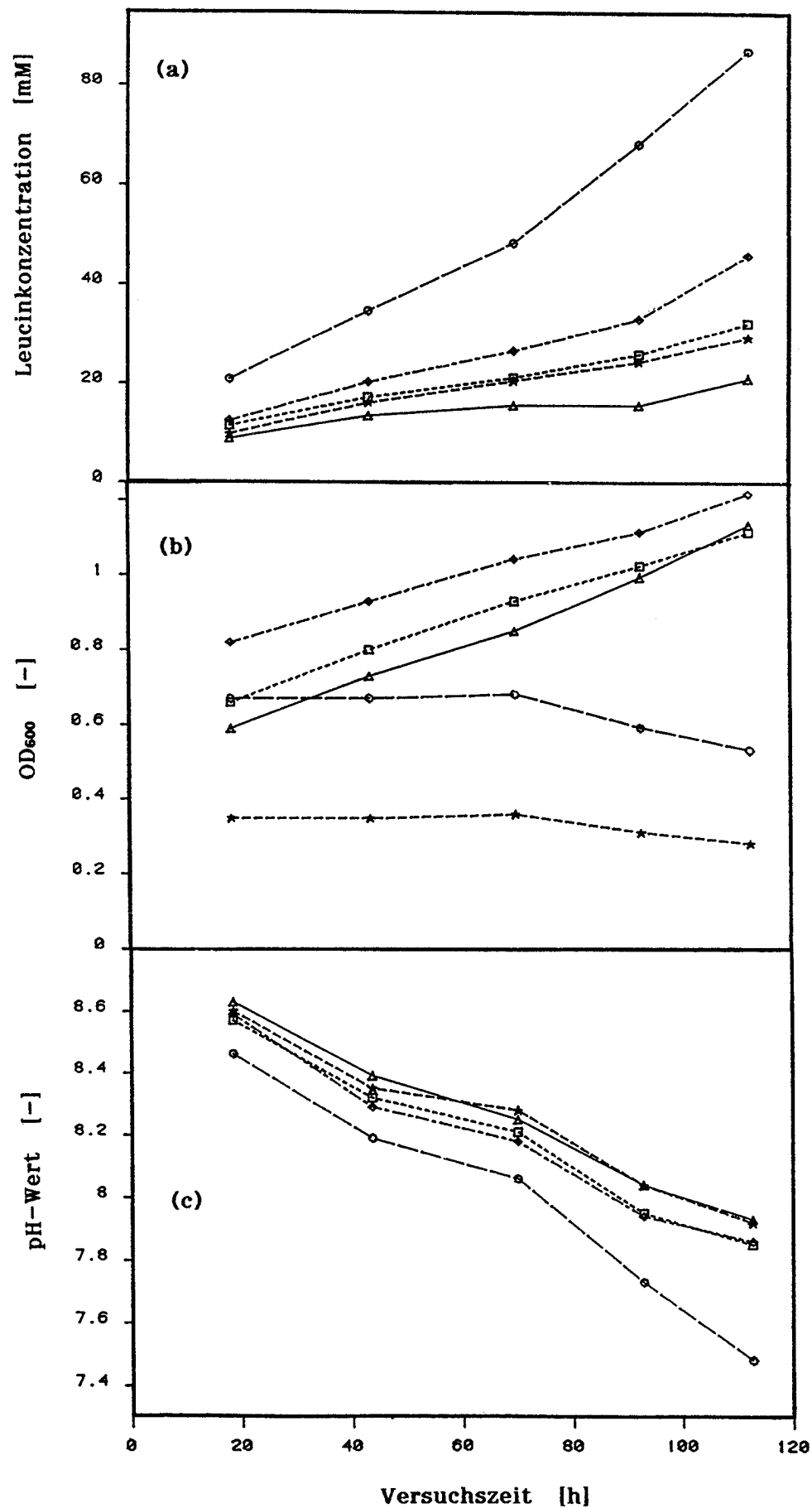
Neben einer Oberflächenmodifizierung mit niedermolekularen Substanzen können auch Polymere eingesetzt werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen lassen erkennen, daß die Sinterglaskörper eine sehr glatte Oberflächenstruktur besitzen. Diese wird durch eine Modifizierung mit niedermolekularen Substanzen kaum verändert. Setzt man einen Mikroorganismus mit einer kugeligen Form voraus, so besitzt er mit einer glatten Oberfläche nur eine punktförmige Berührungsfläche (s. Abb. 4.19). Die resultierenden Bindungskräfte sind daher relativ klein. Wird die glatte Glasoberfläche jedoch durch makromolekulare Substanzen modifiziert, so ist mit einer größeren Berührungsfläche und damit starken Bindungskräften zu rechnen (s.a. Kap. 2.4.3.).

Der in Abb. 4.20 dargestellte Vergleichsversuch 4 bestätigt diese Überlegungen. Es kamen neben Triamino-funktionellem Glas auch Polyamino-funktionelles und mit DEAE-Dextran behandeltes Material zum Einsatz. In dieser Reihenfolge nimmt die Leucinbildung zu.

Bei diesem Versuch wurde weiterhin der günstige Einfluß der Vorbehandlung der Sinterglaskörper vor der Oberflächenmodifizierung demonstriert. Es zeigt sich, daß für die kovalente Bindung der Silane die Glasoberfläche durch Säure aktiviert werden muß (s. Abb. 2.5; S. 19). Die bei dieser Vorbehandlung erzeugten negativ geladenen Silanolgruppen bewirken offenbar auch im Fall der adsorptiven Bindung des positiv geladenen Polymers, DEAE-Dextran, eine Verstärkung der elektrostatischen Haftung. Für die weiteren Versuche wurde ausschließlich Säure-behandeltes Glas verarbeitet.

Die Zellkonzentration im Medium weist bei den silanisierten Sinterglaskörpern die übliche leicht ansteigende Tendenz aufgrund von Wachstum auf (s. Abb. 4.20b). Bei den DEAE-Dextran-behandelten Gläsern wird dagegen eine Abnahme der OD₆₀₀, also Readsorption der Zellen beobachtet. Der Grund liegt in dem anfänglich hohen pH, bei dem die monomeren DEAE-Gruppen des Dextrans (pKs-Wert = 9.2, s. Abb. 4.24; S. 109) nur teilweise protoniert sind. Beim Absinken des pH-Wertes nimmt daher auch die elektrostatische Anziehungskraft der DEAE-Dextran-behandelten Sinterglaskörper zu. Die Ionenstärke des Produktionsmediums P2 war gegenüber Medium P1 (s. Tab. 3.4) herabgesetzt worden, wodurch die Ladungen der Oberflächen weniger stark abgeschirmt werden.

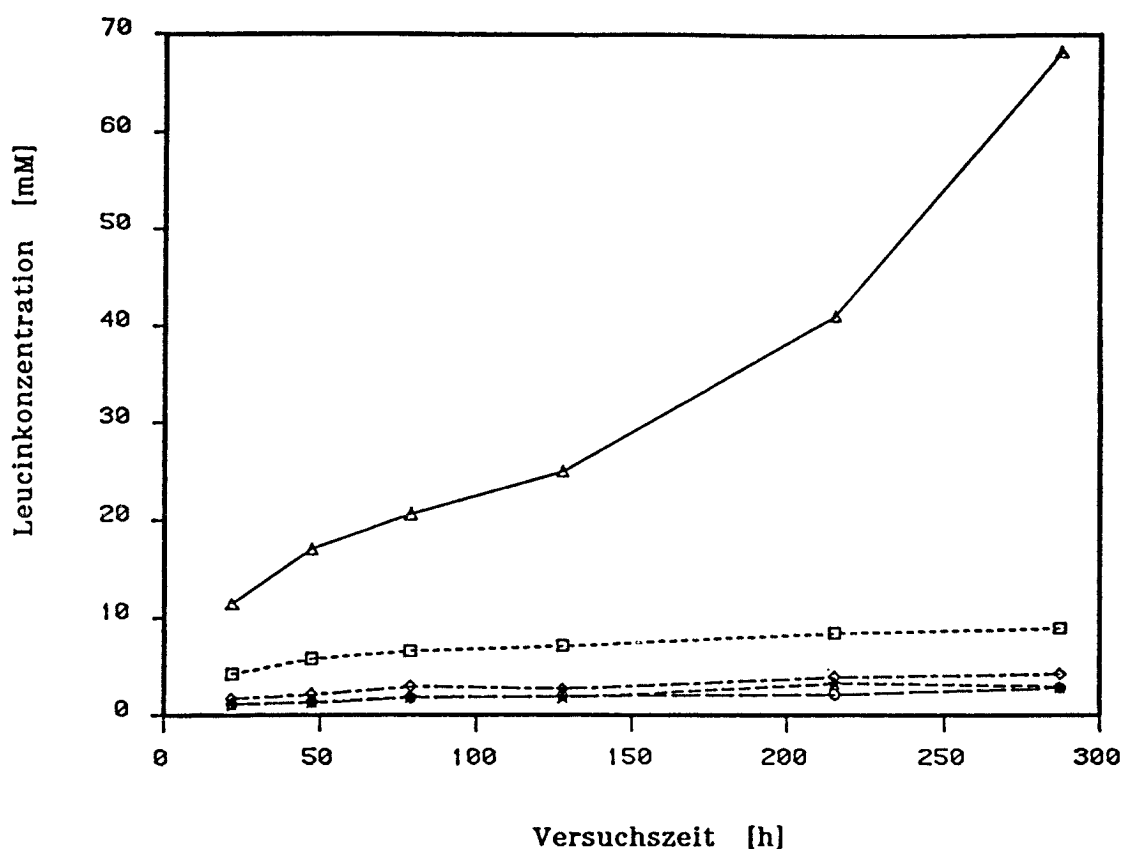
In dem in Abb. 4.21 dargestellten Vergleichsversuch 5 wurden neben DEAE-Dextran-behandelten Sinterglaskörpern weitere durch makromolekulare Substanzen modifizierte Materialien, wie angegeben, eingesetzt. Die beiden EUDRAGIT Typen zeigen keine verbesserte Leucinbildung im Vergleich mit unbehandeltem Material. Das könnte an dem relativ geringen Substitutionsgrad mit Aminogruppen, dem vergleichsweise geringen Molekulargewicht und an dem hydrophoben Kohlenwasserstoffgrundgerüst der Substanzen liegen. Ein ebenfalls unzureichendes Ergebnis wurde mit Chitosan erzielt, was vermutlich auf die Herstellung des Materials zurückzuführen ist. Chitosanlösungen der verwendeten Konzentration sind äußerst dickflüssig und dringen nur schwer in die porösen Sinterglaskörper ein. Auf glatten Glasscheiben dagegen konnten mit verdünnten Chitosanlösungen gute Ergebnisse erzielt werden (Champluvier et al., 1987). Die weitaus höchste Leucinbildung wurde mit DEAE-Dextran-behandelten Sinterglaskörpern erzielt.



- ◊—◊ DEAE-Dextran(Sigma)-behandeltes Glas nach Vorschrift 11 (vorbeh. ¹⁾)
- ◊--◊ Polyamino-funktionelles Glas n. Vors. 5 (vorbeh. ¹⁾)
- ◻---◻ Triamino-funktionelles Glas n. Vors. 4 (vorbeh. ¹⁾)
- ★--★ DEAE-Dextran(Sigma)-behandeltes Glas nach Vorschrift 11 (nicht vorbeh. ¹⁾)
- △—△ Triamino-funktionelles Glas n. Vors. 4 (nicht vorbeh. ¹⁾)

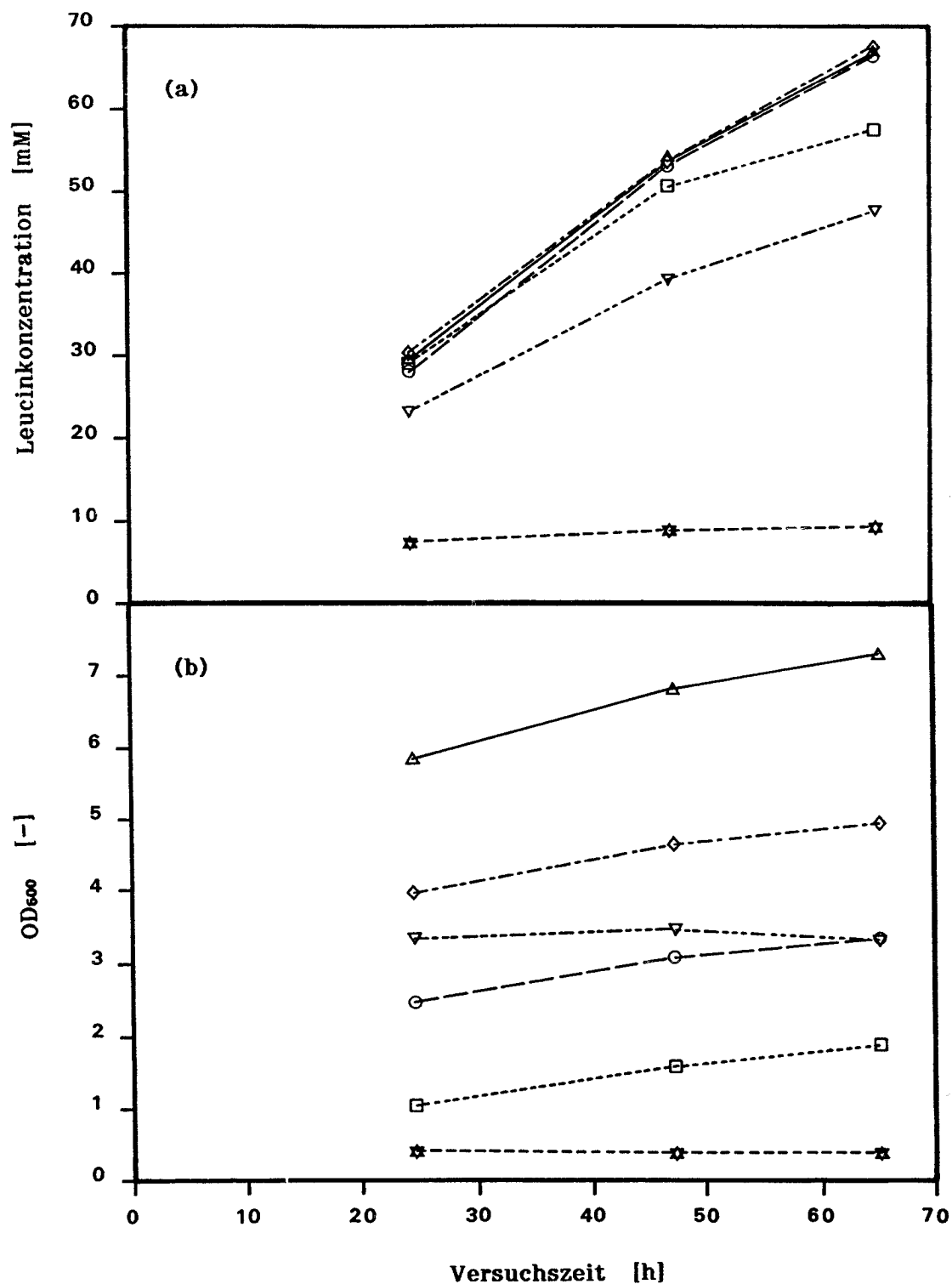
Abb. 4.20: Die Entwicklung der Leucinkonzentration (a), OD₆₀₀ (b) und des pH-Wertes (c) im Vergleichsversuch 4

¹⁾ Glasmaterial vorbehandelt bzw. nicht vorbehandelt mit HNO₃ nach Vorschrift 1 Produktionsmedium P2 (s. Tab. 3.4) war bereits zweimal ausgetauscht worden



- △—△ DEAE-Dextran(Sigma)-behandeltes Glas nach Vorschrift 11
- ◻---◻ Chitosan-behandeltes Glas n. Vors. 12
- ◊--◊ EUDRAGIT RL-behandeltes Glas n. Vors. 14
- ★--★ EUDRAGIT E-behandeltes Glas n. Vors. 13
- Unbehandeltes Glas

Abb. 4.21: Die Entwicklung der Leucinkonzentration im Vergleichsversuch 5
Produktionsmedium P2 (s. Tab. 3.4) war bereits zweimal ausgetauscht worden



- DEAE-Dextran (P&L Dormacid Standard) nach Vorschrift 11
- ◇--◇ DEAE-Dextran (P&L Dormacid Wi 63) n. Vors. 11
- △—△ DEAE-Dextran (Sigma D 9885) n. Vors. 11
- Kovalente Bind. durch Glutardialdehyd n. Vors. 21
- ▽--▽ Kovalente Bind. durch Carbodiimid n. Vors. 22
- ☆--☆ Kovalente Bind. durch "aktiven Ester" n. Vors. 23

Abb. 4.22: Leucinkonzentration (a) und OD₆₀₀ (b) im ersten Produktionsabschnitt des Vergleichsversuches 6

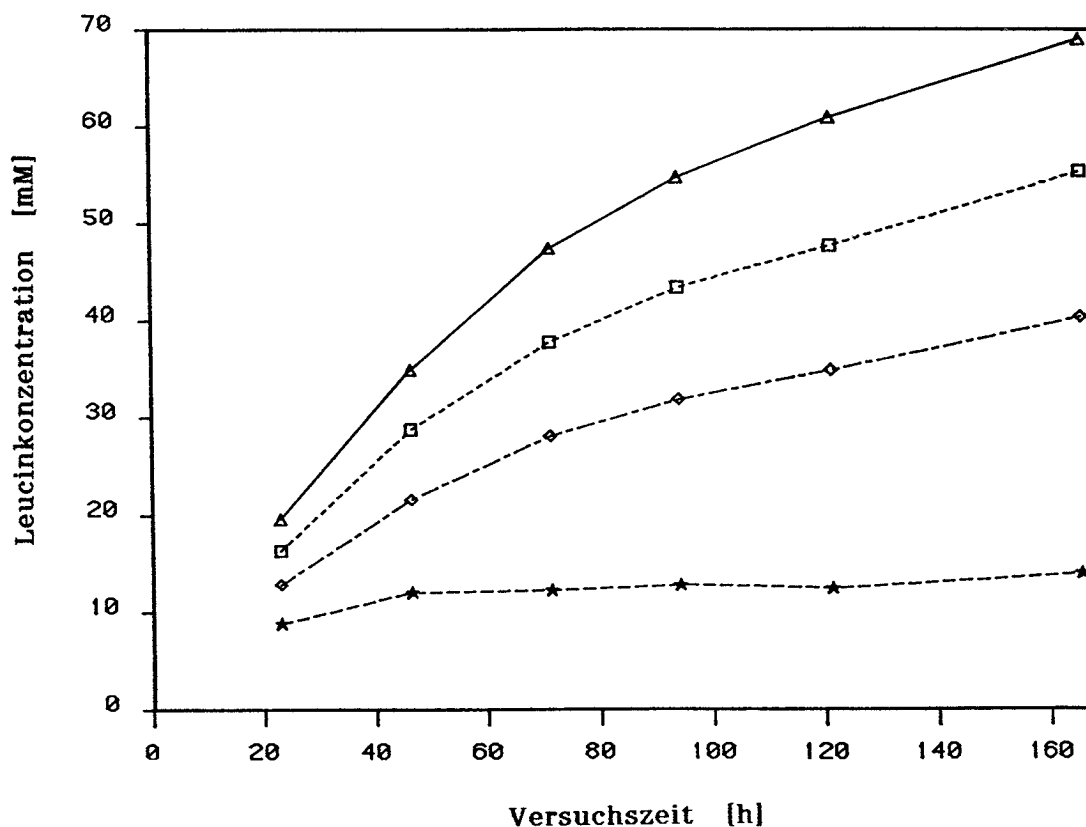
Adsorbierte Biomasse (Meßmethode s. Text) der Sinterglaskörper [mgTS/gGlas] vor dem ersten Waschen und Kontakt mit Produktionsmedium P3 (s. Tab. 3.4) :

DEAE-Dextran (P&L Dormacid Standard)	n. Vors. 11, Kap. 3.3.1.2.	9.5
DEAE-Dextran (P&L Dormacid Wi 63)	"	9.7
DEAE-Dextran (Sigma D 9885)	"	9.9
Kovalente Bind. durch Glutardialdehyd	n. Vors. 21, Kap. 3.3.2.	11.0
Kovalente Bind. durch Carbodiimid	n. Vors. 22	6.3
Kovalente Bind. durch "aktiven Ester"	n. Vors. 23	4.9

Für die starke Bindungsfähigkeit des DEAE-Dextrans für *C. glutamicum* könnten neben elektrostatischen Wechselwirkungen auch spezifische Mechanismen verantwortlich sein, die auf das Grundgerüst der Substanz zurückzuführen sind. So ist bekannt, daß unsubstituiertes Dextran, welches von einigen Mikroorganismen der Mundflora produziert wird, für die Bildung von Zahnbelag mitverantwortlich ist. *Streptococcus mutans* sp., welche als die Hauptverursacher von Karies angesehen werden, agglutinieren bei Zugabe von Dextran, nicht jedoch durch andere Polysaccharide (Calleja, 1984).

Im Vergleichsversuch 6 wurden verschiedene DEAE-Dextran Typen zur Oberflächenmodifizierung eingesetzt und die Ergebnisse mit drei Methoden zur kovalenten Bindung der Mikroorganismen verglichen. Um das Wachstum der Mikroorganismen weitgehend zu reduzieren, wurden die Zellen nach der Aufzucht jeweils zweimal gewaschen und in Aufzuchtmedium (s. Tab. 3.4), jedoch ohne Phosphat, kultiviert. Nachdem die oberflächenmodifizierten Sinterglaskörper mit der Mikroorganismensuspension geschüttelt worden waren, wurde jeweils die Zellkonzentration im Überstand ermittelt (sinngemäß modifizierte Methode n. Kap. 3.2.11.). Die daraus errechnete adsorbierte Biomasse ist in der Unterschrift von Abb. 4.22 aufgeführt. Durch die DEAE-Dextran-behandelten Gläser und die kovalente Bindung mit Glutardialdehyd wurden etwa gleich viel Zellen gebunden. Die übrigen zwei Methoden ergaben eine geringere Ausbeute an immobilisierten Zellen. Diese Zahlenwerte korrelieren sehr gut mit der Leucinbildung nach der ersten Zugabe von Produktionsmedium (s. Abb. 4.22a). Die DEAE-Dextran- und die Glutardialdehyd-Gläser sind vergleichbar. Das Carbodiimid-Glas weist eine entsprechend geringere Aktivität auf. Die Methode der kovalenten Bindung durch den "aktiven Ester" hat offenbar toxische Nebenwirkungen auf die Zellen.

Aus der Konzentration der freien Zellen im Medium lassen sich Unterschiede in der Bindungsstärke der einzelnen Gläser bei erhöhter Ionenstärke ablesen (s. Abb. 4.22b). Die freie Zellkonzentration nimmt in der Reihenfolge: Glutardialdehyd-Glas, P&L Standard-, P&L Wi 63- und Sigma-DEAE-Dextran-Glas zu (bei etwa gleicher Gesamtbiomasse!). Die Bindungsstärke nimmt also entsprechend ab. Dieses Ergebnis wird durch die Leucinbildung im zweiten Produktionsabschnitt bestätigt, nachdem die Reaktoren, wie üblich, gespült worden waren (s. Abb. 4.23).



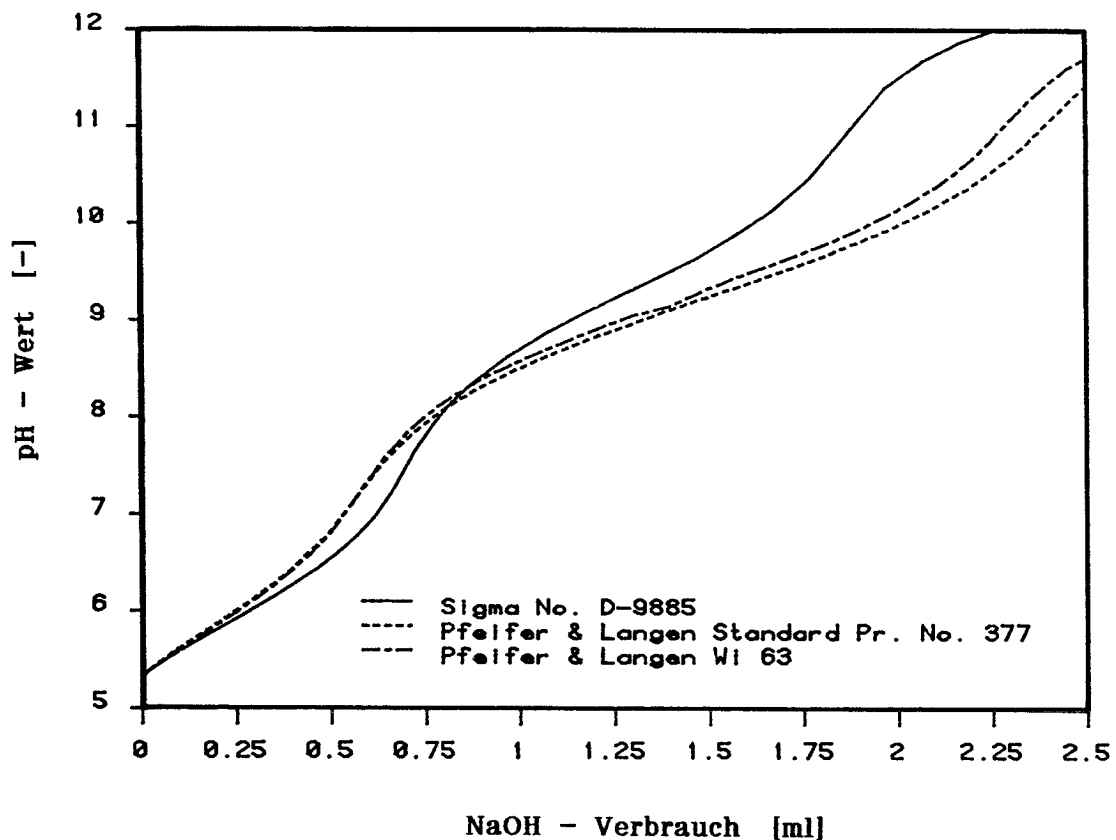
- ▲—▲ Kovalente Bind. durch Glutardialdehyd nach Vorschrift 21
- DEAE-Dextran (P&L Dormacid Standard) n. Vors. 11
- ◆---◆ DEAE-Dextran (P&L Dormacid Wi 63) n. Vors. 11
- ★---★ DEAE-Dextran (Sigma D 9885) n. Vors. 11

Abb. 4.23: Leucinkonzentration im zweiten Produktionsabschnitt des Vergleichsversuches 6

Die unterschiedlichen Eigenschaften der DEAE-Dextrane von Sigma und Pfeifer & Langen lassen sich durch die in Abb. 4.24 dargestellten Titrationskurven erläutern. Es sind bei allen drei Substanzen zwei Abflachungen im Bereich von pH 9.2 und pH 6.2 zu erkennen. Diese stimmen in etwa mit den von Schwengers (1984) angegebenen pK_s -Werten der monomeren (9.2) und dimeren (6.5, bezieht sich auf die endständige tertiäre Aminogruppe) DEAE-Gruppen überein. Das Sigma-Produkt enthält offenbar besonders viele dimere Gruppen, da die Abflachung (Pufferwirkung) im Bereich von pH 6.2 vergleichsweise stark ausgeprägt ist. Die Pfeifer & Langen-Produkte hingegen tragen besonders viele monomere Gruppen, was mit den Angaben des Herstellers übereinstimmt.

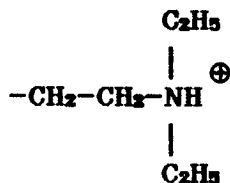
Diese Unterschiede machen sich bei der ersten Adsorption von Zellen aus der konzentrierten Suspension allerdings noch nicht bemerkbar. Diese erfolgt in 150 mM NaCl-Lösung (s. Kap. 3.1.3.) bei einem pH-Wert von etwa 6. Unter diesen

Bedingungen sind die meisten monomeren und dimeren DEAE-Gruppen protoniert. Daher wurde bei diesem Schritt von den verschiedenen DEAE-Dextran-behandelten Gläsern etwa die gleiche Menge Biomasse aufgenommen. Bei dem pH-Wert des Produktionsmediums (7.5 - 8.5) dagegen sind die endständigen Aminofunktionen der dimeren DEAE-Gruppen nicht protoniert. Da alle DEAE-Dextrane den gleichen Stickstoffgehalt aufweisen, resultiert daraus eine geringere Gesamtladung des Sigma-Produktes und damit eine schlechtere Bindungsstärke.



Monomere DEAE-Gruppe

pKs: 9.2



Dimere DEAE-Gruppe

pKs: 6.5

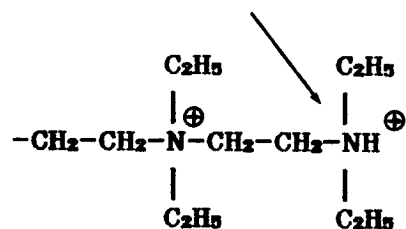


Abb. 4.24: Titrationskurven von unterschiedlichen DEAE-Dextranen
Titration von 50 ml 3 %ige DEAE-Dextranlösung mit 1 n NaOH
Die DEAE-Gruppen sind im protonierten Zustand dargestellt

Der Unterschied zwischen den beiden Pfeifer & Langen Produkten ist vermutlich auf die Molekülstruktur zurückzuführen. Der Standardtyp liegt wahrscheinlich als linear ausgestreckter Polymerfaden vor (s.a. Kap. 2.4.3). Aus Messungen der Grenzviskosität läßt sich schließen, daß bei einem Molekulargewicht $> 6 \cdot 10^5$ eine Faltung der Polymerfäden einsetzt (Schwengers, 1987). Die Ausdehnung und Ausrichtung des DEAE-Dextran Typs WI 63 (Mol. Gew. 10^6) dürfte daher ungünstiger sein als bei dem Standardtyp (Mol. Gew. $6 \cdot 10^5$). Eine vergleichsweise hohe Affinität des P&L DEAE-Dextrans Standard für die Zellen wurde auch in Flockulationsversuchen gefunden.

Die kovalente Bindung (mit Glutardialdehyd) brachte im Hinblick auf Menge der immobilisierten Mikroorganismen und Stabilität der Bindung die besten Resultate. Die Unterschiede gegenüber der adsorptiven Bindung durch geeignete DEAE-Dextrane sind jedoch gering (s. Abb. 4.23). Unter praktischen Aspekten ist die adsorptive Bindung auf jeden Fall vorzuziehen.

Die in diesem Kapitel untersuchten Sinterglasmaterialien zeigen große Unterschiede in der Aktivität, d.h. Bindungsfähigkeit für Mikroorganismen, in Abhängigkeit von der eingesetzten Methode der Oberflächenbehandlung. Die registrierten Effekte lassen sich aufgrund von physikochemischen Gesetzmäßigkeiten theoretisch erklären.

4.2.2. Optimierung durch Bestimmung der adsorbierten Biomasse

4.2.2.1. DEAE-Dextran

Die weitere Optimierung der Oberflächenmodifizierung wurde durch Bestimmung der adsorbierten Biomasse vorgenommen. Diese ist in Abb. 4.25 über der DEAE-Dextran-Konzentration aufgetragen, die bei der Herstellung der Sinterglaskörper (Vorschrift 11) verwendet wurde. Bis zu etwa 3 g/l ist ein starker Anstieg der Bindungsfähigkeit des Materials zu beobachten, welche bei größeren Konzentrationen nur noch wenig zunimmt. In einem separaten Versuch konnten mit DEAE-Dextran-Lösungen von 50 und 75 g/l keine weiteren Verbesserungen mehr erzielt werden.

Bei diesen Versuchen werden bis zum Erreichen des Adsorptionsgleichgewichtes der Zellen auf dem Träger etwa 6 - 10 h benötigt. Für die Adsorption von *Saccharomyces cerevisiae* an mit kationischer Stärke behandeltem Sägemehl werden Zeiten von 6 h berichtet (Thonart et al., 1982).

Die Eignung von DEAE-Dextran-behandelten Sinterglaskörpern zur adsorptiven Bindung von Mikroorganismen konnte außer für *C. glutamicum* auch für *E. coli* und Bäckerhefe nachgewiesen werden (Büchs et al., 1987a).

In weiteren Versuchen wurden verschiedene Oberflächenmodifizierungen durch DEAE-Dextran miteinander verglichen und auf ihre Haltbarkeit hin untersucht.

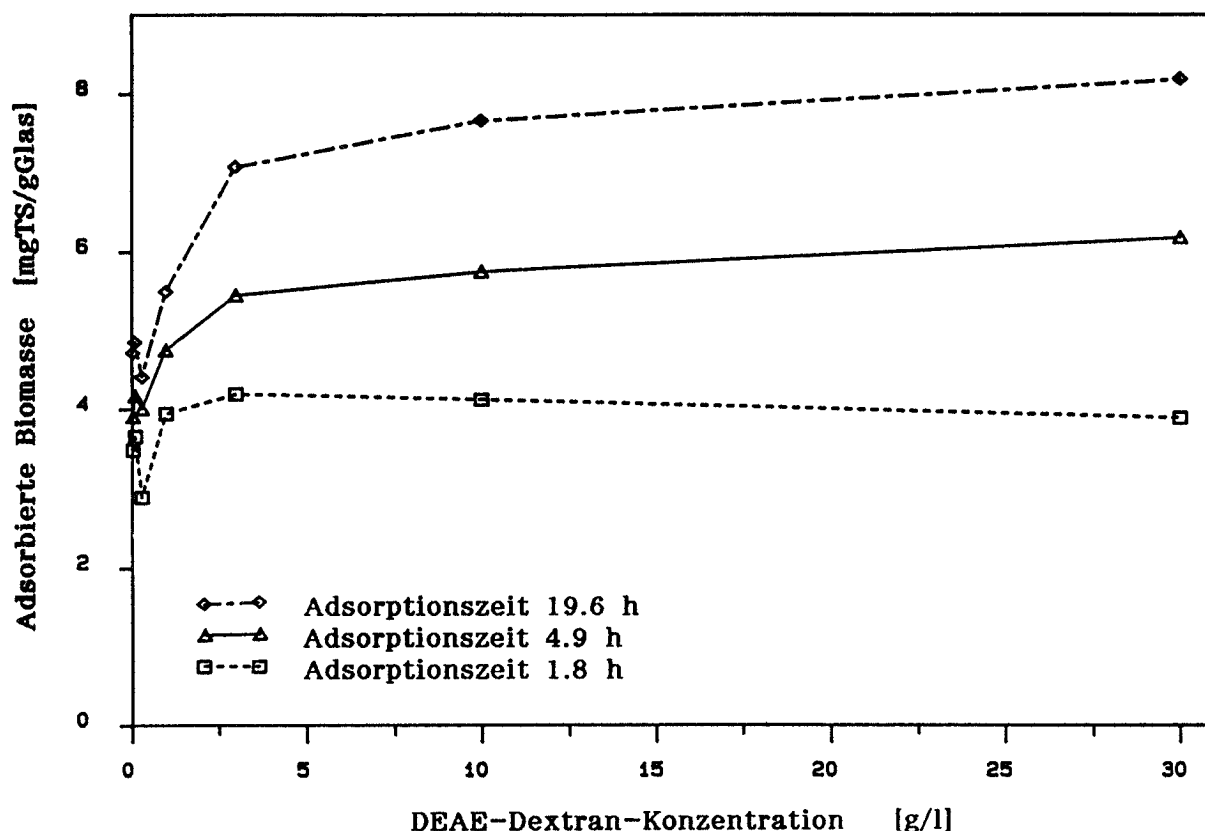


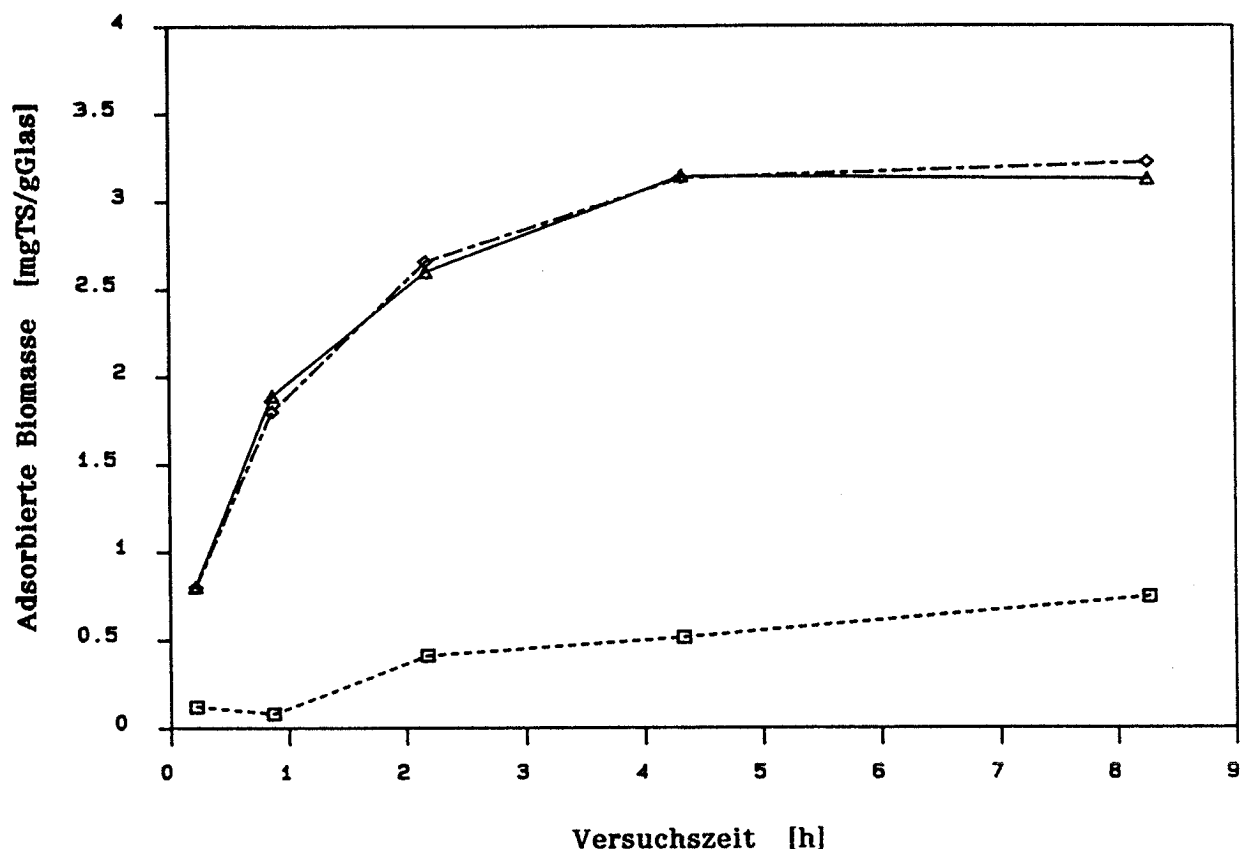
Abb. 4.25: Einfluß der DEAE-Dextran-Konzentration bei der Herstellung der Sinterglaskörper auf die Bindungsfähigkeit für Mikroorganismen
 Behandlung nach Vorschrift 11, Kap. 3.3.1.2. mit DEAE-Dextran(P&L Standard)-Konzentrationen wie angegeben, Adsorption aus Zellsuspension ($OD_{600} = 41.5$) in 350 mM NaCl

Die durch adsorptiv und kovalent gebundenes DEAE-Dextran modifizierten Sinterglaskörper (Vorschrift 11 bzw. 18) adsorbierten etwa die gleiche Menge Zellen. Materialien, die durch die beiden Methoden zur Quervernetzung von adsorbiertem DEAE-Dextran (n. Vors. 16) gewonnen wurden, besaßen dagegen keinerlei Bindungsfähigkeit für Corynebakterien. Ein Grund für diesen drastischen Effekt der Quervernetzung ist nicht bekannt.

Zur Untersuchung der Haltbarkeit der Oberflächenmodifizierungen wurden die Gläser eine Woche lang täglich mit frischer 1 M Na_2CO_3 -Lösung, pH 11.5 geschüttelt. Bei Material mit kovalent gebundenem DEAE-Dextran führte diese Nachbehandlung zu keiner Änderung der Bindungsfähigkeit für Mikroorganismen im anschließenden Adsorptionsversuch im Vergleich zu nicht nachbehandeltem Material.

Wie Abb. 4.26 zeigt, hat das Lösungsmittel bei der Herstellung der kovalenten Bindung (n. Vors. 18) keinen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit und Haltbarkeit der kovalenten Oberflächenmodifizierung mit DEAE-Dextran. Die Bindungsfähigkeit des Materials mit adsorbiertem DEAE-Dextran ist jedoch

deutlich reduziert. Bei einem pH von 11.5 liegen die Aminogruppen des DEAE-Dextrans nicht protoniert vor ($pK_s = 6.5$ bzw. 9.2), so daß sich wahrscheinlich ein Großteil der Makromoleküle wegen fehlender elektrostatischer Anziehungskräfte von der Unterlage ablöst. Behandelt man das Material in analoger Weise mit 1 M NaCl-Lösung, so bleibt die Bindungsfähigkeit sowohl bei kovalent als auch adsorptiv mit DEAE-Dextran behandelten Trägerkörpern unverändert.



▲—▲ Glas mit kovalent gebundenem DEAE-Dextran (in DMSO)
 ◆---◆ Glas mit kovalent gebundenem DEAE-Dextran (in H₂O)
 □---□ Glas mit adsorbiertem DEAE-Dextran

Abb. 4.26: Haltbarkeit verschiedener Oberflächenmodifikationen durch DEAE-Dextran

Materialien mit kovalent gebundenem DEAE-Dextran n. Vors. 18, Kap. 3.3.1.4.; Material mit adsorbiertem DEAE-Dextran (P&L Stand.) nach Vorschrift 11, Kap. 3.3.1.2.; Die oberflächenmodifizierten Sinterglaskörper wurden eine Woche lang täglich mit frischer 1 M Na₂CO₃-Lösung, pH 11.5 geschüttelt, dann 12 h mit fließendem dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Adsorption aus Zellsuspension ($OD_{600} = 48.3$) in 350 mM NaCl

4.2.2.2. Polyethylenimin (PEI)

Vorversuche zeigten, daß durch Behandlung des Sinterglases mit Polyethylenimin (PEI) ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden wie mit DEAE-Dextran. Diese Ergebnisse müssen noch in Aktivitätsuntersuchungen verifiziert werden.

Sinterglaskörper mit adsorbiertem PEI (Vorschrift 15) und kovalent gebundenem PEI (Vorschrift 19 und Vorschrift 20) zeigten keinen wesentlichen Unterschied in ihrer Fähigkeit, Corynebakterien zu adsorbieren.

In Abb. 4.27 ist die Bindungsfähigkeit verschiedener PEI-modifizierter Materialien nach einer einwöchigen Behandlung mit 1 M Na_2CO_3 -Lösung, pH 11.5 dargestellt. Glas mit nur adsorptiv gebundenem PEI verlor gänzlich seine Wirkung. Das Glas mit quervernetztem PEI zeigte keine Einbuße der Bindungsfähigkeit im Vergleich zu nicht mit Na_2CO_3 -Lösung nachbehandeltem Material (nicht dargestellt). Die Bindungsfähigkeit der mit kovalent gebundenem PEI modifizierten Trägerkörper (Vorschrift 20) war nach der alkalischen Behandlung etwas reduziert, da die Peptidbindungen bei pH 11.5 teilweise hydrolysiert wurden.

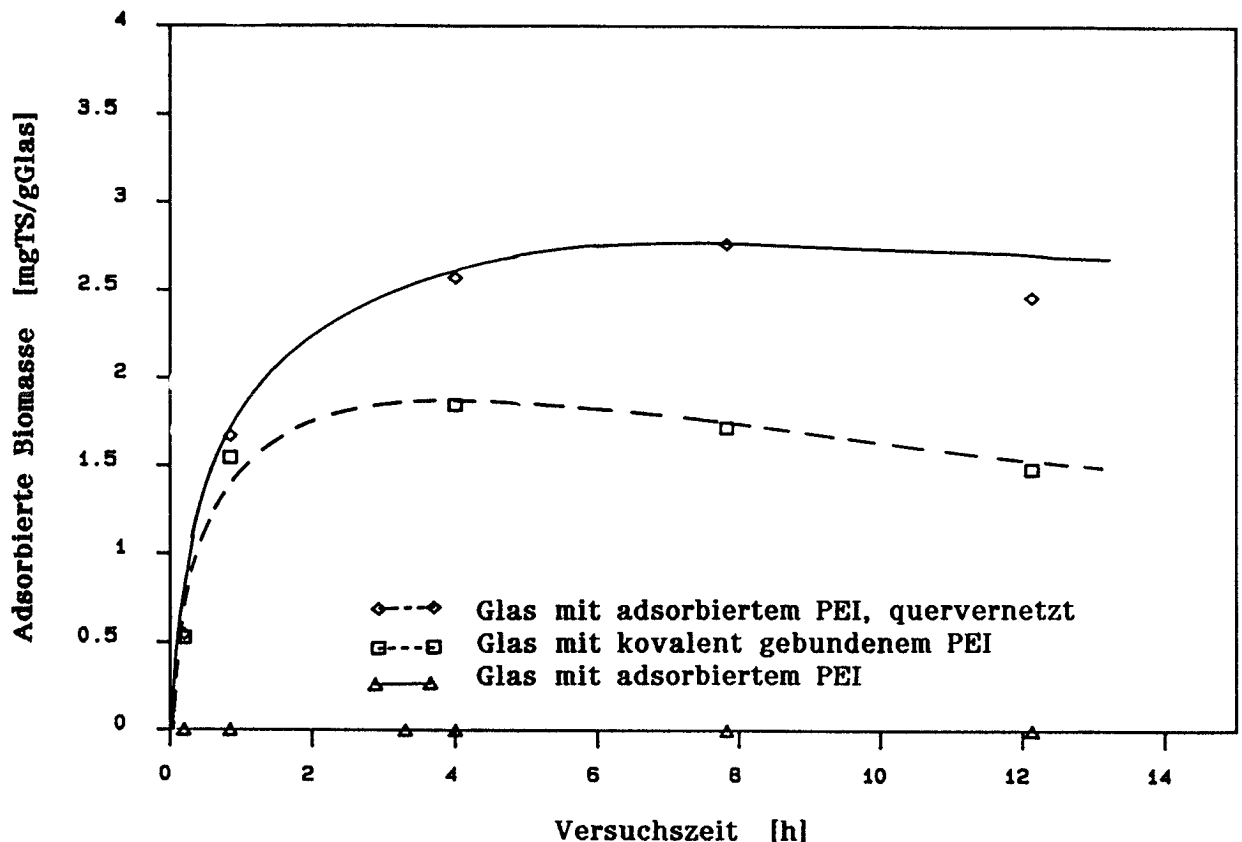


Abb. 4.27: Haltbarkeit verschiedener Oberflächenmodifikationen durch Polyethylenimin (PEI)

Material mit Quervernetzung von adsorbiertem PEI n. Vors. 17; Material mit kovalent gebundenem PEI n. Vors. 20; Material mit adsorbiertem Polyethylenimin nach Vorschrift 15, Kap. 3.3.1.; Die oberflächenmodifizierten Sinterglaskörper wurden eine Woche lang täglich mit frischer 1 M Na_2CO_3 -Lösung pH 11.5 geschüttelt, dann 12 h mit fließendem dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Adsorption aus Zellsuspension ($\text{OD}_{600} = 51.0$) in 350 mM NaCl

Die in dieser Arbeit entwickelten Materialien mit kovalent gebundener Polymerschicht (vor allem DEAE-Dextran) dürften für die industrielle Anwendung, bei der häufig mit alkalischen Reinigungsmitteln gearbeitet wird, besonders geeignet sein. Bei hohen pH-Werten wird eher die Glasunterlage angegriffen als die Oberflächenmodifizierung.

4.2.3. Abschätzung der theoretisch erreichbaren Zelldichten

Bei den Versuchen zur Bestimmung der adsorbierten Biomasse wurde eine maximale Beladung der Sinterglaskörper von etwa 10 mgTS/g ermittelt (s. Abb. 4.32; S. 123). Diese kann unter Verwendung von (Gl. 3.1) in die entsprechende Keimzahl umgerechnet werden. Mit den angenommenen durchschnittlichen Abmessungen der Corynebakterien von $\varnothing 0.6 \cdot 2 \mu\text{m}$ ergibt sich eine maximal mögliche Bedeckung der Glasoberfläche (dichteste Packung) von $8.3 \cdot 10^{11}$ Zellen/m². Aus der spez. Oberfläche des Sinterglasmaterials von 0.1 m²/g (Herstellerangaben) folgt, daß etwa 20 % der gesamten Oberfläche durch Mikroorganismen belegt sind. Einige der Mikroporen des Sinterglasmaterials, die in die Bestimmung der Gesamtoberfläche mit eingehen, sind für die Zellen vermutlich zu klein. Die Mikroorganismen verteilen sich statistisch auf der übrigen Oberfläche und können wegen gegenseitig abstoßender Kräfte nicht beliebig eng aneinander rücken (s. Kap. 4.3.). Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen kann man davon ausgehen, daß die verfügbare Oberfläche der Trägerkörper mit einer monozellularen Schicht von Mikroorganismen bedeckt ist.

Ein Vergleich der erzielten Biomassebeladung pro g Träger mit Literaturangaben (2 – 248 mgTS/g, Durand und Navarro, 1978) ist kaum möglich, da diese Größe sehr stark vom spez. Gewicht des Trägermaterials, dessen Oberfläche und den Adsorptionsbedingungen (rein physikochemische Adsorption oder "Aufwachsen") abhängt. Wichtiger ist die maximal erreichbare Zelldichte pro Reaktorvolumen. Sie läßt sich für das Sinterglas folgendermaßen abschätzen (kugelförmige Trägerkörper seien vorausgesetzt):

Aus der Dichte von Duran-Glas (~2.23 kg/l) und einer Porosität von 60 % errechnet sich eine scheinbare Dichte (s. Begriffsdefinition) der Sinterglaskörper von 0.89 g/ml. Das Volumen einer Kugelschüttung V_K ergibt sich aus dem Volumen der Sinterglaspartikel V_P (Reaktordurchmesser $\gg$ Partikeldurchmesser) nach Blaß (1978) zu:

$$V_K = V_P / 0.625 \quad [1] \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Wird mit einer Biomassebeladung von 10 mgTS/g Glas gerechnet, die mit einer rein physikochemischen Adsorption (monozelluläre Schicht) erreicht wurde, ergibt sich eine maximale Zelldichte von 5.6 gTS/l Reaktorvolumen.

Das ist ein relativ niedriger Wert, der auch in offener kontinuierlicher Kultur (mit frei suspendierten Zellen) erreicht werden kann. Mit einer monozellularen Bedeckung der Sinterglaskörper ist also keine wesentliche Erhöhung der Biomassekonzentration durch die Immobilisierung zu erzielen. Es sind folgende Auswege denkbar:

- 1) Verwendung von feinporigerem Material mit größerer Oberfläche. Engere Poren führen aber zu geringeren Diffusionsquerschnitten und zu einer schlechteren Versorgung der inneren Zonen der Sinterglaskörper.
- 2) Keine vollständige Unterdrückung des Wachstums der Mikroorganismen. Die Zellen vermehren sich auf der Trägeroberfläche und werden, wenn diese keinen Platz mehr bietet, in das umgebende Medium ausgeschieden. Das Flüssigvolumen in den Poren der Sinterglaskörper und zwischen ihnen wird als "Reaktionsort" mitgenutzt (vergleiche wachsende und ruhende Zellen, Abb. 4.35; S. 133).
- 3) Beladung der Trägeroberfläche mit mehreren Schichten von Mikroorganismen. Liegt eine einschichtige Bedeckung der Oberfläche des Trägermaterials vor, so sind deren anziehenden Kräfte für die frei suspendierten Zellen durch die bereits adsorbierten Zellen abgeschirmt. Für eine mehrschichtige Beladung der Trägeroberfläche sind daher die Zell-Zell-Wechselwirkungen entscheidend (s. nächstes Kap.).

In dieser Arbeit wurde in Hinblick auf eine Steigerung der immobilisierten Biomasse und hohe Raum-Zeit-Ausbeuten eine Kombination der letzten beiden Methoden angestrebt (s. folgende Kapitel; z.B. Ergebnisse zu Abb. 4.33; S. 125 und Abb. 4.36; S. 134).

4.3. Einfluß und Steuerung der Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen

Neben den Trägerkörpern, auf denen die Mikroorganismen adsorbieren, können auch die Oberflächeneigenschaften der Zellen selber beeinflußt werden. Dieses wurde durch in-vitro-Behandlung der Zellen mit Chemikalien versucht (Thonart et al., 1982; D'Souza et al., 1986; Rouxhet et al., 1987). Für eine kontinuierliche Kultur mit nachwachsenden Mikroorganismen sind die bisher ausgearbeiteten Methoden jedoch ungeeignet.

4.3.1. Bestimmung der Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen

Die folgenden Untersuchungen der Oberflächeneigenschaften von *C. glutamicum* wurden mit zwei Arten von Zellen durchgeführt.

- 1) Phosphor-gesättigte Zellen mit einem P-Gehalt von 3.1 Gew. %, aufgezogen in einem turbidostatisch geregelten Festbettumlaufreaktor bei ausreichender Phosphatzufuhr (Medium Normal, Tab. 3.5).
- 2) Phosphor-verarmte Zellen mit einem P-Gehalt von 0.5 Gew. %, aufgezogen in einem chemostatisch Phosphor-limitierten Festbettumlaufreaktor (Medium P-lim, Tab. 3.5).

4.3.1.1. Elementare Zusammensetzung der Zellwandoberfläche

Die mit der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie ermittelten Konzentrationsverhältnisse von Phosphor-gesättigten und -verarmten Zellen sind in Tabelle 4.15 angegeben. Nur beim Phosphor ergibt sich ein wesentlicher Unterschied von ~20 %, welcher mit dem Phosphorgehalt der ganzen Zellen korreliert.

Parameter		Phosphor-gesättigte Zellen	Phosphor-verarmte Zellen
P-Gehalt der ganzen Zellen [Gew. %]		3.1	0.5
Konzentrationsverhältnisse der Zellwandoberfläche [mol/mol]	O/C	0.21	0.23
	N/C	0.040	0.044
	P/C	0.0047	0.0011

Tabelle 4.15: Konzentrationsverhältnisse auf den Zellwandoberflächen von Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien

4.3.1.2. Oberflächenladung

Abb. 4.28 stellt die elektrophoretische Mobilität der Zellen als Funktion des pH-Wertes dar. Es ergeben sich keine großen Unterschiede zwischen beiden Zelltypen. Der isoelektrische Punkt liegt zwischen 2.5 und 3. Bei hohem pH ergibt sich eine negative Oberflächenladung, wie aus den Aktivitätsversuchen (Kap. 4.2.1.) bereits geschlossen wurde.

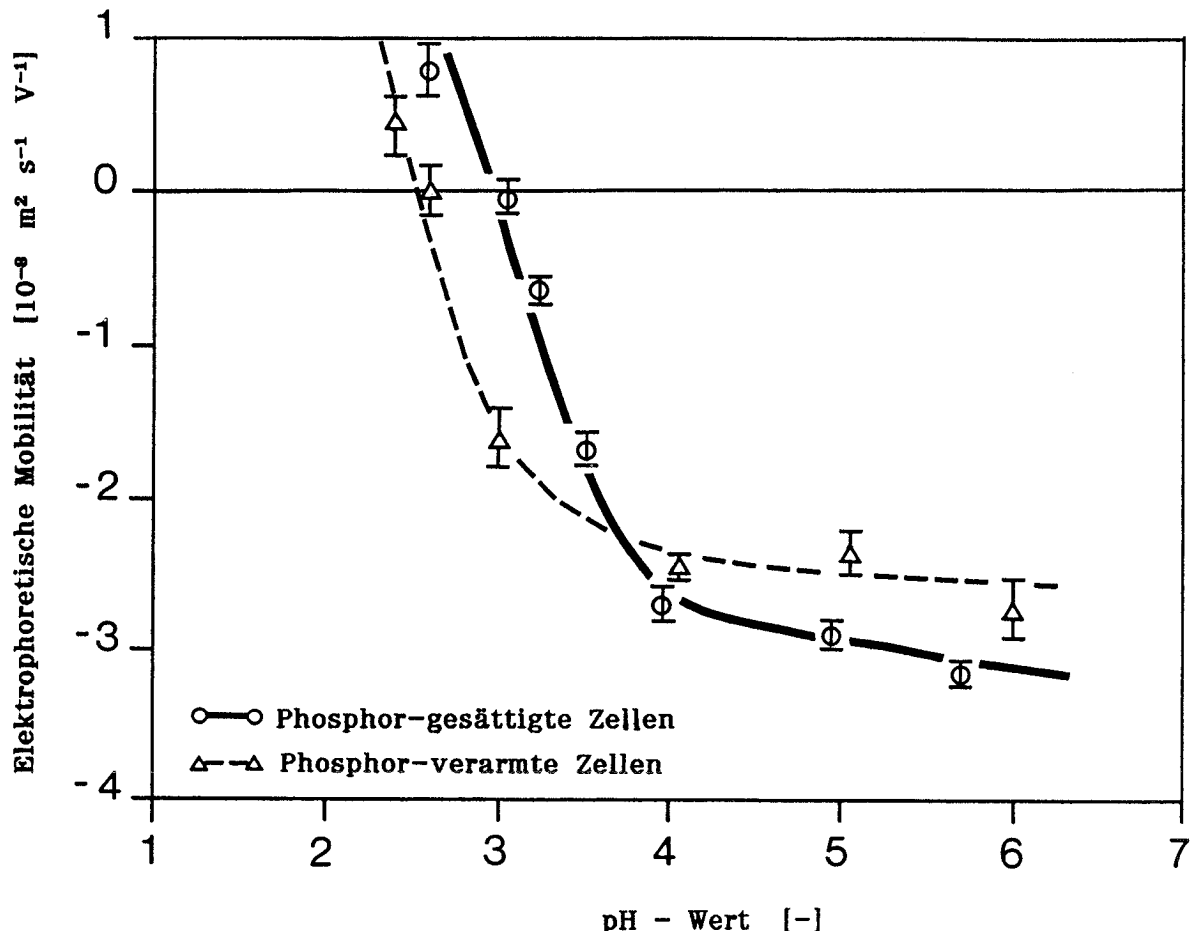


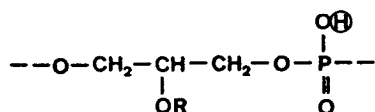
Abb. 4.28: Elektrophoretische Mobilität von Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien

Eddy und Rudin (1958) beobachteten eine deutliche Abnahme der Oberflächenladung bei Hefen infolge einer Phosphorverarmung. Amory et al. (1988b) konnten die elektrophoretische Mobilität von Hefen und Gram-negativen Mikroorganismen mit deren Phosphorgehalt der Zellwand korrelieren. Die Änderung der Ladung der Gram-positiven Corynebakterien ist dagegen vergleichsweise klein.

Die anionischen Gruppen auf der Oberfläche von Phosphor-gesättigten und -verarmten Zellen sind vermutlich nicht identisch. Nach Röllä (1976), Wicken (1985) und Naumova (1985) sind bei Gram-positiven Mikroorganismen die

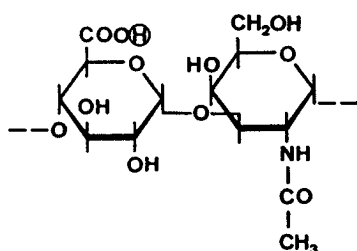
Teichon- und Teichuronsäuren auf der Zellwand für deren Ladungen verantwortlich. Diese beiden Substanzklassen wurden auch in coryneformen Bakterien, *Arthrobacter* sp. (Naumova, 1985) und *Corynebacterium poinsettiae* (Rogers et al., 1980) gefunden. Teichonsäuren, die 30 - 50 % von gereinigten Zellwandfraktionen ausmachen (Lambert et al., 1977), bestehen aus Glycerin- oder Ribitol-Phosphat-Polymerketten mit verschiedenen Zuckern und Alanin in den Seitenketten (s. Abb. 4.29a). Teichuronsäuren sind wie die Teichonsäuren

a)

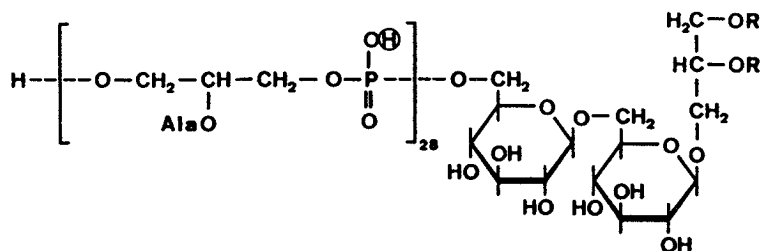


R = H, D-Alanin oder Glucose

b)



c)



Ala = D-Alanin

R = Langkettige Fettsäure

Abb. 4.29: Chemische Strukturformeln der Teichon-, Teichuron- und Lipoteichonsäuren

a): Teichonsäure (Glycerin-Phosphodiester-Polymer); (Ellwood und Tempest, 1972)

b): Teichuronsäure (Glucuronsäure-N-Acetylgalactosamin-Polymer); (Ellwood und Tempest, 1972)

c): Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* (Glycerin-Teichonsäure mit Glycolipid); (Lambert et al., 1977)

Die dissoziierfähigen Protonen sind eingekreist

anionische Polymere, die anstelle der Phosphatgruppen Carboxylgruppen enthalten (s. Abb. 4.29b). Ellwood und Tempest (1972) konnten nachweisen, daß bei Phosphorverarmung von *Bacillus subtilis* var. *niger* die Biosynthese der Teichonsäuren sofort eingestellt wird und diese durch Teichuronsäuren ersetzt werden. Es ist daher anzunehmen, daß der anionische Charakter der Phosphor-gesättigten Zellen durch die Phosphodiestergruppen der Teichonsäuren und der Phosphor-verarmten Zellen durch die Carboxylgruppen der Teichuronsäuren zustande kommt. Die unterschiedlichen pKs-Werte dieser Gruppen und deren Konzentration auf der Oberfläche der Zellen könnten für die leicht unterschiedlichen Verläufe der elektrophoretischen Mobilität verantwortlich sein.

4.3.1.3. Hydrophobizität

In Tabelle 4.16 sind Daten von einigen Mikroorganismen zusammengestellt, welche die Hydrophobizität ihrer Zelloberfläche beschreiben. Die Mikroorganismen wurden, wie in den ersten drei Reihen angegeben, in drei Klassen eingeteilt (Mozes and Rouxhet, 1987). Im Vergleich dazu sind die Ergebnisse der Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien aufgeführt. Die Phosphor-verarmten Zellen sind als hydrophil einzustufen, wie aus den Aktivitätsversuchen (Kap. 4.2.1.) bereits geschlossen wurde. Die Phosphor-gesättigten Zellen dagegen weisen eine deutlich hydrophobere Oberfläche auf.

Mikroorganismus	Kontaktwinkel [Grad]	Hydroph. Chromatographie [% Rückhaltung]		Qualitative Klassifizierung
		H3	L7	
<i>M. pollinis</i>	>90	100	40	sehr hydrophob
<i>E. aerogenes</i>	62	21	0	hydrophob
<i>K. fragilis</i>	53	100	0	
<i>K. oxytoca</i>	50	25	0	
<i>S. carlsbergensis</i>	35	95	0	
<i>A. aceti</i>	28	10	0	hydrophil
<i>S. cerevisiae</i>	26	12	0	
<i>C. glutamicum</i> (P-verarmt)	28	45	2	hydrophil
(P-gesättigt)	45	95	0	hydrophob

Tabelle 4.16: Klassifizierung der Hydrophobizität von verschiedenen Mikroorganismen

H3: Messung in 4 M NaCl, pH 3

L7: Messung in Wasser, pH 7

Für die Hydrophobizität der Zellwände von *Streptococci* sp. Gruppe A werden maßgeblich die Lipoteichonsäuren verantwortlich gemacht (Miörner et al., 1983). Diese Substanzklasse scheint in fast allen Gram-positiven Bakterien vorzukommen (Christensen et al., 1985) und macht bei *Streptococcus mutans* etwa 1 - 2 % der gesamten Zellmasse aus (Markham et al., 1975). Der hydrophile Teil der Moleküle besteht aus Glycerinteichonsäureketten, die an einem Ende mit hydrophoben Glycolipiden verbunden sind (s. Abb. 4.29c). Lipoteichonsäuren werden häufig mit Adhäsionsphänomenen von Mikroorganismen in Zusammenhang gebracht (Rölla, 1976; Jones, 1984; Christensen et al., 1985; Wicken, 1985). Nach Wicken und Knox (1980) scheiden viele Mikroorganismen (unabhängig von Lysevorgängen) Lipoteichonsäuren in signifikanten Mengen aus. Die Biosynthese der Lipoteichonsäuren wird, ähnlich wie bei den Teichonsäuren, eingestellt, sobald die Mikroorganismen unter Phosphatmangel stehen (Ward, 1981). Es ist daher anzunehmen, daß die unterschiedliche Hydrophobizität der Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien auf die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Lipoteichonsäuren zurückzuführen ist.

4.3.2. Flockulationseigenschaften der Mikroorganismen

Da für eine mehrschichtige Adsorption von Mikroorganismen auf festen Oberflächen die Zell-Zell-Wechselwirkungen entscheidend sind, wurden Flockulationsversuche angestellt.

Es zeigte sich, daß zur Flockulation in Fermentationsflüssigkeit suspendierte Zellen mehr anionisches Flockulationsmittel benötigen als in Wasser suspendierte Zellen. Durch die vergleichsweise hohe Ionenstärke der Fermentationsflüssigkeit wird offenbar ein Teil der Ladung des Flockulationsmittels abgeschirmt und damit wirkungslos. Die Ladung der Mikroorganismen und die Ionenstärke des Mediums sind daher wichtige Faktoren.

In Abb. 4.30 ist das Flockulationsverhalten von unlimitiert bzw. Schwefel-limitiert aufgezogenen Mikroorganismen mit unterschiedlichem Phosphorgehalt dargestellt. Es ergeben sich die typischen Flockulationskurven (s. Kap. 2.4.5.). Phosphor-reiche Corynebakterien benötigen, unabhängig von den Aufzuchtbedingungen, jeweils weniger Flockulationsmittel, d.h. sie flockulieren leichter, als Phosphor-verarmte. Dieser Zusammenhang wird durch Abb. 4.31 anhand von Ergebnissen mehrerer Versuche verdeutlicht. Über dem Phosphorgehalt der Corynebakterien sind die DEAE-Konzentrationen, welche maximale Flockulation der Zellen bewirken, aufgetragen. Es zeigt sich eine klare Korrelation jeweils für unlimitiert und Schwefel-limitiert aufgezogene Mikroorganismen. Der Grund für den Unterschied zwischen beiden Zelltypen ist nicht klar. Vermutlich existieren neben dem Phosphorgehalt noch weitere Faktoren, welche die Flockulationseigenschaften der Zellen beeinflussen. So flockulieren Corynebakterien, welche in Vollmedium (Schüttelkolben, O₂-Limitation!) aufgezogen wurden, bei besonders geringen DEAE-Dextran-Konzentrationen. Ein Einfluß von verschiedenen Antischaummitteln auf die Flockulation von *C. glutamicum* konnte nicht nachgewiesen werden.

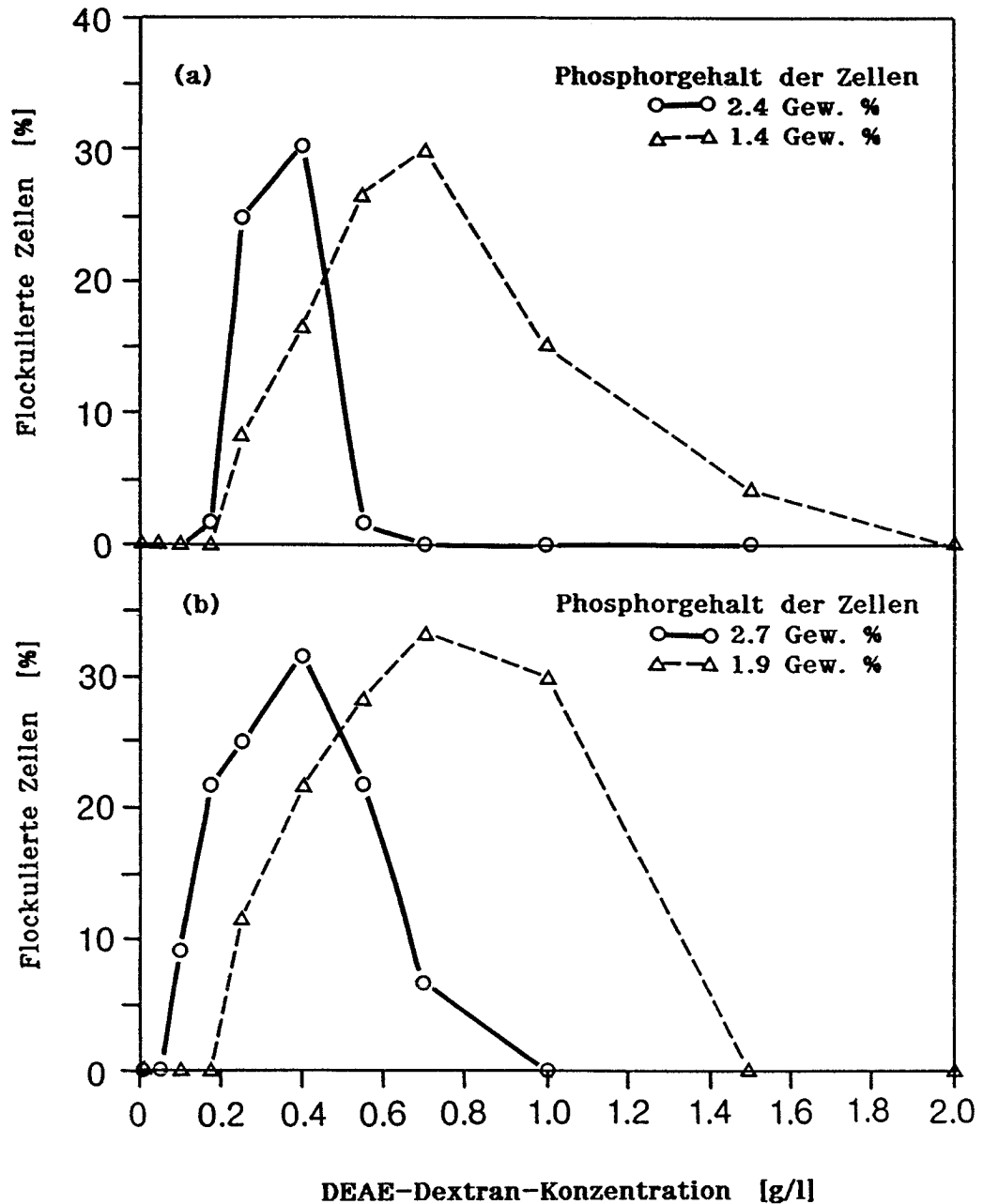


Abb. 4.30: Flockulation von Mikroorganismen unterschiedlicher Aufzucht in Abhängigkeit von der Konzentration des Flockulationsmittels (DEAE-Dextran)
(a): Aufzucht der Zellen im turbidostatisch geregelten Festbettumlaufreaktor mit Medium Normal (s. Tab. 3.5)
(b): Aufzucht im chemostatisch Schwefel-limitierten Festbettumlaufreaktor mit Medium S-lim (s. Tab. 3.5)
 Die Phosphatkonzentration der Medien und die Durchflußrate bzw. Zelldichte im Reaktor wurden variiert. Der Phosphorgehalt der Zellen ergibt sich aus einer Massenbilanz.

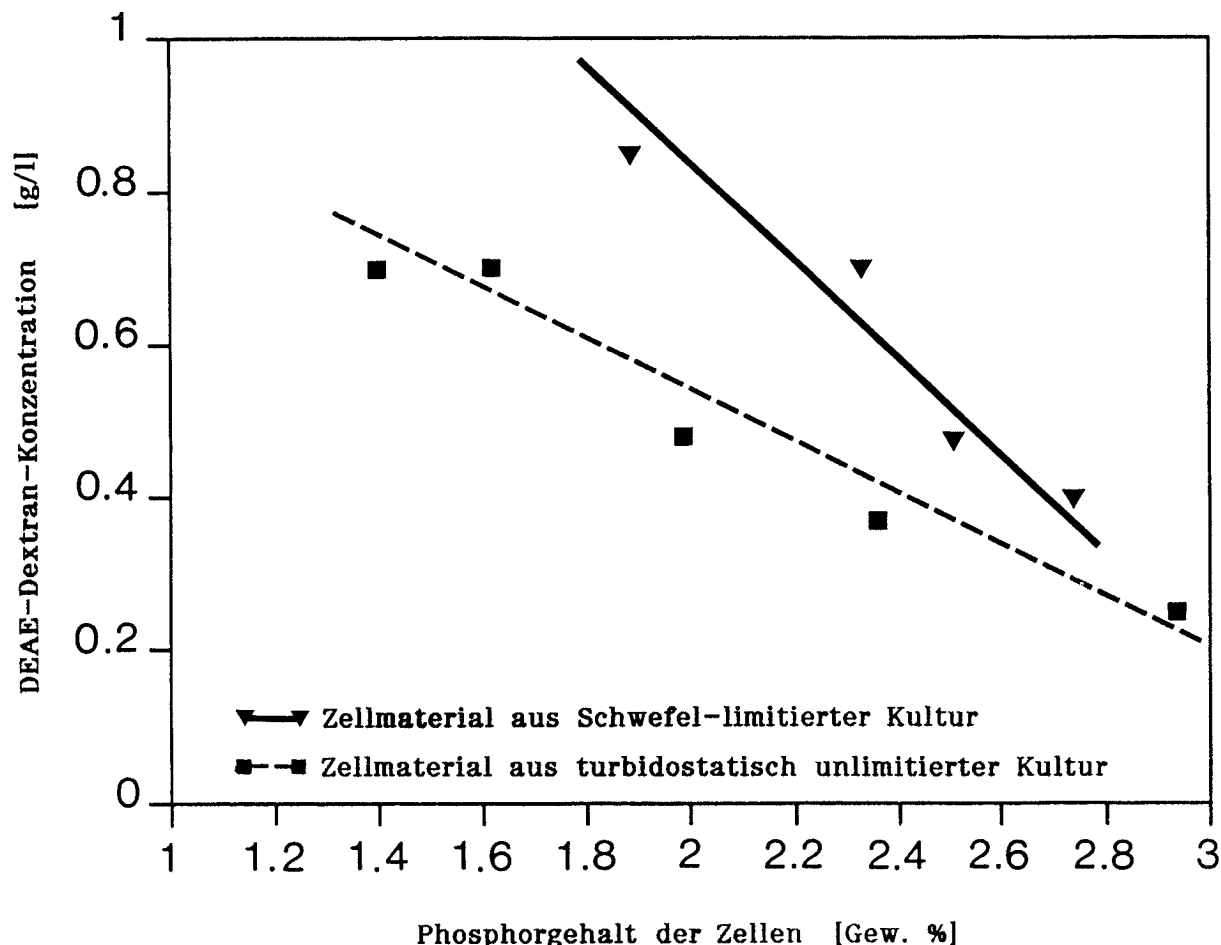
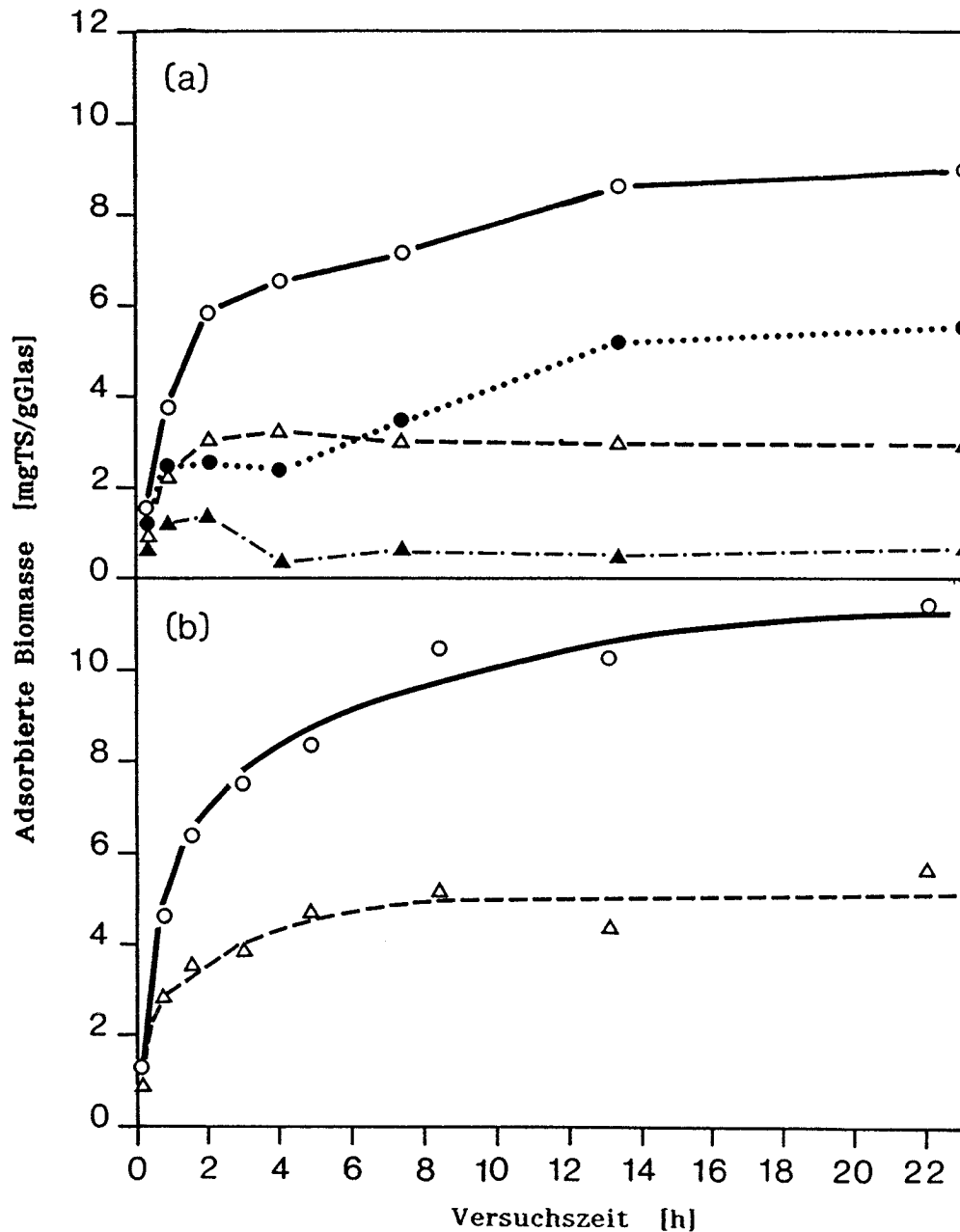


Abb. 4.31: Einfluß des Phosphorgehaltes der Zellen auf deren Flockulierbarkeit (DEAE-Dextran-Konzentration, bei der maximale Flockulation auftritt)

Die Ergebnisse der Flockulationsversuche beruhen auf unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen. Die Phosphor-gesättigten Zellen flockulieren offensichtlich bei geringeren DEAE-Konzentrationen (d.h. leichter), da sie deutlich hydrophober sind als die Phosphor-verarmten Zellen (s. Kap. 2.4.2.). Die Oberflächenladung der Mikroorganismen hat keinen großen Einfluß auf das unterschiedliche Flockulationsverhalten, da sie bei beiden Zelltypen etwa gleich groß ist.

4.3.3. Adsorptionseigenschaften der Mikroorganismen

Phosphor-gesättigte und -verarmte Zellen mit einem Phosphorgehalt von 3.1 bzw. 1.2 Gew. % wurden je in dest. Wasser bzw. 0.34 M NaCl-Lösung suspendiert und einem Adsorptionstest (s. Kap. 3.2.11.) unterworfen. Die Menge der adsorbierten Zellen pro g Glas ist in Abb. 4.32 über der Versuchszeit aufgetragen.



- Phosphor-gesättigte Zellen; suspendiert in 0.34 M NaCl
- △—△ Phosphor-verarmte Zellen; suspendiert in 0.34 M NaCl
-● Phosphor-gesättigte Zellen; suspendiert in dest. Wasser
- ▲-.-▲ Phosphor-verarmte Zellen; suspendiert in dest. Wasser

Abb. 4.32: Adsorptionsverhalten von Phosphor-gesättigten (P-Gehalt: 3.1 Gew. %) und Phosphor-verarmten Zellen (P-Gehalt: 1.2 Gew. %)
(a): Triamino-funktionelles Glas nach Vorschrift 4, Kap. 3.3.1.
(b): DEAE-Dextran(P&L Standard)-behandeltes Glas n. Vors. 11

Die Phosphor-gesättigten Corynebakterien zeigen in beiden Medien, Wasser und 0.34 M NaCl-Lösung, eine wesentlich bessere Adsorption an Triamino-funktionellen Gläsern als die Phosphor-verarmten Zellen (Abb. 4.32a). Das gleiche Verhalten wird bei DEAE-Dextran-behandelten Sinterglasmaterialien beobachtet (Abb. 4.32b).

Die bessere Adsorption der Phosphor-gesättigten Mikroorganismen beruht offenbar auf ihrer größeren Hydrophobizität im Vergleich zu Phosphor-verarmten Zellen. Triaminosilan und DEAE-Dextran sind Substanzen, die hydrophobe Gruppen enthalten. Die Sinterglaskörper erhalten durch die Behandlung mit diesen Reagenzien eine insgesamt leicht hydrophobe Oberfläche. Dies konnte durch Kontaktwinkelmessungen auf glatten, oberflächenbehandelten Glasplättchen nachgewiesen werden. Hydrophobe Wechselwirkungen der Trägerkörper mit den Phosphor-gesättigten Corynebakterien führten daher zu einer besseren Adsorption. Auch eine mehrschichtige Adsorption, die von Wechselwirkungen zwischen den Zellen beinflusst wird, ist bei Phosphor-gesättigten Zellen durch ihre hydrophobere Oberfläche leichter möglich.

Beide Zelltypen, Phosphor-gesättigte und -verarmte Corynebakterien, adsorbieren an positiv geladenen Oberflächen in größerer Menge, wenn sie in 0.34 M NaCl-Lösung anstelle von Wasser suspendiert sind (s. Abb. 4.32a). Ein derartiger Einfluß der Ionenstärke des umgebenden Mediums auf die Adsorption wurde bereits von Vijayalakshmi et al. (1979), Abbot et al. (1983) und Rouxhet et al. (1987) beschrieben. Das Verhalten kann nur durch Zell-Zell-Wechselwirkungen erklärt werden: Die Mikroorganismen werden von den oberflächenbehandelten Gläsern aufgrund der entgegengesetzten Ladungen elektrostatisch angezogen. Wenn die Oberfläche des Trägermaterials mit einer ersten Schicht Mikroorganismen bedeckt ist, werden weitere Zellen von den bereits adsorbierten Zellen durch ihre gleichartige Ladung abgestoßen. Hattori und Hattori (1985) fanden (bei physiologischen pH-Werten), daß die Adsorptionsrate besonders dann stark verringert wird, wenn bereits viele Zellen adsorbiert sind. Die Stärke der Abstoßungskräfte ist maßgebend für den minimalen Abstand der adsorbierten Zellen voneinander, d.h. für die Dichte der Bedeckung der Trägeroberfläche. Zugabe von Salzen in hoher Konzentration bewirkt eine Abschirmung der Ladungen auf der Oberfläche der Mikroorganismen und damit eine Reduktion der abstoßenden Kräfte (s. Kap. 2.4.1.). Damit können die Zellen auf dem Trägermaterial in engerem Abstand zueinander adsorbieren. Diese Erklärung wird durch Experimente von anderen Autoren untermauert. Von Rouxhet et al. (1987) wurde die Oberflächenladung der Zellen durch eine Vorbehandlung mit kationischen Substanzen verringert. Daniels und Kempe (1966) und Hattori und Hattori (1985) untersuchten den Einfluß des pH-Wertes auf die Adsorption. Sie fanden die stärkste Bindung der Zellen an deren isoelektrischen Punkt, an dem die Gesamtladung der Mikroorganismen gleich null ist und keine abstoßenden elektrostatischen Kräfte zwischen ihnen existieren.

Die Ergebnisse der Adsorptionsversuche wurden durch qualitative Beobachtungen im kontinuierlichen Festbettumlaufreaktor bestätigt. Unter Phosphatmangel blieben die Sinterglaskörper selbst nach wochenlangem Betrieb dem Augenschein nach "sauber". Auf Phosphat-reichem Medium wurde dagegen innerhalb weniger

Tage eine Ansammlung von Biomasse auf den Füllkörpern sichtbar. In einem Extremfall wuchs die gesamte Schüttung zu.

Abb. 4.33 zeigt den Verlauf einer kontinuierlichen Fermentation im Festbettumlaufreaktor. In den ersten 70 Tagen des Versuches wurde Medium Normal (s. Tab. 3.5) verwendet. Wegen des niedrigen Phosphatgehaltes dieses Mediums bildeten sich Phosphor-verarmte Zellen aus. Die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt etwa 65 g/l/d. Zu dem markierten Zeitpunkt wurde zusätzlich Phosphat in den Reaktor eingespritzt. Wegen der unter diesen Bedingungen günstigeren Adsorptionseigenschaften steigt die gebundene Biomasse und damit die Raum-Zeit-Ausbeute auf ein höheres Niveau von über 100 g/l/d an. Mit dem im nächsten Kapitel beschriebenen Modell läßt sich eine aktive immobilisierte Biomassekonzentration von etwa 17 gTS/l vor und über 30 gTS/l nach Phosphatzugabe abschätzen. In Kap. 4.2.3. war für eine monozelluläre Bedeckung der gesamten Trägeroberfläche ein theoretischer Maximalwert von 5.6 gTS/l berechnet worden. Es folgt, daß bei dem in Abb. 4.33 dargestellten Versuch bereits vor Phosphatzugabe eine mehrschichtige Belegung der Glasoberfläche vorgelegen haben muß. Durch Phosphatzugabe konnte die Dicke des adsorbierten Biomassefilms weiter gesteigert werden.

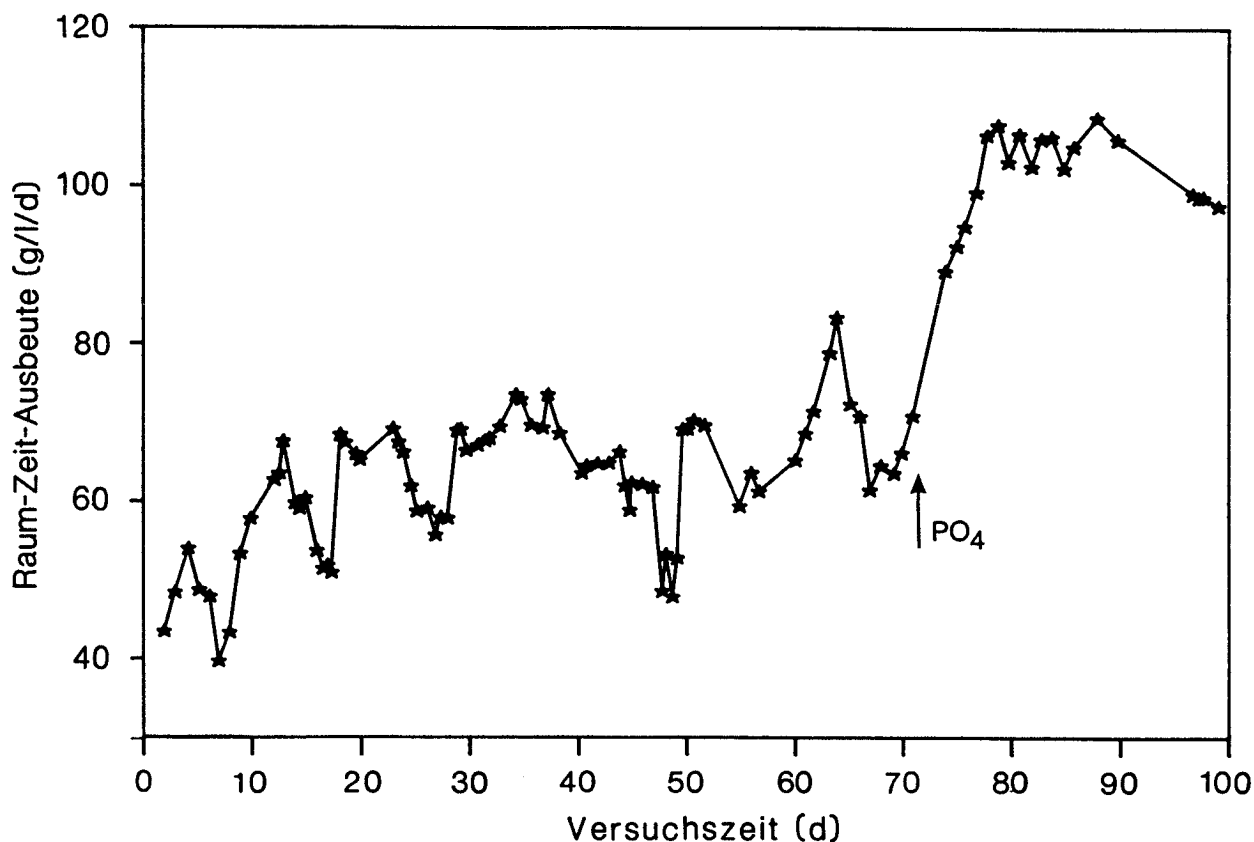


Abb. 4.33: Einfluß der Phosphatversorgung wachsender Mikroorganismen auf deren Adsorptionsverhalten

Festbettumlaufreaktor mit 55 g Sinterglas (Raschigringe ϕ 7.7 mm) und 180 ml Flüssigvolumen; Medium Normal (s. Tab. 3.5); Zu dem angegebenen Zeitpunkt wurden 5 ml 1M KH_2PO_4 eingespritzt

Unter den Bedingungen des Flockulationstests (s. Kap. 3.2.10.) tritt ohne Zugabe von Flockulationsmitteln (z.B. DEAE-Dextran) keine Aggregation der Zellen auf. Unter den Bedingungen einer kontinuierlichen Kultur jedoch wird eine mehrschichtige Adsorption der Phosphor-gesättigten Zellen auf der Oberfläche der Trägerkörper beobachtet. Dieser Unterschied ist durch die hohe Ionenstärke der Fermentationsmedien, durch die Anwesenheit mehrwertiger Kationen (Magnesium, Calcium) und womöglich durch Polymere, die von den Zellen selber ausgeschieden werden, zu erklären.

4.3.4. Steuerung der adsorbierten Biomasse

In Kap. 4.1.2.4.2. konnte gezeigt werden, daß die spez. Produktbildungsrate unabhängig vom Phosphorgehalt der Zellen ist. Weiterhin wurde deutlich, daß die Wachstumsrate auch bei Bedingungen, die zu einer leichten Phosphorverarmung der Zellen führen, kaum gegenüber Phosphor-gesättigten Zellen verändert ist.

Das Flockulations- und Adsorptionsverhalten der Phosphor-gesättigten und -verarmten Zellen ist dagegen deutlich verschieden. Diese Unterschiede beruhen offensichtlich auf der veränderten Hydrophobizität der Zellwandoberfläche. Es ist zu vermuten, daß Lipoteichonsäuren die Hydrophobizität der Phosphor-gesättigten Corynebakterien ausmachen. Von Phosphor-verarmten Zellen werden diese Substanzen wahrscheinlich nicht synthetisiert.

Bei den Aktivitätsbestimmungen (Kap. 4.2.1.), den Flockulations- (Kap. 4.3.2.) und Adsorptionsexperimenten (Kap. 4.3.3.) zeigte sich der wichtige Einfluß der elektrostatischen Kräfte. Diese lassen sich durch pH, Ionenstärke und Gehalt an mehrwertigen Kationen des umgebenden Mediums beeinflussen. Die Oberflächenladung von Phosphor-gesättigten und -verarmten Corynebakterien weicht nur wenig voneinander ab. Vermutlich werden die kationischen Phosphodiester-Gruppen der Teichonsäuren bei Phosphatmangel durch Carboxyl-Gruppen der Teichuronsäuren ersetzt.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ein neues Konzept der in-vivo-Adsorptionskontrolle durch die Kulturbedingungen entwickeln. Mit der Phosphatkonzentration im Substrat bzw. dem Phosphorgehalt der Zellen kann deren Hydrophobizität reguliert werden. Weiterhin lassen sich durch Variation der Ionenstärke des Mediums und des Gehaltes an mehrwertigen Kationen die elektrostatischen Kräfte beeinflussen. Durch beide Maßnahmen ist eine gezielte Steuerung des Adsorptionsverhaltens der Corynebakterien möglich. Wachstum und Produktion werden nicht behindert. Um hohe Biomassekonzentrationen zu erreichen, sind zu Beginn einer Fermentation gut adsorbierende, hydrophobe Zellen mit geringen abstoßenden elektrostatischen Kräften vorteilhaft. Damit aber die porösen Trägermaterialien nicht zuwachsen und dadurch hohe Diffusionswiderstände entstehen, könnte im Verlauf der Fermentation die Hydrophobizität der Zellen reduziert und die wirksame Oberflächenladung erhöht werden.

Das Konzept der in-vivo-Adsorptionskontrolle durch die Kulturbedingungen läßt sich wahrscheinlich auch auf andere mikrobiologische Systeme übertragen. Es ist möglich, daß der beschriebene Phosphateffekt allgemein bei Gram-positiven Bakterien auftritt, da diese offenbar generell Lipoteichonsäuren besitzen (s.o.). Andere Effekte, die zu Änderungen der Oberflächeneigenschaften von Mikroorganismen führen, sind denkbar. Die Ergebnisse dieses Kapitels (s. z.B. Abb. 4.31; S.122) weisen darauf hin, daß auch bei Corynebakterien neben dem Phosphorgehalt noch weitere Einflußgrößen existieren, mit denen das Adsorptionsverhalten der Zellen gesteuert werden könnte. Systematische Untersuchungen mit anderen Mikroorganismen sind erforderlich.

4.4. Modellierung der kontinuierlichen Leucinfermentation mit trägerfixierten Zellen

In diesem Kapitel wird ein relativ einfaches Modell vorgestellt, mit dem die Gleichgewichtszustände eines kontinuierlichen Reaktors mit trägerfixierten Zellen beschrieben werden kann.

Die Kinetik der Leucinbildung wurde bisher nicht in allen Einzelheiten quantitativ untersucht (s. Kap. 4.1.1.3.). In Tabelle 4.8 (s. S. 74) sind jedoch Anhaltswerte aus verschiedenen Messungen zusammengefaßt. Ein Modell der kontinuierlichen Leucinfermentation kann mit folgenden Ergebnissen aus Kap. 4.1. strukturiert werden:

- 1) Der Glucoseverbrauch für das Wachstum der Zellen und für die Leucinbildung sind unabhängig voneinander und addieren sich zum Gesamtverbrauch (s. Kap. 4.1.1.2.).
- 2) Der Ausbeutekoeffizient für Wachstum (gebildete Zellmasse/Glucosemenge, welche ausschließlich für das Wachstum aufgewendet wird) beträgt $Y_{x/s} = 0.38 \text{ gTS/g}$ (s. Tab. 4.5; S.69).
- 3) Der molare Ausbeutekoeffizient für Produktbildung (gebildete Leucinmenge/Glucosemenge, welche ausschließlich für die Leucinbildung aufgewendet wird) beträgt $Y_{L/s'} = 1.3 \text{ mol/mol}$ bzw. $Y_{L/s} = 0.86 \text{ g/g}$ (s. Tab. 4.5).
- 4) Der molare Ausbeutekoeffizient für Produktbildung (Leucinmenge/Ketosäuremenge) beträgt $Y_{L/k'} = 0.95 \text{ mol/mol}$ bzw. $Y_{L/k} = 0.83 \text{ g/g}$ (s. Tab. 4.5).
- 5) Das Wachstum ist nach einer Monod-Kinetik abhängig von der Glucosekonzentration mit einer Monod-Konstanten von $K_s = 0.2 \text{ g/l}$ (abgeschätzt aus Batch-Versuchen, bei denen die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und die Glucosekonzentration im Medium verfolgt wurden).
- 6) Die maximale spez. Produktbildungsrate (Leucinmenge/Zellmasse/Zeit) beträgt $p_{\max}' = 0.85 \text{ mmol/gTS/h}$ bzw. $p_{\max} = 0.11 \text{ g/gTS/h}$ (s. Tab. 4.8; S. 74). Die spez. Produktbildungsrate ist nach einer Monod-Kinetik abhängig von der Ketosäurekonzentration. Die Monod-Konstante hat einen Wert von etwa $K_k' = 6 \text{ mM}$ bzw. $K_k = 1 \text{ g/l}$ (abgeschätzt aus kontinuierlichen Versuchen, bei denen die Ketosäurekonzentration im Medium, d.h. im Zulauf des Reaktors, variiert und die Leucinbildung verfolgt wurde, s.a. Kap. 4.1.4.).
- 7) Der Einfluß der Verweilzeit auf die spez. Produktbildungsrate (s. Kap. 4.1.1.3.2.) wird zunächst vernachlässigt (Kinetische Daten liegen dazu noch nicht vor). Er macht sich nur bei langen Verweilzeiten bzw. geringen Durchflußraten bemerkbar (s. a. Kap. 4.5.1.2.).

- 8) Die tatsächliche Menge der immobilisierten Zellen und deren spez. Aktivität im gebundenen Zustand sind meßtechnisch schwer zugängliche Größen. Der Beitrag der trägerfixierten Mikroorganismen zur Gesamtproduktivität des Reaktors wird daher in Form einer "aktiven immobilisierten Biomassekonzentration" X_1 berücksichtigt. Diese Definitionsgröße repräsentiert den aktiven Anteil der tatsächlich auf den Trägerkörpern gebundenen Biomasse bzw. deren durchschnittliche Aktivität. X_1 wird mathematisch wie die nicht immobilisierte, frei suspendierte Biomasse behandelt. Auf den Trägerkörpern nachwachsende Zellen werden vollständig in die Fermentationsflüssigkeit abgegeben. Die Größe X_1 ist unabhängig von der Durchflußrate D . Im nächsten Kapitel 4.5. wird theoretisch dargelegt, daß diese Annahme zulässig ist und daß die Aktivität der gebundenen Biomasse durch X_1 sinnvoll erfaßt werden kann.
- 9) Bei den kontinuierlichen Fermentationsversuchen wurde der pO_2 durch die im Anhang A.5 beschriebene Regelung (unabhängig von der Durchflußrate) stets auf gleicher Höhe gehalten. Da der Einfluß der Sauerstoffkonzentration also als konstant angenommen werden kann, braucht er modellmäßig nicht erfaßt zu werden, sondern ist letztlich in der Größe X_1 mit berücksichtigt. Der Zusammenhang zwischen der Sauerstoffkonzentration und der aktiven immobilisierten Biomassekonzentration X_1 wird im nächsten Kapitel quantitativ beschrieben.

Modellgleichungen:

Aus der Bilanz der Zellmasse folgt für den stationären Fall:

$$D \cdot X = \mu \cdot (X + X_1) \quad [g/l/h] \quad (Gl. 4.3)$$

mit D = Durchflußrate $[1/h]$

X = Konzentration der frei suspendierten Biomasse $[gTS/l]$

X_1 = Konzentration der aktiven immobilisierten Biomasse $[gTS/l]$

μ = Wachstumsrate $[1/h]$

Bilanz für Glucose:

$$D \cdot (S_0 - S) = \mu \cdot (X + X_1) / Y_{X/S} + p \cdot (X + X_1) / Y_{L/S} \quad [g/l/h] \quad (Gl. 4.4)$$

mit S_0 = Glucosekonzentration im Zulauf $[g/l]$

S = Glucosekonzentration im Reaktor $[g/l]$

$Y_{X/S}$ = Zellertrag bezogen auf den Glucoseverbrauch für das Wachstum $[g/g]$

$Y_{L/S}$ = Leucin-Ausbeute bezogen auf den Glucoseverbrauch für die Produktbildung $[g/g]$

p = Spez. Produktbildungsrate $[g/gTS/h]$

Der Erhaltungsstoffwechsel der Mikroorganismen ist nicht berücksichtigt, da er nur bei sehr kleinen Durchflußraten in Erscheinung tritt, die für die Leucinproduktion irrelevant sind.

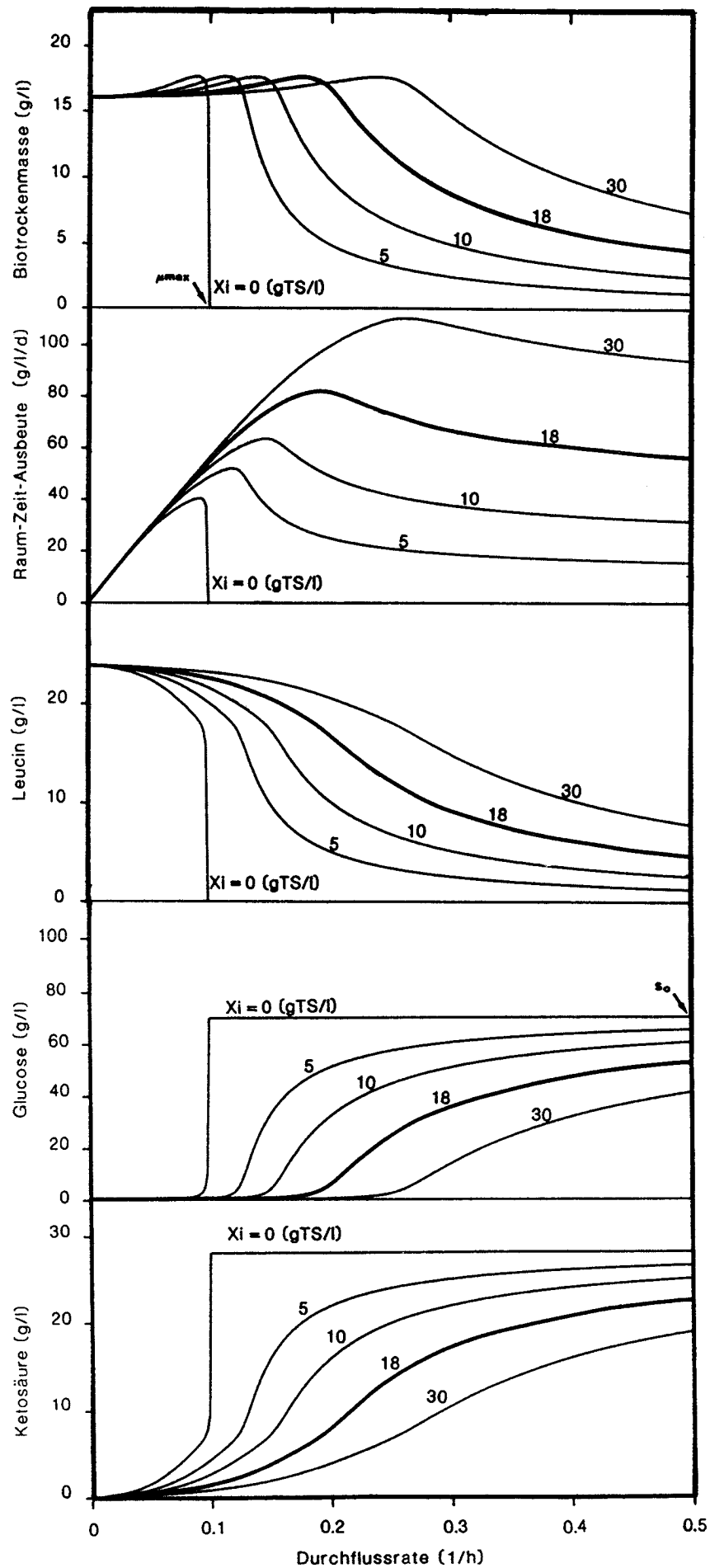


Abb. 4.34: Modellierung der Leucinfermentation in kontinuierlicher Kultur mit trägerfixierten wachsenden Mikroorganismen

Raum-Zeit-Ausbeute bezogen auf Leucin. Die herausgehobene Kurve für $X_1 = 18$ gTS/l entspricht der Modellanpassung von Abb. 4.36; Parameter: Aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 (s. Text); Modellparameter s. Abb. 4.36

Bilanz für Leucin (Wachstumsentkoppelte Produktbildung):

$$D \cdot L_e = p \cdot (X + X_1) \quad [\text{g/l/h}] \quad (\text{Gl. 4.5})$$

mit L_e = Leucinkonzentration [g/l]

Die Bilanz für Ketosäure kann ersetzt werden durch folgende stöchiometrische Gleichung:

$$K = K_0 - L_e / Y_{L/K} \quad [\text{g/l}] \quad (\text{Gl. 4.6})$$

mit K = Ketosäurekonzentration im Reaktor [g/l]

K_0 = Ketosäurekonzentration im Zulauf [g/l]

$Y_{L/K}$ = Leucinausbeute bezogen auf den Ketosäureverbrauch [g/g]

Wachstumskinetik:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (S + K_s) \quad [1/h] \quad (\text{Gl. 4.7})$$

mit $\mu_{\max}$ = Maximale Wachstumsrate [1/h]

K_s = Monod-Konstante für Glucose [g/l]

Produktbildungskinetik:

$$p = p_{\max} \cdot K / (K + K_K) \quad [\text{g/gTS/h}] \quad (\text{Gl. 4.8})$$

mit $p_{\max}$ = Maximale spez. Produktbildungsrate [g/gTS/h]

K_K = Monod-Konstante für Ketosäure [g/l]

Das Gleichungssystem kann nur iterativ gelöst werden. Das verwendete Fortran 77 - Programm und ein Programmablaufplan sind im Anhang A.10 beigelegt. Es berechnet die Konzentration der frei suspendierten Biomassekonzentration X , die Leucinkonzentration L_e , die Raum-Zeit-Ausbeute $L_e \cdot D$ und die Glucose- und Ketosäurekonzentration S bzw. K , in Abhängigkeit von der variablen Durchflußrate D . Für die Parameter $Y_{X/S}$, $Y_{L/S}$, $Y_{L/K}$, $p_{\max}$, K_s und K_K werden die oben angegebenen, in unabhängigen Versuchen bestimmten bzw. abgeschätzten Werte eingesetzt. Die Glucose- und Ketosäurekonzentration im Zulauf S_0 und K_0 sind durch das verwendete Medium vorgegeben. Die unbekannte Größe X_1 wird gewählt und während eines Rechnerdurchlaufs konstant gehalten.

In Abb. 4.34 sind die nach diesem Modell errechnete frei suspendierte Biomassekonzentration X, die Raum-Zeit-Ausbeute $Le \cdot D$, die Leucin- Le , die Glucose- S und die Ketosäurekonzentration K über der Durchflußrate D in Abhängigkeit von der immobilisierten Biomassekonzentration X_1 (Parameter) aufgetragen. Die verwendeten Modellkonstanten wurden von Abb. 4.36 übernommen und sind dort in der Unterschrift angegeben.

Die Kurven für $X_1 = 0$ entsprechen einer Kultur ohne Zellrückhaltung. Der Auswaschpunkt ist durch die maximale Wachstumsrate μ_{max} der Mikroorganismen charakterisiert (s. Kap. 2.2). Für Kulturen mit Zellrückhaltung ($X_1 > 0$) kann aus Abb. 4.34 gefolgert werden:

- 1) Ein Auswaschen der Kultur ist nicht möglich.
- 2) Der Abfall der frei suspendierten Biomassekonzentration X wird bei Durchflußraten erreicht, die über der maximalen Wachstumsrate μ_{max} liegen und die mit X_1 ansteigen. So ist z.B. bei $X_1 = 10$ g/l und einer Durchflußrate von $D = 0.15/h$ mehr Biomasse im Reaktor in frei suspendierter ($X \approx 17$ gTS/l) als in gebundener Form vorhanden, obwohl D oberhalb der maximalen Wachstumsrate μ_{max} liegt.
- 3) Die Raum-Zeit-Ausbeute nimmt bei zunehmendem X_1 immer höhere Maximalwerte an, die bei entsprechend gesteigerten Durchflußraten erreicht werden. Bei niedrigen Durchflußraten nähern sich alle Kurven einer Ursprungsgeraden ($y = K_0 \cdot Y_L / X \cdot D$) asymptotisch an.
- 4) Bei zunehmendem X_1 stellt sich ein immer breiteres Maximum der Raum-Zeit-Ausbeute ein. Die Kultur wird daher immer unempfindlicher gegenüber Schwankungen der Durchflußrate.

In Abb. 4.35 ist die Raum-Zeit-Ausbeute für $X_1 = 0, 10, 18$ und 30 gTS/l über dem Umsatz (bezogen auf Ketosäure) aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß unabhängig von X_1 die maximale Raum-Zeit-Ausbeute bei einem Umsatz von etwa 75 % erreicht wird. Bei gleicher Raum-Zeit-Ausbeute kann mit steigendem X_1 ein höherer Umsatz erzielt werden. Gestrichelt ist eine Kurve für $X_1 = 18$ gTS/l und $\mu = 0$ wiedergegeben. Sie repräsentiert einen Reaktor mit vollständig ruhenden Zellen. Im Vergleich zu wachsenden Zellen ($X_1 = 18$ gTS/l, $\mu = 0.1/h$) wird bei einem Umsatz > 0.75 nur etwa die Hälfte der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht, da der Beitrag der frei suspendierten Zellen zur Produktion fehlt (s.a. Kap. 4.2.3.).

In Abb. 4.36 sind Meßwerte einer turbidostatisch geregelten, kontinuierlichen Fermentation im Festbettumlaufreaktor mit 70 g Sinterglas (Kugeln ϕ 3 mm) und 135 ml Reaktorvolumen über der Durchflußrate aufgetragen. Die Werte wurden in einem Zeitraum von 55 Tagen aufgenommen. Die hydrodynamischen Verhältnisse (Begasungsrate: 0.6 vvm; Umpumprate: 7.9/min) und der pO_2 (15 % O_2 -Sättigung) wurden während des ganzen Versuches konstant gehalten. Es kam Medium Normal (s. Tab. 3.5) zum Einsatz. Die Glucose- und Ketosäure-Konzentration wurden auf 75 g/l bzw. 30 g/l erhöht, um einen möglichst großen Bereich der

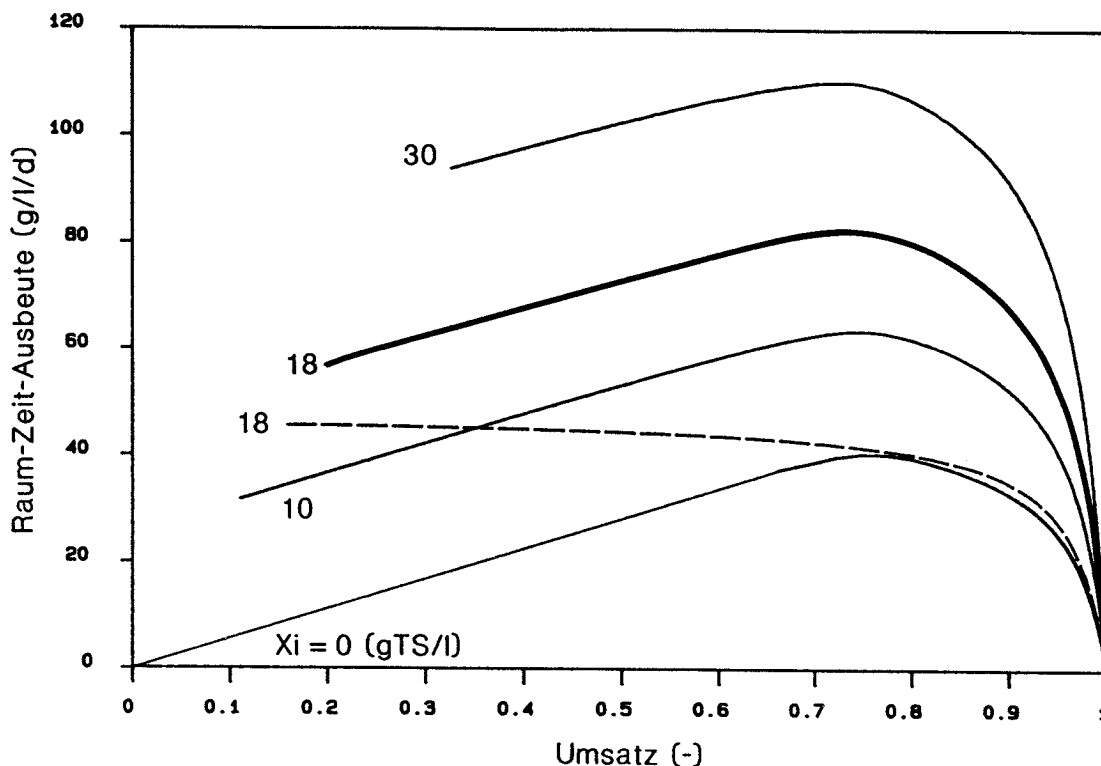


Abb. 4.35: Einfluß der aktiven immobilisierten Biomassekonzentration X_i und der Wachstumsrate auf Raum-Zeit-Ausbeute (bezogen auf Leucin) und Umsatz (bezogen auf Ketosäure)

Durchgezogene Linien: Modellparameter wie Abb. 4.36; Gestrichelte Linie: $X_i = 18$ gTS/l, Modellparameter wie Abb. 4.36, jedoch Wachstumsrate $\mu = 0$ (ruhende Zellen)

Durchflußrate ohne Substratlimitierung abfahren zu können. Der Reaktor wurde die ersten sechs Tage mit 2 g/l KH_2PO_4 betrieben. Die Zellen besitzen unter diesen Bedingungen eine hydrophobe Zellwand und bilden einen Biomassefilm auf den Trägerkörpern. Anschließend wurde die Phosphat(KH_2PO_4)-Konzentration im Medium auf 1 g/l herabgesetzt, um die Menge der adsorbierten Biomasse während der restlichen Versuchszeit möglichst konstant zu halten.

Die durchgezogenen Linien in Abb. 4.36 repräsentieren eine Modellrechnung. Für die Parameter $Y_{x/s}$, $Y_{l/s}$, $Y_{l/k}$, $\mu_{\max}$, K_s und K_x wurden die am Anfang dieses Kapitels angegebenen konstanten Werte eingesetzt. Die Glucose- und Ketosäure-Konzentration im Zulauf wurde mit der durchschnittlichen Verdünnung des Mediums durch Titrationsmittel (NaOH) korrigiert ($\Rightarrow S_0 = 70$ g/l; $K_0 = 28$ g/l). Für die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ konnte unter Berücksichtigung des relativ hohen osmotischen Druckes des Mediums ein Wert von 0.1/h angenommen werden. Als einziger Anpassungsparameter diente die unbekannte immobilisierte Biomassekonzentration X_i . Sie wurde für eine möglichst gute Beschreibung aller Meßpunkte empirisch variiert. Es ergibt sich ein Wert von $X_i = 18$ g/l.

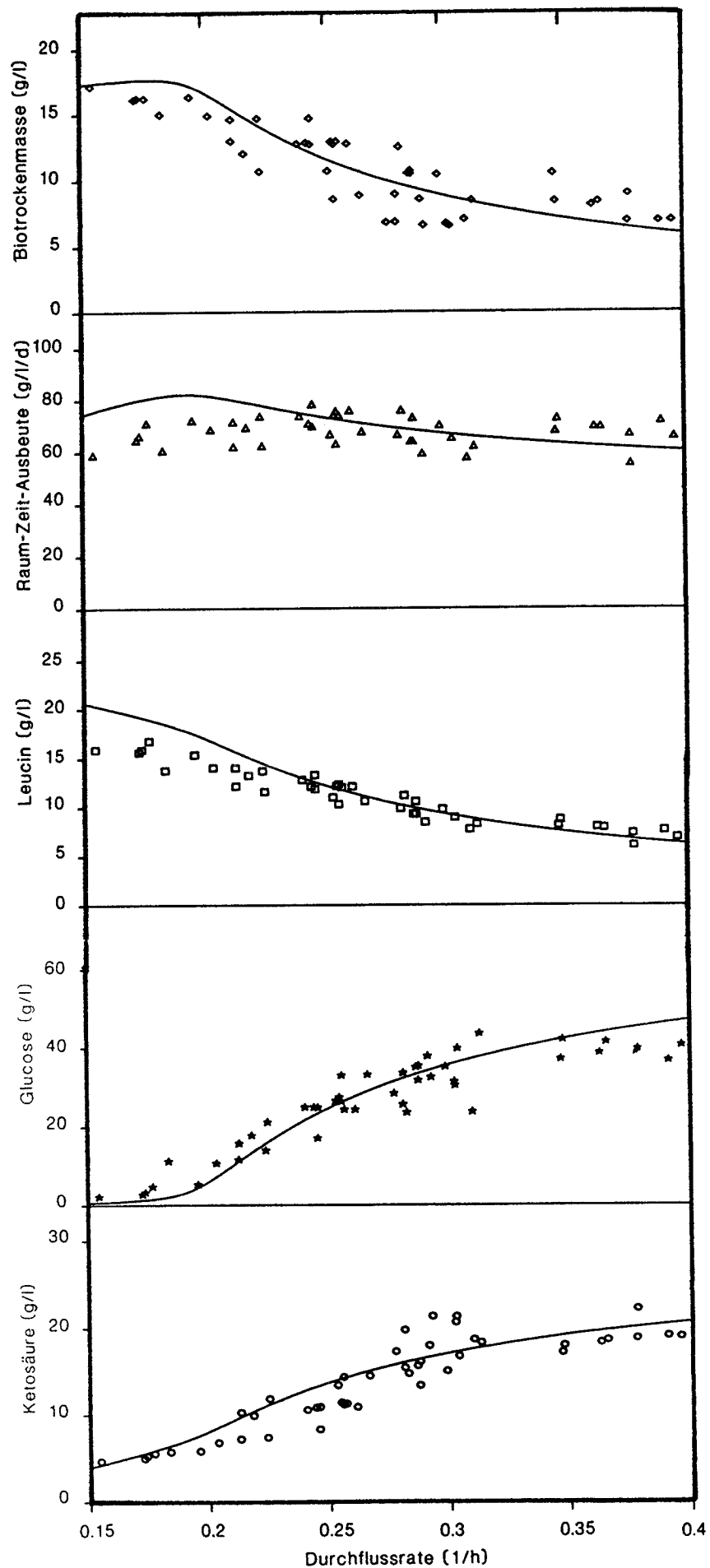


Abb. 4.36: Meßwerte (Symbole) und Modellrechnung (durchgezogene Linien) einer kontinuierlichen Fermentation

Turbidostatisch geregelter Festbettumlaufreaktor; 70 g Sinterglas (Kugeln ϕ 3 mm); 135 ml Reaktorvolumen; $pO_2 = 15\%$ O_2 -Sättigung; 1.15 bar Reaktorinnen-
druck; Die aktive immobilisierte Biomassekonzentration wurde mit $X_1 = 18$ gTS/l
an die Meßwerte angepaßt; Modellparameter: $S_0 = 70$ g/l; $K_0 = 28$ g/l; $Y_{x/s} =$
0.38 g/g; $Y_{L/s} = 0.86$ g/g; $Y_{L/x} = 0.83$ g/g; $\mu_{max} = 0.1/h$; $p_{max} = 0.11$ g/gTS/h;
 $K_s = 0.2$ g/l; $K_x = 1$ g/l

Wie Abb. 4.36 zeigt, lassen sich die Versuchsergebnisse bei Durchflußraten $> 0.23/h$ sehr gut mit dem Modell beschreiben. Offenbar ist die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 tatsächlich über den langen Versuchszeitraum von 55 Tagen konstant geblieben. Bei geringeren Durchflußraten sind leichte Abweichungen der Modellrechnungen von den Messungen bei der Leucinkonzentration und der Raum-Zeit-Ausbeute zu verzeichnen (s. dazu Kap. 4.5.1.2.). Das Modell kann zur Voraussage des Reaktorverhaltens und zur Bestimmung der aktiven immobilisierten Biomassekonzentration X_1 genutzt werden.

Wird der Wert $X_1 = 18$ g/l auf die eingesetzte Sinterglasmenge bezogen, errechnet sich eine Biomassebeladung von 34.7 mgTS/gGlas. Durch das Aufwachsen wurden also höhere Werte erreicht als durch die rein physikochemische Adsorption bei den Versuchen in Kap. 4.2.2. (maximal 10 mgTS/gGlas). Es ist anzunehmen, daß eine mehrschichtige Belegung der Glasoberfläche mit Zellen vorliegt.

4.5. Stofftransport in den Trägerkörpern

Der Stofftransport in mit Mikroorganismen bewachsenen porösen Trägerkörpern wurde bisher nicht systematisch erforscht (Klein und Ziehr, 1987). In Abb. 4.37 sind die zu erwartenden Transportvorgänge schematisch dargestellt. Man muß unterscheiden zwischen Stofftransport durch:

- 1) Konvektion (strömende Fermentationsflüssigkeit)
- 2) Filmdiffusion (in der unbewegten Fermentationsflüssigkeit)
- 3) Porendiffusion (im Biomassefilm)

Transportwiderstände in der von Medium umströmten äußeren Grenzschicht der Trägerkörper können vernachlässigt werden, wenn die Relativgeschwindigkeit Fest-Flüssig > 1 cm/sec (Sherwoodzahl > 10) beträgt (Kasche und Buchholz, 1979). In den eingesetzten Reaktoren wird dieser Wert etwa um den Faktor 9 - 12 übertroffen.

Zum Stofftransport im Sinterglas liegen keine eigenen Meßergebnisse vor. In diesem Kapitel sollen daher anhand von vereinfachenden Modellen folgende Fragen theoretisch abgeschätzt werden:

- 1) In welcher Größenordnung liegt die maximale Dicke des aktiven, d.h. ausreichend mit Substrat versorgten Biomassefilms? Welche Konsequenzen ergeben sich daraus?
- 2) Welches Substrat ist aufgrund von Transportwiderständen im Sinterglas als erstes limitierend und bestimmt damit die Gesamtaktivität der Immobilisate?
- 3) Gibt es Zustände, bei denen Transporthemmungen bei anderen Substratbestandteilen wirksam werden?
- 4) Welche aktive immobilisierte Gesamtbiomassekonzentration läßt sich aufgrund eines angenommenen rein diffusiven Stofftransports errechnen?
- 5) Gibt es neben diffusiven Stofftransportvorgängen im Sinterglas auch einen konvektiven Anteil?

4.5.1. Transportwiderstand im Biomassefilm

In erster Näherung sei zunächst angenommen:

- 1) Der Transportwiderstand im Biomassefilm ist dominierend.
- 2) Die Konzentrationen auf der Oberfläche des Biomassefilms sind gleich den entsprechenden Konzentrationen in der freien Fermentationsflüssigkeit.

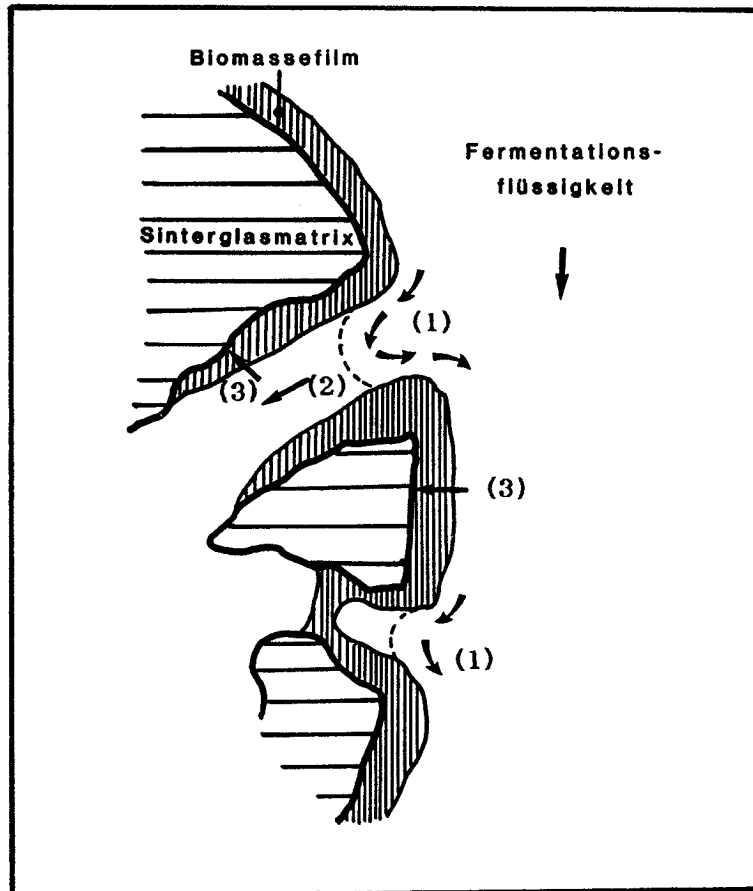


Abb. 4.37: Schematische Darstellung des Stofftransportes in mit Mikroorganismen bewachsenen porösen Trägerkörpern

- (1): Stofftransport durch Konvektion
 - (2): Stofftransport durch Diffusion in der nicht bewegten Fermentationsflüssigkeit innerhalb der Poren
 - (3): Stofftransport durch Diffusion im Biomassefilm
- Transportwiderstände in der von Medium umströmten äußeren Grenzschicht der Trägerkörper können vernachlässigt werden (s. Text)

4.5.1.1. Diffusion von Sauerstoff im Biomassefilm

Abb. 4.38 zeigt den qualitativen Verlauf der Sauerstoffkonzentration O_2 und der spez. Sauerstoffaufnahme der Mikroorganismen q in einem Biomassefilm. Dieser ist unterteilt in einen aktiven, d.h. ausreichend mit Sauerstoff versorgten Teil nahe der Flüssigkeitsoberfläche und eine möglicherweise vorhandene inaktive Schicht nahe der Glasoberfläche, die nicht mit Sauerstoff versorgt wird. Da nur mit Sauerstoff versorgte Zellen zur Leucinbildung beitragen (s. Kap. 2.1.6.), beziehen sich alle weiteren Überlegungen nur auf den aktiven Teil des Biomassefilms (s. a. Andrews, 1982).

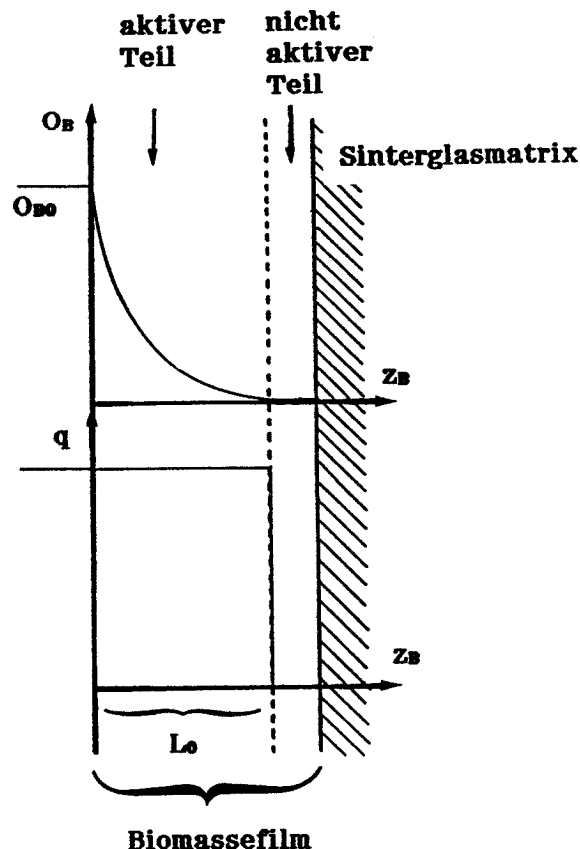


Abb. 4.38: Verlauf der Sauerstoffkonzentration O_B und der spez. Sauerstoffaufnahme q in einem ebenen Biomassefilm

Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration in einem ebenen Biomassefilm kann nach folgendem Gesetz (Ableitung aus der Massenbilanz s. Anhang A.11) für eindimensionale stationäre Diffusion berechnet werden (s. Abb. 4.38):

$$\frac{d^2 O_B}{dz_B^2} = \frac{\delta_B \cdot q}{D_{e,o}} \quad (\text{Gl. 4.9})$$

- mit O_B = Sauerstoffkonzentration im Biomassefilm [mmol/l]
 z_B = Längenkoordinate senkrecht zum Biomassefilm mit dem Nullpunkt an der Grenzfläche zur Fermentationsflüssigkeit [mm]
 δ_B = Zelldichte im Biomassefilm [gTS/cm³]
 $D_{e,o}$ = Effektiver Diffusionskoeffizient für Sauerstoff im Biomassefilm [cm²/sec]
 q = Spez. Sauerstoffaufnahme [mmol/gTS/h]

Es wird mit einer konstanten spez. Sauerstoffaufnahme gerechnet (Reaktion 0. Ordnung; s. Abb. 4.38), da die kritische Sauerstoffkonzentration sehr niedrig ist (s. Kap. 4.1.1.3.3). Unter dieser Voraussetzung ist die Differentialgleichung 2. Ordnung analytisch lösbar. Eine probeweise durchgeführte numerische Lösung einer Monod-Kinetik (Verfahren nach Kap. 4.5.1.2.) führte zu nur unwesentlich unterschiedlichen Ergebnissen.

Mit den Randbedingungen (s. Abb. 4.38):

$$O_B(z_B=0) = O_{Bo}$$

$$\frac{dO_B}{dz_B}(z_B=L_0) = 0$$

mit O_{Bo} = Sauerstoffkonzentration auf der Oberfläche des Biomassefilms bzw. in der freien Fermentationsflüssigkeit [mmol/l]

L_0 = Dicke des aktiven Biomassefilms [mm]

folgt:

$$O_B = \frac{\delta_B \cdot q}{2 \cdot D_{e,o}} \cdot z_B^2 - \frac{\delta_B \cdot q \cdot L_0}{D_{e,o}} \cdot z_B + O_{Bo} \quad [\text{mmol/l}] \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Die Dicke des mit Sauerstoff versorgten aktiven Biomassefilms L_0 errechnet sich für $O_B(z_B=L_0) = 0$ zu:

$$L_0 = \sqrt{\frac{2 \cdot D_{e,o} \cdot O_{Bo}}{\delta_B \cdot q}} \quad [\text{mm}] \quad (\text{Gl. 4.11})$$

Die Dicke des aktiven Biomassefilms L_0 steigt also mit der Quadratwurzel der Sauerstoffkonzentration O_{Bo} in der Fermentationsflüssigkeit an. Für eine quantitative Berechnung am Beispiel des in Abb. 4.36 (s. S. 134) dargestellten Versuches lassen sich folgende Parameter einsetzen:

- 1) In graduierten Zentrifugenröhrchen wurde die Sedimentationsdichte von *C. glutamicum* mit $\delta_B = 0.17 \text{ gTS/cm}^3$ bestimmt und als Maß für die Dichte der Zellen im Biomassefilm übernommen. Ähnliche Werte können aus rasterelektromikroskopischen Aufnahmen abgeschätzt werden. Die Zellen sind im Biomassefilm gleichmäßig verteilt (Karel et al., 1985).
- 2) Furui und Yamashita (1985) haben den effektiven Diffusionskoeffizienten für Ammoniumfumarat in Polyacrylamid-Gel mit und ohne Zellen (*E. coli*) vermessen. Sie fanden eine lineare Reduktion in Abhängigkeit von der Zelldichte von etwa 12.5 % pro 0.1 gTS/cm³. Wird die gleiche Reduktion des effektiven Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff in einem Biomassefilm angenommen, so errechnet sich aus dem Diffusionskoeffizienten in reinem Wasser ($1.9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$) mit der oben angegebenen Zelldichte ($\delta_B = 0.17 \text{ gTS/cm}^3$): $D_{e,o} = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$. Bailey und Ollis (1986) geben den gleichen Wert für Bakterienfilme in Drehrohrreaktoren an. Karel et al. (1985) recherchierten gemessene Diffusionskoeffizienten in Biomassefilmen aus der Literatur. Für O₂ sind Werte im Bereich von 20 - 104 % relativ zum Diffusionskoeffizient in Wasser zu verzeichnen. Die verhältnismäßig geringe Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten bei Anwesenheit von Mikroorganismen ist nur unter der Annahme erklärbar, daß Sauerstoff auch durch die Zellen hindurch diffundiert (Libicki et al., 1988; Ho und Ju, 1988).

3) Die mittlere Sauerstoffaufnahme rate sei $q = 10 \text{ mmol/gTS/h}$ (s. Tab. 4.8)

4) Der pO_2 wurde bei dem Versuch auf einen konstanten Wert von 15 % O_2 -Sättigung geregelt (s. Abb. 4.36). Die Sauerstoffkonzentration in der freien Fermentationsflüssigkeit beträgt dann bei 1.15 bar Reaktorinnendruck $O_{Bo} = 0.173 \text{ mmol/l}$.

Unter diesen Bedingungen errechnet sich die Dicke des mit Sauerstoff versorgten Biomassefilms zu:

$$L_o = 0.033 \text{ mm}$$

Es können demnach nur etwa 30 übereinander liegende Zellschichten ausreichend versorgt werden. Die Annahme eines ebenen Biomassefilms (d.h. die Vernachlässigung von Krümmungsradien) ist bei dieser geringen Schichtdicke zulässig.

Biryukov und Tarasova (1973) und Wuhrmann (1964) geben für Myzelflocken bzw. Belebtschlammflocken ähnlich geringe aktive Schichtdicken von $L_o < 0.2 \text{ mm}$ an. Shinmyo et al. (1982) immobilisierten *Bacillus amyloliquefaciens* in Gelpartikel. Nach einiger Zeit fanden sie lebensfähige Zellen nur in einer 0.05 mm dicken Randschicht. Die in den aufgeführten drei Arbeiten verwendeten Mikroorganismen besitzen vermutlich eine geringere spez. Sauerstoffaufnahme rate als *Corynebacterium glutamicum*.

Die oben beschriebene Rechnung verdeutlicht, warum die publizierten Arbeiten über die Aminosäureproduktion mit Gel-immobilisierten coryneformen Bakterien (s. Tab. 1.2; S. 6) nicht zum Erfolg geführt haben. Von den bei diesen Arbeiten eingesetzten Gel-Partikeln mit einem Durchmesser $\geq 1 \text{ mm}$ wird nur eine sehr dünne äußere Schicht ausgenutzt. Zur ausreichenden Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen sind also möglichst große Oberflächen anzustreben, die nur durch poröse Trägerkörper bereitgestellt werden können.

Abb. 4.39 weist den Einfluß der Sauerstoffkonzentration in der freien Fermentationsflüssigkeit auf die aktive immobilisierte Biomassemenge experimentell nach. Zu der markierten Zeit wurde der pO_2 im Reaktor von 10 auf 20 % O_2 -Sättigung angehoben. Mit einer Verzögerung von etwa 3 Tagen, die als Zeit für den Aufbau eines dickeren Biomassefilms interpretiert werden kann, steigt die Raum-Zeit-Ausbeute von etwa 50 g/l/d auf ein deutlich höheres Niveau von etwa 72 g/l/d an. Der Reaktor wurde unter Bedingungen betrieben, unter denen die Mikroorganismen eine leicht hydrophobe Zellwand ausbilden.

Mit dem in Kap. 4.4. beschriebenen mathematischen Modell kann die aktive immobilisierte Biomassekonzentration berechnet werden. Es ergibt sich ein $X_1 = 14.3$ bzw. 22.4 gTS/l für 10 bzw. 20 % O_2 -Sättigung (s.a. nächstes Kapitel).

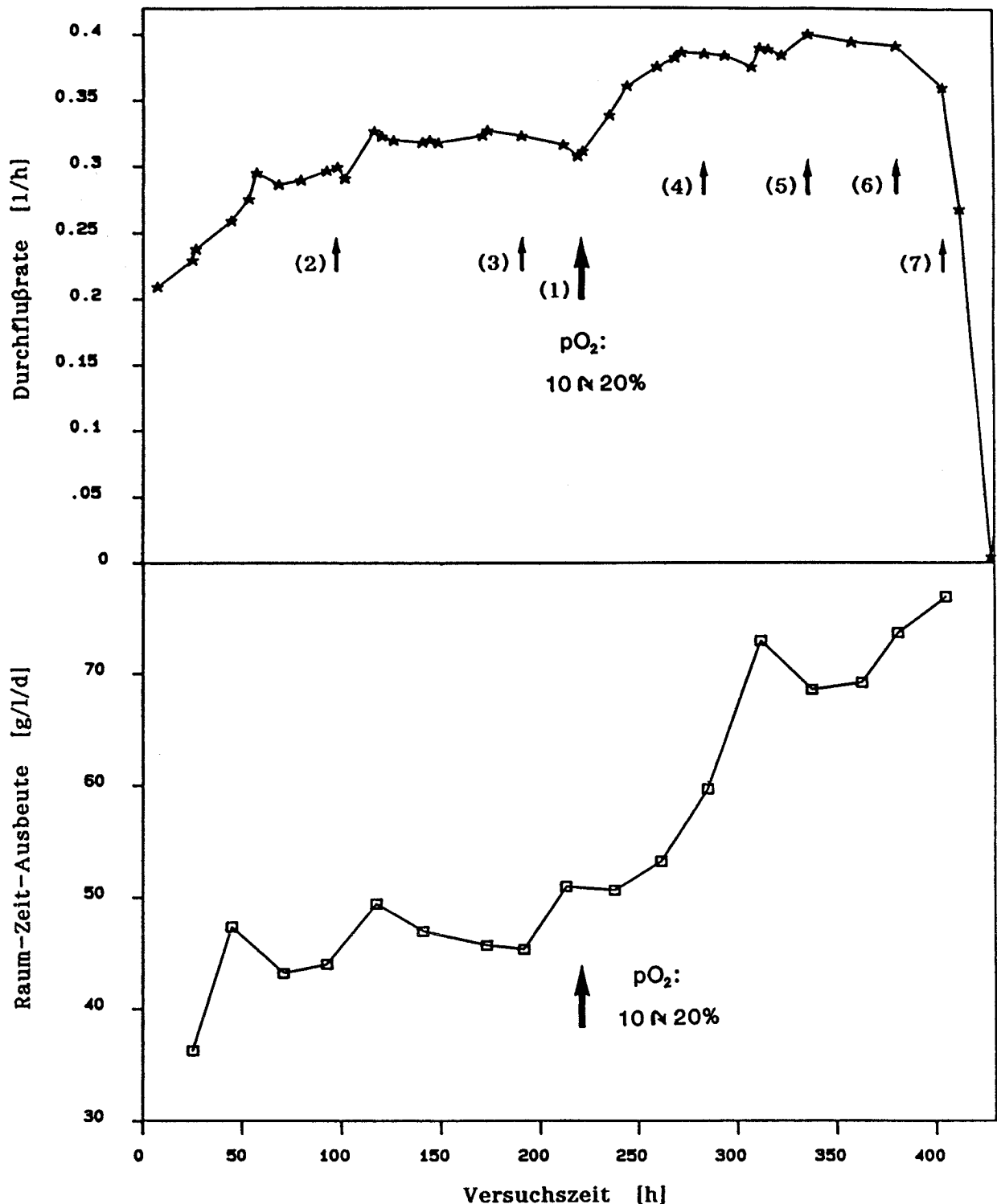


Abb. 4.39: Einfluß von pO₂, Thiamin und Temperatur auf Durchflußrate und Raum-Zeit-Ausbeute

Festbettumlaufreaktor; 55 g Sinterglas (Raschigringe $\varnothing$ 7.7 mm); Reaktorvolumen 190 ml; Turbidostatisch geregelte Zelldichte OD $\sim$ 28; Medium Normal (s. Tab. 3.5)

(1): Geregelter pO₂ von 10 auf 20 % Sauerstoffsättigung

(2): Wechsel von Medium ohne Thiamin auf Medium mit Thiamin (s. Kap. 4.1.3.3.)

(3): Temperatur von 30 auf 33.5°C (s. Kap. 4.1.2.1.)

(4): Temperatur von 33.5 auf 35°C

(5): Temperatur von 35 auf 36°C

(6): Temperatur von 36 auf 36.8°C

(7): Temperatur von 36.8 auf 37.3°C

4.5.1.2. Diffusion von gelösten Medienbestandteilen im Biomassefilm

In Abb. 4.36 (S. 134) wurden von dem Modell bei Durchflußraten von $D = 0.15 - 0.23$ 1/h etwas zu hohe Werte für die Leucinkonzentration und die Raum-Zeit-Ausbeute errechnet. Die beschriebenen Abweichungen treten bei Durchflußraten auf, bei denen sich niedrige stationäre Substratkonzentrationen in der Fermentationsflüssigkeit einstellen. Einflüsse werden bei der Leucinbildung, nicht jedoch beim Wachstum beobachtet. Es ist daher zu prüfen, ob in dem adsorbierten Biomassefilm die Ketosäure aufgrund von Diffusionswiderständen auf limitierende Konzentrationen (im Bereich der Monod-Konstante K_K) abfällt.

Zur Berechnung des Konzentrationsverlaufes der Ketosäure wird wieder von einem ebenen Biomassefilm ausgegangen und ein Diffusionsgesetz analog zu (Gl. 4.9) verwendet. Der Ketosäureverbrauch ist stöchiometrisch (über $Y_{L/K}$) mit der spez. Produktbildungsrate p korreliert und muß in Form einer Monod-Kinetik angesetzt werden:

$$\frac{d^2 K_B}{dz_B^2} = \frac{\delta_B}{D_{e,K}} \cdot \frac{p_{\max}}{Y_{L/K}} \cdot \frac{K_B}{K_B + K_K} \quad (\text{Gl. 4.12})$$

mit K_B = Ketosäurekonzentration im Biomassefilm [g/l]
 z_B = Längenkoordinate senkrecht zum Biomassefilm mit dem Nullpunkt an der Grenzfläche zur Fermentationsflüssigkeit [mm]
 δ_B = Zelldichte im Biomassefilm [gTS/cm³]
 $p_{\max}$ = Maximale spez. Produktbildungsrate [g/gTS/h]
 $D_{e,K}$ = Effektiver Diffusionskoeffizient für die Ketosäure [cm²/sec]
 $Y_{L/K}$ = Ausbeutekoeffizient (Leucin/Ketosäure) [g/g]
 K_K = Monod-Konstante für die Ketosäure [g/l]

Diese nicht lineare Differentialgleichung 2. Ordnung ist analytisch nicht lösbar. In Zusammenarbeit mit dem Rechenzentrum der KFA Jülich wurde ein numerisches Verfahren nach der Kollokationsmethode erarbeitet, mit dem bei folgenden Randbedingungen Näherungslösungen gefunden werden:

$$K_B(z_B=0) = K_{B0}$$

$$\frac{dK_B}{dz_B}(z_B=L_0) = 0$$

mit K_{B0} = Ketosäurekonzentration auf der Oberfläche des Biomassefilms bzw. in der freien Fermentationsflüssigkeit [g/l]
 L_0 = Dicke des aktiven Biomassefilms [mm]

Der quantitative Einfluß von Diffusionswiderständen wird allgemein in Form eines Effektivitätskoeffizienten $\bar{n}$ angegeben:

$$\bar{n} = \frac{v}{v_0} = \frac{\text{Tatsächliche Reaktionsrate}}{\text{Reaktionsrate ohne Wirken von Diffusionswiderständen}} \quad (\text{Gl. 4.13})$$

Die Reaktionsrate v_o ist durch die spez. Produktbildungsrate in der freien Fermentationsflüssigkeit $p(K_{Bo})$ gegeben. Zur Berechnung von v wird der Verlauf der Ketosäurekonzentration im Biomassefilm in den Verlauf der spez. Produktbildungsrate umgerechnet und daraus durch Integration der Mittelwert gebildet:

$$v = \frac{1}{L_o} \cdot \int_{z_B=0}^{L_o} \frac{p_{max} \cdot K_B}{K_B + K_K} dz_B \quad (\text{Gl. 4.14})$$

Das Rechnerprogramm zur Lösung von (Gl. 4.12 - 4.14) ist im Anhang A.12 beigelegt. Am Beispiel des in Abb. 4.36 (s. S. 134) dargestellten Versuches lassen sich folgende Parameter einsetzen:

- 1) $\delta_B = 0.17 \text{ gTS/cm}^3$ (s. Kap. 4.5.1.1.)
- 2) $p_{max} = 0.11 \text{ g/gTS/h}$ (s. Tab. 4.8; S. 74)
- 3) $D_{e,K} = 0.55 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$, berechnet in analoger Weise wie $D_{e,o}$ (s.o.). Der Diffusionskoeffizient für Ketosäure in reinem Wasser ist nicht bekannt. Als Anhaltswert dient der Diffusionskoeffizient für Valin ($0.71 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$; Namikawa et al., 1977)
- 4) $Y_{L/K} = 0.83 \text{ g/g}$ (umgerechnet aus $Y_{L/K'}$, Tab. 4.5; S. 69)
- 5) $K_K = 1 \text{ g/l}$ (s. Kap. 4.4)
- 6) $L_o = 0.033 \text{ mm}$. Dieser im letzten Kapitel berechnete Wert muß eingesetzt werden, da die Leucinbildung ohne ausreichende Sauerstoffversorgung nicht möglich ist (s. Kap. 2.1.6.).
- 7) K_{Bo} wurde variiert

Die Rechnungen ergeben für alle Werte von K_{Bo} einen Effektivitätskoeffizienten von:

$$\bar{\eta} > 0.995$$

In analoger Weise kann die Diffusion von Glucose oder Leucin behandelt werden. Folgendes allgemein gültiges Ergebnis läßt sich aus den Rechnungen ableiten:

Die Corynebakterien haben einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch. Dadurch ergibt sich ein sehr großer Einfluß der Transportwiderstände auf die Sauerstoffversorgung und damit eine relativ geringe aktive Schichtdicke des Biomassefilms. Daraus resultiert wiederum ein sehr kleiner Einfluß von Diffusionswiderständen bei allen anderen Substanzen.

Qualitativ ändert sich nichts an diesem Ergebnis, wenn neben dem Diffusionswiderstand im Biomassefilm weitere Transportwiderstände auftreten (s.u.), da sich diese auf alle Substanzen gleichermaßen auswirken.

Heath und Belfort (1987) weisen mit einer vereinfachenden Rechnung (Überführung der Monod-Kinetik in eine Reaktionsgleichung 0. und 1. Ordnung) auf den dominierenden Einfluß des Sauerstofftransports bei Zellkulturen hin. Biryukov und Tarasova (1973) kommen zu dem gleichen Ergebnis bei Myzelflocken.

Zu niedrige Ketosäurekonzentrationen im Biomassefilm sind für die in Abb. 4.36 (s. S. 134) dargestellten Abweichungen nicht verantwortlich. Diese könnten durch den Einfluß der Verweilzeit auf die spez. Produktbildungsrate p erklärt werden. In Kap. 4.1.1.3.2. wurde ein Abfallen von p bei langen Kontaktzeiten der Zellen mit dem Medium beschrieben. Dafür könnte die Entstehung eines Inhibitors verantwortlich sein, der das Transportsystem für die Ketosäure hemmt (s. Kap. 4.1.4.).

4.5.2. Der gesamte diffusive Sauerstofftransport im Sinterglas

In diesem Kapitel soll theoretisch abgeschätzt werden, ob der Sauerstofftransport im Sinterglas auf rein diffusivem Wege erfolgt, oder ob zusätzlich konvektive Anteile existieren. Nach folgendem Lösungsansatz wird vorgegangen:

- 1) Modellierung unter der Annahme, daß nur diffusive Transportmechanismen wirksam sind.
- 2) Berechnung der aktiven, d.h. mit Sauerstoff versorgten immobilisierten Biomassekonzentration pro Reaktorvolumen, die sich aufgrund dieser Annahme ergibt.
- 3) Vergleich der mit diesem Modell errechneten Werte mit den an Messungen nach Kap. 4.4. angepaßten Werte.
- 4) Sind die unter der Annahme eines rein diffusiven Sauerstofftransportes errechneten Werte geringer als die an Messungen angepaßten Werte, muß gefolgert werden, daß ein konvektiver Stofftransport im Sinterglas existiert.

In Abb. 4.40a ist die relativ amorphe poröse Struktur des realen Sinterglasmaterials, welches Poren mit Durchmessern von 60 - 300 μm besitzt, schematisch dargestellt. Man kann annehmen, daß sich verengende und aufweitende Poren kompensieren und daß die geometrischen Verhältnisse durch gleichmäßige zylindrische Poren (s. Abb. 4.40b) beschrieben werden können.

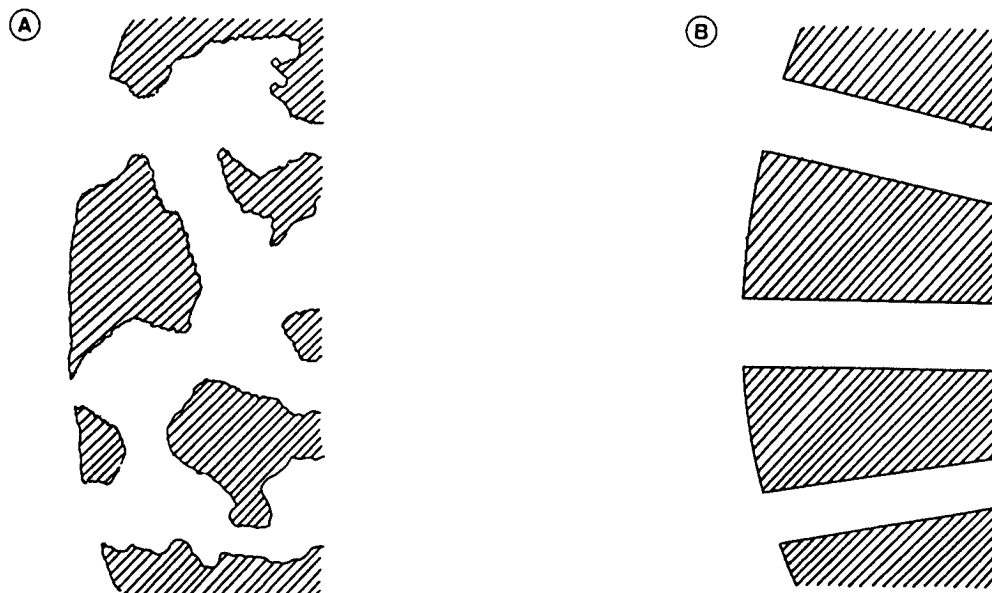


Abb. 4.40: Schematische Darstellung der realen (a) und idealisierten (b) Struktur des Sinterglasmaterials (s. Text)

Der gesamte diffusive Sauerstofftransport im Sinterglas setzt sich zusammen aus der Diffusion im Biomassefilm und in der unbewegten Flüssigkeit innerhalb der Poren. In Abb. 4.41 ist eine idealisierte zylindrische Pore mit dem qualitativen Verlauf der Sauerstoffkonzentration in der unbewegten Fermentationsflüssigkeit dargestellt. Die eingezeichneten Trajektorien repräsentieren die Diffusionsstrecken vom Eingang der Pore bis zu den entsprechenden Elementen des Biomassefilms. Folgende Annahmen wurden getroffen:

- 1) Corynebakterien können zwar vorübergehend anaeroben Stoffwechsel betreiben, sind ohne Sauerstoff auf Dauer jedoch nicht lebensfähig (s. Kap. 2.1.) und lysieren dann vermutlich. Infolgedessen lösen sich Stücke des Biomassefilms von Zeit zu Zeit ab (Karel et al, 1985). Die frei werdenden Bereiche wachsen anschließend wieder zu.
- 2) Es existiert daher ein statistisches Gleichgewicht zwischen nachwachsenden und sich von der Trägeroberfläche ablösenden Zellen. Die Dicke des Biomassefilms bleibt konstant (Rittman und McCarty, 1980; Karel et al, 1985). Die maximale Dicke des Biomassefilms wird durch die Sauerstoffversorgung bestimmt, d.h. der gesamte Biomassefilm ist aktiv.
- 3) Der Biomassefilm innerhalb der Poren gibt nachwachsende Zellen in die unbewegte Fermentationsflüssigkeit ab. Die Mikroorganismen werden laufend aus den Poren heraustransportiert. Dies geschieht durch Diffusion der Zellen aufgrund ihrer Braun'schen Molekularbewegung (Karel et al, 1985), die man gut unter dem Mikroskop beobachten kann. Die Poren wachsen nicht zu (s.a. Anhang A.14).

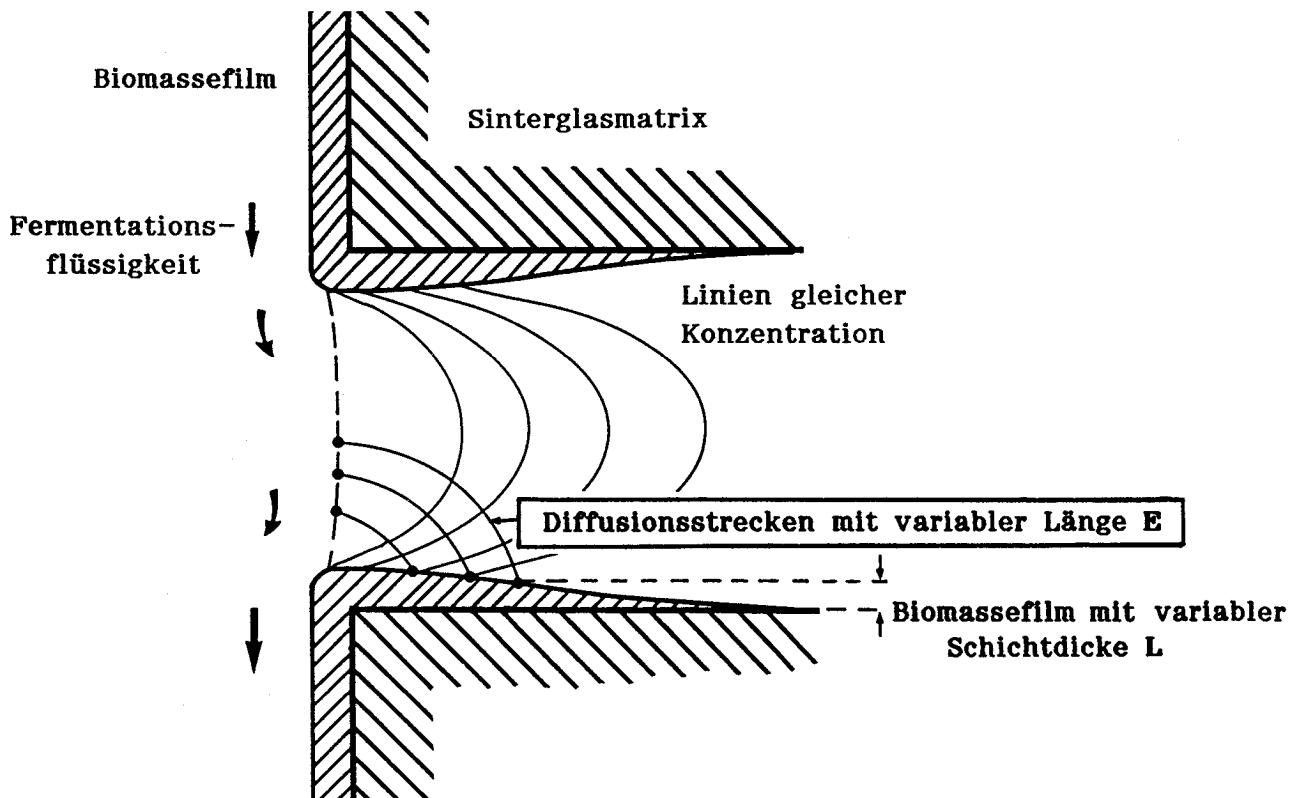


Abb. 4.41: Schematische Darstellung des diffusiven Stofftransports in unbewegter Flüssigkeit innerhalb einer Pore

- 4) Die Konzentration der suspendierten Zellen innerhalb der Poren sei überall gleich und entspricht größenordnungsmäßig der Konzentration in der freien Fermentationsflüssigkeit (s. dazu Fehlerabschätzung unten und Anhang A.14).
- 5) Der Stofftransport in der unbewegten Fermentationsflüssigkeit stellt einen zweidimensionalen Diffusionsvorgang (axiale und radiale Komponente) dar. Entsprechend angesetzte Gleichungen sind jedoch nur mit erheblichem numerischen Aufwand lösbar, welcher für eine Abschätzung nicht gerechtfertigt erscheint. Um die Rechnung zu vereinfachen, wird von einer eindimensionalen Diffusion durch einen unbewegten Flüssigkeitsfilm mit variierender Schichtdicke E ausgegangen (vergleiche Abb. 4.41 mit Abb. 4.42). Die Schichtdicke des aktiven Biomassefilms L ergibt sich dann in Abhängigkeit von E .

Für den Verlauf der Sauerstoffkonzentration im unbewegten Flüssigkeitsfilm wird analog zu (Gl. 4.9.) in Kap. 4.5.1.1 angesetzt:

$$\frac{d^2 O_F}{dz_F^2} = \frac{X \cdot q}{D_O} \quad (\text{Gl. 4.15})$$

Durch zweimalige Integration erhält man:

$$\frac{dO_F}{dz_F} = \frac{X \cdot q}{D_0} \cdot z_F + K_1 \quad (\text{Gl. 4.16})$$

und:

$$O_F = \frac{X \cdot q}{2 \cdot D_0} \cdot z_F^2 + K_1 \cdot z_F + K_2 \quad (\text{Gl. 4.17})$$

mit O_F = Sauerstoffkonzentration im Flüssigkeitsfilm [mmol/l]
 z_F = Längenkoordinate im Flüssigkeitsfilm (s. Abb. 4.42) [mm]
 X = Zellkonzentration im Flüssigkeitsfilm [gTS/l]
 q = Spez. Sauerstoffaufnahme [mmol/gTS/h]
 D_0 = Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in der Fermentationsflüssigkeit [cm²/sec]
 K_1, K_2 = Integrationskonstanten

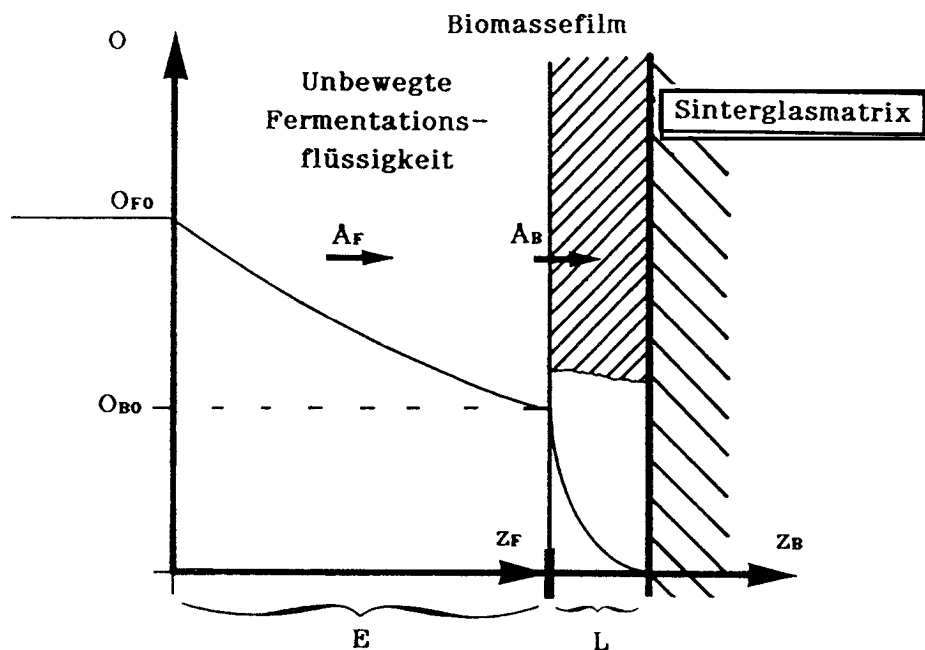


Abb. 4.42: Eindimensionale Diffusion im unbewegten Flüssigkeitsfilm innerhalb der Poren und im Biomassefilm (s. Text)

Für den Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Biomassefilm gilt (s. Kap. 4.5.1.1.):

$$O_B = \frac{\delta_B \cdot q}{2 \cdot D_{e,0}} \cdot z_B^2 - \frac{\delta_B \cdot q \cdot L}{D_{e,0}} \cdot z_B + O_{B0} \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Die differenzierte Gleichung lautet:

$$\frac{dO_B}{dz_B} = \frac{\delta_B \cdot q}{D_{e,o}} \cdot z_B - \frac{\delta_B \cdot q \cdot L}{D_{e,o}} \quad (\text{Gl. 4.18})$$

- O_B = Sauerstoffkonzentration im Biomassefilm [mmol/l]
 z_B = Längenkoordinate im Biomassefilm (s. Abb. 4.42) [mm]
 δ_B = Zelldichte im Biomassefilm [gTS/cm³]
 $D_{e,o}$ = Effektiver Diffusionskoeffizient im Biomassefilm [cm²/sec]
 L = Dicke des aktiven Biomassefilms [mm]
 O_{B0} = Sauerstoffkonzentration auf der Oberfläche des Biomassefilms [mmol/l]

O_{B0} erhält man durch Umformen von (Gl. 4.11) und Einsetzen von L für L_0 :

$$O_{B0} = \frac{L^2 \cdot \delta_B \cdot q}{2 \cdot D_{e,o}} \quad (\text{Gl. 4.19})$$

Randbedingungen:

$$O_F(z_F=0) = O_{F0}$$

$$O_F(z_F=E) = O_B(z_B=0)$$

$$A_F(z_F=E) = A_B(z_B=0)$$

- mit O_{F0} = Sauerstoffkonzentration in der freien Fermentationsflüssigkeit außerhalb der Poren [mmol/l]
 E = Schichtdicke des unbewegten Flüssigkeitsfilms bzw. Entfernung der Oberfläche des Biomassefilms vom Eingang der Pore [mm]
 A_F = Sauerstoffflußdichte im Flüssigkeitsfilm (s. Abb. 4.42) [mmol/cm²/sec]
 A_B = Sauerstoffflußdichte im Biomassefilm [mmol/cm²/sec]

Nach dem ersten Fick'schen Gesetz gilt für die Flußdichten:

$$A_F = - D_o \cdot \frac{dO_F}{dz_F} \quad (\text{Gl. 4.20})$$

$$A_B = - D_{e,o} \cdot \frac{dO_B}{dz_B} \quad (\text{Gl. 4.21})$$

Mit Hilfe der Randbedingungen und (Gl. 4.19 - 4.21) lassen sich die Integrationskonstanten K_1 , K_2 bestimmen und (Gl. 4.17) in eine Gleichung für L in Abhängigkeit von E auflösen:

$$L = - \frac{D_{e,0} \cdot E}{D_0} + \sqrt{\left[\frac{D_{e,0} \cdot E}{D_0} \right]^2 - \frac{X \cdot D_{e,0} \cdot E^2}{\delta_B \cdot D_0} + \frac{2 \cdot D_{e,0} \cdot O_{F0}}{\delta_B \cdot q}} \quad [\text{mm}] \quad (\text{Gl. 4.22})$$

Für $E = 0$ (Diffusion nur im Biomassefilm; s. letztes Kapitel) fallen alle Terme außer dem dritten unter der Wurzel weg. Es gilt $O_{B0} = O_{F0}$ und $L(E=0) = L_0$. (Gl. 4.22) geht dann in (Gl. 4.11) über. Der zweite Term unter der Wurzel enthält den Einfluß der frei suspendierten Mikroorganismen (Konzentration X).

In Abb. 4.43 ist L über E nach (Gl. 4.22) für verschiedene X aufgetragen. Die Dicke des aktiven Biomassefilms fällt nach kurzen Wegstrecken innerhalb einer Pore auf niedrige Werte ab. Mit steigendem E wirkt sich der Sauerstoffverbrauch der frei suspendierten Zellen (X) stärker auf L aus.

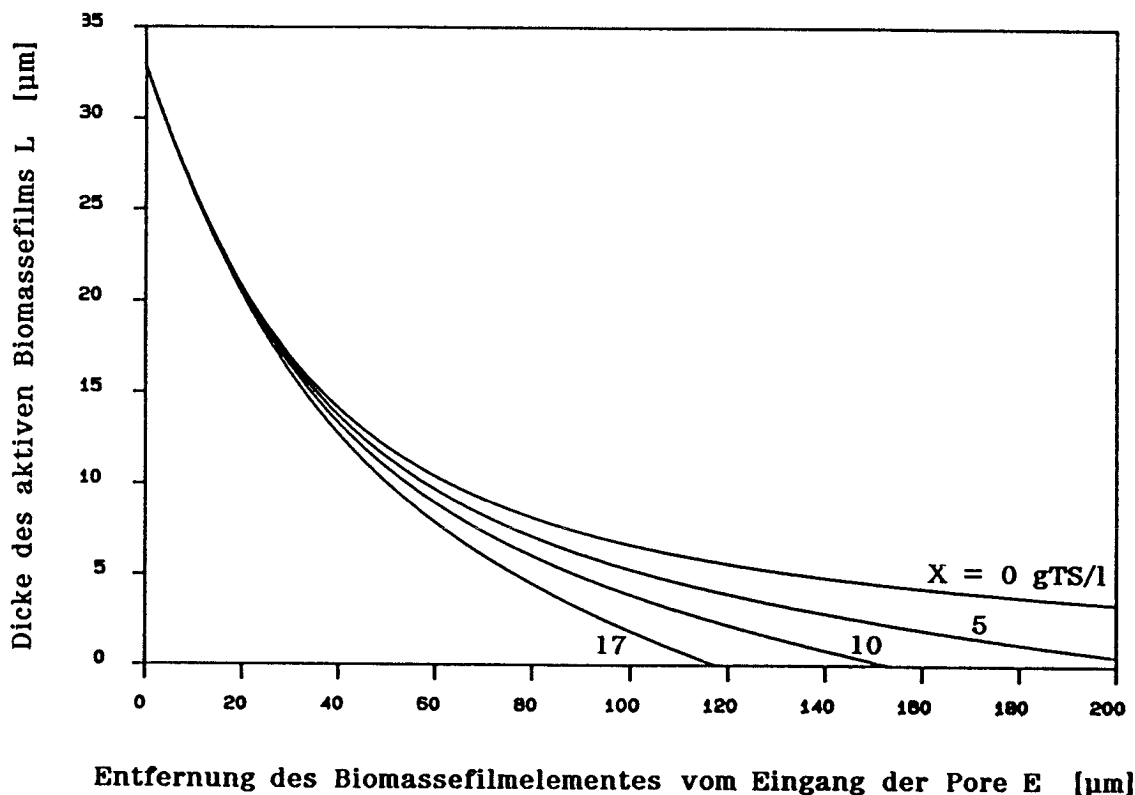


Abb. 4.43: Dicke des aktiven Biomassefilms in Abhängigkeit von der Entfernung vom Eingang der Pore

Auftragung nach (Gl. 4.22); $D_{e,0} = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$; $D_0 = 1.9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$; $\delta_B = 0.17 \text{ gTS}/\text{cm}^3$; $O_{F0} = 0.173 \text{ mmol}/\text{l}$; $q = 10 \text{ mmol}/\text{gTS}/\text{h}$;
Parameter: Konzentration der frei suspendierten Mikroorganismen X

Das gesamte in einer Pore immobilisierte aktive Biomassevolumen errechnet sich zu:

$$V_{1P} = \int_{E=0}^{E_{\max}} A_M(E) dE = \int_{E=0}^{E_{\max}} \pi \cdot [R_P^2 - (R_P - L)^2] dE \quad [\text{cm}^3] \quad (\text{Gl. 4.23})$$

mit V_{1P} = Biomassevolumen in einer zylindrischen Pore $[\text{cm}^3]$
 $E_{\max}$ = Maximale durch Mikroorganismen kolonisierte Porenlänge $[\text{mm}]$
 $A_M(E)$ = Mit Biomasse bewachsende ringförmige Querschnittsfläche der Pore in Abhängigkeit von E $[\text{cm}^2]$
 R_P = Radius der Pore $[\text{mm}]$

Für die insgesamt auf dem Sinterglas immobilisierte aktive Biomassemenge gilt:

$$B_{\text{Ges}} = B_A + B_P = A_S \cdot \delta_B \cdot [(1 - a_P) \cdot L_0 + a_P \cdot V_{1P} / (R_P^2 \cdot \pi)] \quad [\text{gTS/gGlas}] \quad (\text{Gl. 4.24})$$

mit B_{Ges} = Gesamte auf dem Sinterglas immobilisierte aktive Biomassemenge $[\text{gTS/gGlas}]$
 B_A = Auf der äußeren nicht aus Pore bestehenden Oberfläche des Sinterglases immobilisierte aktive Biomassemenge $[\text{gTS/gGlas}]$
 B_P = Gesamte in den Poren immobilisierte aktive Biomassemenge $[\text{gTS/gGlas}]$
 A_S = Gesamte äußere Oberfläche des Sinterglases $[\text{cm}^2/\text{gGlas}]$
 a_P = Anteil der gesamten Porenquerschnittsfläche an der gesamten äußeren Oberfläche des Sinterglases $[-]$

Die auf das Reaktorvolumen bezogene aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 berechnet sich zu:

$$X_1 = B_{\text{Ges}} \cdot G_{\text{Ges}} / V_R \quad [\text{gTS/l}] \quad (\text{Gl. 4.25})$$

mit X_1 = Aktive immobilisierte Biomassekonzentration $[\text{gTS/l}]$
 G_{Ges} = Gesamte Sinterglasfüllung im Reaktor $[\text{gGlas}]$
 V_R = Reaktorvolumen $[\text{l}]$

Ein Fortran 77 - Programm für (Gl. 4.22 - 4.25) ist im Anhang A.13 beigelegt ist. Am Beispiel des in Abb. 4.36 (s. S. 134) dargestellten Versuches wurde die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 , die sich aufgrund des Sauerstofftransportes ergibt, mit folgenden Parametern abgeschätzt:

- 1) Kugelförmige Sinterglaskörper $\varnothing$ 3 mm mit einer scheinbaren Dichte von 0.89 g/cm³ (s. Kap. 4.2.3.) besitzen eine äußere Oberfläche von $A_S = 22.4 \text{ cm}^2/\text{g}$.
- 2) 60 % der äußeren Oberfläche der Trägerkörper bestehen aus Porenöffnungen ($a_P = 0.6$) mit einem durchgängigen mittleren Radius von $R_P = 0.05 \text{ mm}$ (abgeleitet aus Herstellerangaben).
- 3) Die äußere Oberfläche der Trägerkörper, die nicht aus Poren besteht, ist mit einem Biofilm der aktiven Schichtdicke $L_0 = 0.033 \text{ mm}$ (s.o.) bedeckt.
- 4) Die Zelldichte im Biomassefilm beträgt $\delta_B = 0.17 \text{ gTS/cm}^3$ (s.o.).

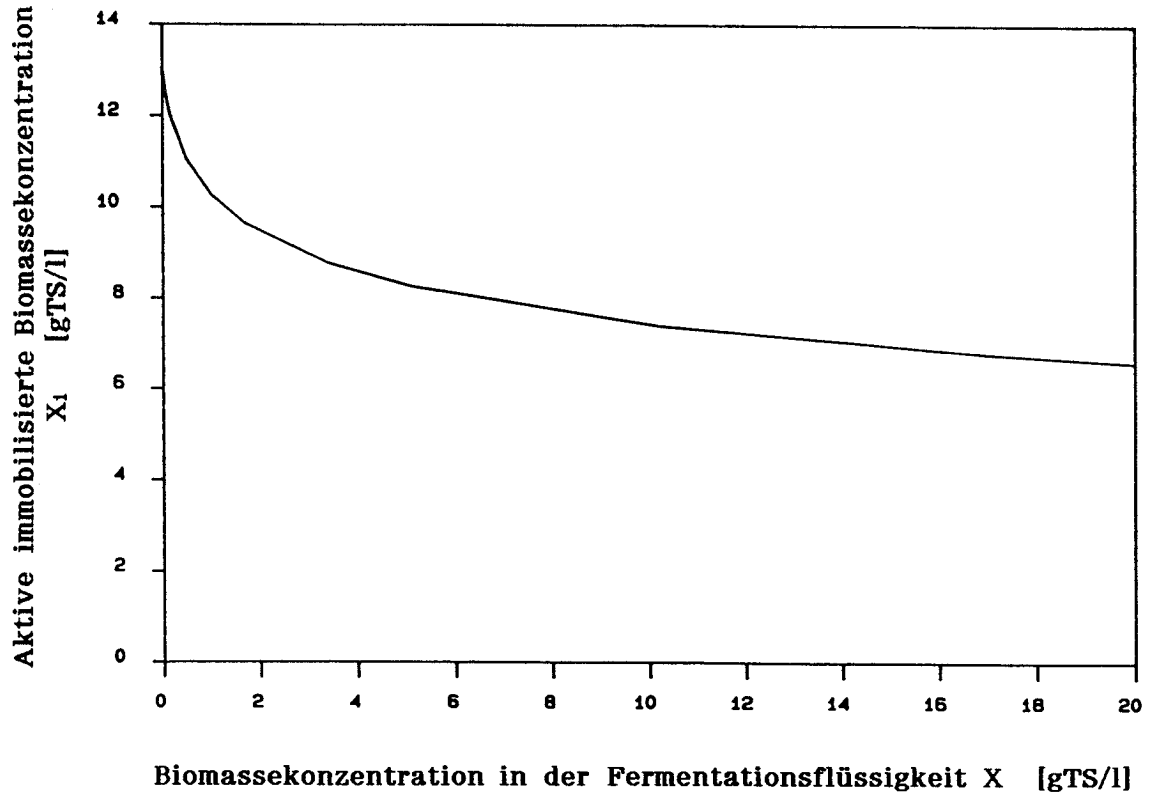


Abb. 4.44: Aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 in Abhängigkeit von der Konzentration X der frei suspendierten Mikroorganismen
 Auftragung nach (Gl. 4.22 - 25); Werte wie bei Abb. 4.43; $R_p = 0.05$ mm; $A_s = 22.4$ cm²/g; $a_p = 0.6$; $G_{ges} = 70$ g; $V_R = 135$ ml

In Abb. 4.44 ist die aktive immobilisierte Zellkonzentration X_1 über der Konzentration X der frei suspendierten Mikroorganismen aufgetragen. Bei Werten von $X = 7 - 17$ gTS/l, die bei dem in Abb. 4.36 dargestellten Versuch beobachtet wurden, ergibt sich ein relativ konstanter Wert von $X_1 = 6 - 7$ gTS/l.

Gemessen und mit dem in Kap. 4.4. beschriebenen Modell angepaßt wurde ein Wert von $X_1 = 18$ gTS/l (s. S. 134).

Die Größenordnungen der mit zwei völlig unterschiedlichen theoretischen Ansätzen:

- 1) Modellierung des beobachteten Reaktorverhaltens
- 2) Modellierung des Sauerstofftransportes

gewonnenen Werte von X_1 stimmen also überein.

Der Vergleich zeigt allerdings auch, daß der hohe an die Versuchsergebnisse angepaßte Wert von $X_1 = 18 \text{ gTS/l}$ allein durch diffusiven Stofftransport nicht erklärbar ist. Bei dem in Abb. 4.33 (s. S. 125) dargestellten Versuch sind die Verhältnisse noch deutlicher. Dort wurden höhere Raum-Zeit-Ausbeuten (höheres X_1) mit weniger Glasfüllung erzielt als bei dem oben diskutierten Versuch. Daraus muß man schließen, daß neben diffusivem Sauerstofftransport zusätzlich ein konvektiver Transport innerhalb der Poren existiert. Möglicherweise werden Bereiche der Trägerkörper von Medium ganz durchströmt oder es kommt zum Eindringen von turbulenten Flüssigkeitswirbeln in offene Poren.

Fehlerabschätzung

Im folgenden werden die Fehlerabweichungen, die sich aufgrund einiger vereinfachenden Annahmen und Abschätzungen dieses Kapitels ergeben könnten, diskutiert.

1) Diffusionskoeffizient für Sauerstoff im Biomassefilm $D_{e,0} = 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$:

Dieser abgeschätzte Wert ist im Vergleich zu den von Karel et al. (1985) recherchierten Daten eher etwas zu hoch. Bei niedrigerem Diffusionskoeffizienten errechnet sich aus (Gl. 4.22 - 4.25) eine geringere immobilisierte Biomassekonzentration X_1 . Der Unterschied zu dem hohen an die Meßpunkte angepaßten Wert von $X_1 = 18 \text{ gTS/l}$ wird noch größer, was zusätzlich für einen konvektiven Stofftransport im Sinterglas sprechen würde.

2) Spez. Sauerstoffverbrauchsrate $q = 10 \text{ mmol/gTS/h}$:

Die spez. Sauerstoffverbrauchsrate kann Maximalwerte bis zu $q = 19 \text{ mmol/gTS/h}$ annehmen (s. Kap. 4.1.1.3.3.). Bei größerem q folgt aus (Gl. 4.22 - 4.25) eine geringere immobilisierte Biomassekonzentration X_1 (s.o.).

3) Annahme 4); S. 146: Die Konzentration der suspendierten Mikroorganismen innerhalb der Poren entspricht etwa der Konzentration in der freien Fermentationsflüssigkeit außerhalb der Poren:

Die Erhöhung der Mikroorganismenkonzentration aufgrund innerhalb der Poren nachwachsender Zellen wurde im Anhang A.14 abgeschätzt. Sie beträgt etwa $X = 5 \text{ gTS/l}$. Wie Abb. 4.44 zeigt, ist bei einer Erhöhung der mittleren suspendierten Biomassekonzentration X (in den Poren) in dieser Größenordnung nur eine geringe Erniedrigung von X_1 zu erwarten (s.o.).

Vergleich der gemessenen und berechneten Änderung von X_1 bei Erhöhung des pO_2

In Abb. 4.45 ist der berechnete Zusammenhang zwischen dem pO_2 in der Fermentationsflüssigkeit ($\sim O_{F0}$) und der aktiven immobilisierten Biomassekonzentration X_1 dargestellt. Es ist ein nicht ganz linearer Anstieg von X_1 mit dem pO_2 zu erkennen. Im Bereich zwischen $pO_2 = 10$ und 20% steigt X_1 um den Faktor 1.70 an.

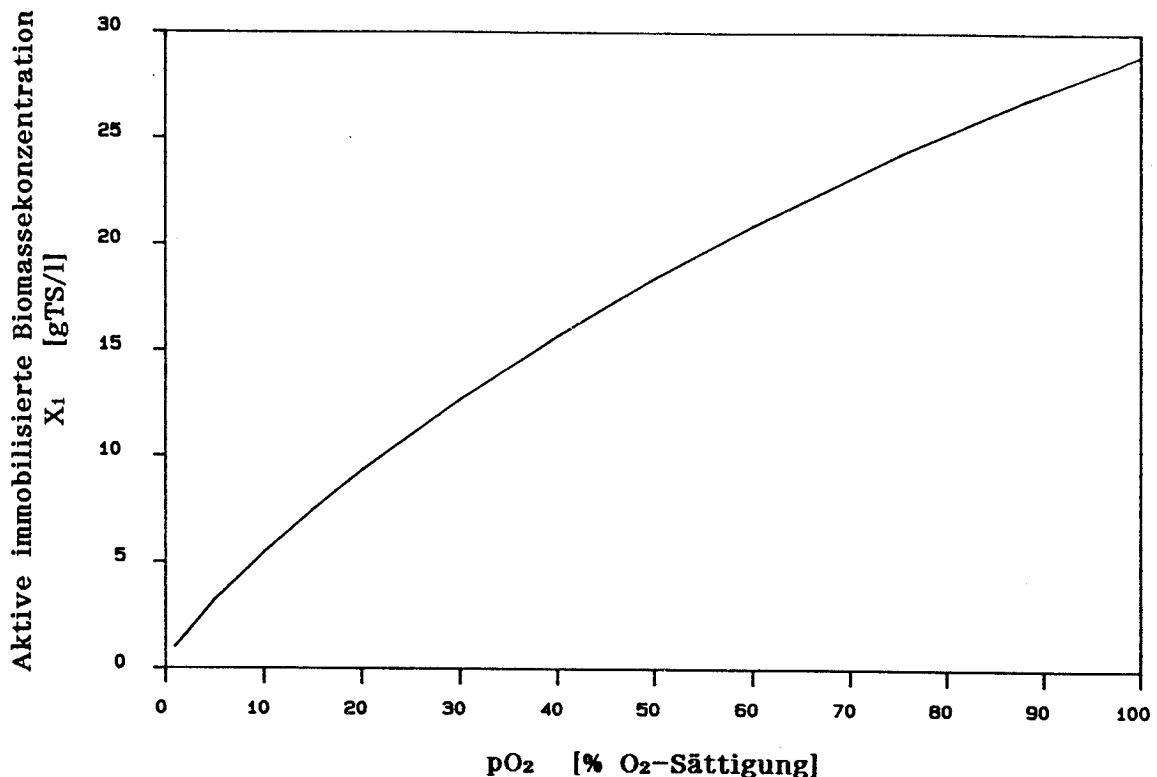


Abb. 4.45: Einfluß des pO_2 (O_{F0}) in der Fermentationsflüssigkeit auf die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1
Auftragung nach (Gl. 4.22 - 4.25); Werte wie Abb. 4.44; $X = 10$ gTS/l

Bei einem zusätzlichen konvektiven Stofftransport im Sinterglas wird der relative Einfluß des Diffusionswiderstandes im Flüssigkeitsfilm im Vergleich zum Diffusionswiderstand im Biomassefilm geringer. Im Extremfall (Diffusionswiderstand im Biomassefilm ist dominierend) gilt (Gl. 4.11). Bei einer Verdoppelung des pO_2 bzw. von O_{B0} ist dann eine Steigerung von L_0 bzw. X_1 um den Faktor $\sqrt{2}$ zu erwarten (s. Kap. 4.5.1.1.). Die tatsächliche Steigerung von X_1 bei einer Verdoppelung des pO_2 muß also zwischen den Werten 1.41 und 1.70 liegen.

Bei dem in Abb. 4.39 (s. S. 141) dargestellten Versuch wurden Raschigringe ϕ 7.7 mm (anderes A_S) und ein anderes Verhältnis zwischen Glasfüllung (G_{Ges}) und Reaktorvolumen (V_R) verwendet als im Beispiel von Abb. 4.45. Die relative Änderung von X_1 in Abhängigkeit vom pO_2 (O_{F0}) bleibt nach (Gl. 4.24 und 4.25) jedoch gleich. Ein Vergleich der nach Kapitel 4.4 und nach diesem Kapitel errechneten absoluten Werte zeigt, daß bei dem Versuch von Abb. 4.39 der Anteil des konvektiven Sauerstofftransports relativ groß sein muß. Eine Anpassung von X_1 an die Meßergebnisse nach Kap. 4.4. ergibt Werte von $X_1 = 14.3$ und 22.4 gTS/l bei einem pO_2 von 10 bzw. 20 %. Das entspricht einer Steigerung um den Faktor 1.57. Dieser Wert liegt also tatsächlich, wie oben theoretisch für einen konvektiven Transport abgeleitet wurde, zwischen 1.41 und 1.70.

Zusammenfassung

Für die Existenz eines konvektiven Stofftransports im Sinterglas lassen sich folgende Hinweise aufführen:

- 1) Aus der Modellierung des gesamten diffusiven Sauerstofftransports am Beispiel des in Abb. 4.36 dargestellten Versuches folgt eine aktive immobilisierte Biomassekonzentrationen von $X_1 = 6 - 7 \text{ gTS/l}$. Aus Messungen ergibt sich jedoch anhand von Kapitel 4.4 ein etwa dreifach höherer Wert von $X_1 = 18 \text{ gTS/l}$. Die hohen tatsächlichen Biomassekonzentrationen lassen sich allein durch diffusive Sauerstoffversorgung der immobilisierten Mikroorganismen also nicht erklären.
- 2) Die gemessene Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute bzw. aktiven immobilisierten Biomassekonzentration bei Verdoppelung der gelösten Sauerstoffkonzentration ($pO_2 = 10$ auf 20%) stimmt mit dem aufgrund eines konvektiven Stofftransports berechneten Steigerungsbereich überein.
- 3) Die Modellrechnungen von Kapitel 4.5.1.1. ergaben eine maximale Schichtdicke des Biomassefilms im Bereich von $33 \mu\text{m}$. Das Sinterglas besitzt Poren im Bereich von $\varnothing 60 - 300 \mu\text{m}$. In Abb. 4.46 ist eine große Pore mit einem Durchmesser von $200 \mu\text{m}$ maßstabsgetreu dargestellt, die durch einen Biomassefilm verschlossen ist. Dieser Zustand ist jedoch unwahrscheinlich,

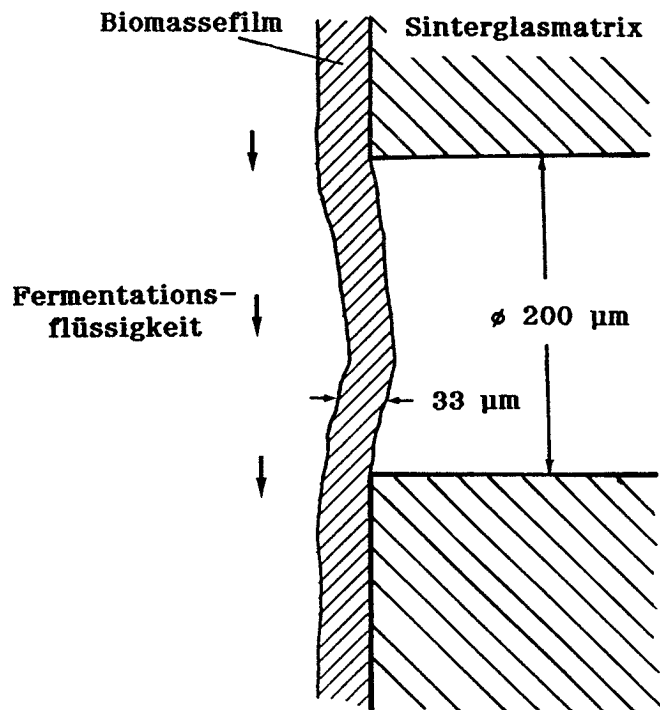


Abb. 4.46: Maßstabsgetreue Darstellung einer großen Pore, die durch einen Biomassefilm verschlossen ist (s. Text)

wenn keine toten Zellen akkumulieren und die Bindungskräfte zwischen den Mikroorganismen nicht zu groß sind (durch den Phosphorgehalt der Zellen steuerbar). Dünne Biomassefilme vor den Öffnung großer Poren sind vermutlich mechanisch nicht stabil gegenüber den Turbulenzen und Druckgradienten an den Trägerkörpern (s.u.).

- 4) Berechnung des Druckverlustes an den Trägerkörpern führen zu Strömungsgeschwindigkeiten in senkrecht (in Richtung des Druckgradienten) stehenden Poren ($\varnothing$ 100 μm) von etwa 0.6 cm/sec (s. Anhang A.15). Ein Flüssigkeitselement durchquert die kugeligen Sinterglaspartikel ($\varnothing$ 3 mm) also etwa in einer halben Sekunde. Unter diesen Bedingungen ist es unwahrscheinlich, daß sich Mikroorganismen in den Poren anhäufen und diese verschließen.
- 5) Experimentelle Befunde (s. Kap. 4.3.4.): Bei sehr hohem Phosphorgehalt der Corynebakterien bilden diese hydrophobe Zellwände aus und adsorbieren sehr gut. Unter diesen Bedingungen wachsen die Poren des Sinterglases offenbar zu. Ein Durchströmen des Sinterglases ist nicht möglich. Die Sauerstoffversorgung im Inneren des Sinterglases ist schlecht. Es werden schlechtere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt als bei mittlerem Phosphorgehalt der Zellen, bei dem die Poren des Sinterglases offenbar nicht zuwachsen.

Schlußfolgerungen

- 1) Es existiert ein konvektiver Stofftransport im Sinterglas.
- 2) Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung einer Kontrolle des Adsorptionsverhaltes der Mikroorganismen. Eine übermäßige Anhäufung von Biomasse auf der Glasoberfläche muß verhindert werden. Die Bindungskräfte zwischen den Zellen müssen so eingestellt werden, daß absterbende Zellen sich aus dem Verband lösen können und die Poren nicht zuwachsen. Mit den in Kap. 4.3. dargestellten Ergebnissen sind die Voraussetzungen für eine Kontrolle des Adsorptionsverhaltens bei Corynebakterien gegeben.
- 3) Die Rechnungen ergaben geringe Schichtdicken des aktiven Biomassefilms (33 μm) und geringe Eindringtiefen der Mikroorganismen ins Sinterglas ($\sim$ 150 μm) bei nur diffusivem Stofftransport (s. Abb. 4.43). Für eine gute Sauerstoffversorgung im Inneren der porösen Trägerkörper und damit eine hohe Produktivität ist daher ein starker konvektiver Stofftransport erforderlich. Es sollten daher spezielle Trägerkörper entwickelt werden, die eine gute Durchströmung des gesamten Sinterglasmaterials ermöglichen.
- 3) Dieses Kapitel 4.5. hat gezeigt, daß die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 eine Größe ist, mit der die Aktivität der gebundenen Mikroorganismen sinnvoll erfaßt werden kann. X_1 wird allein durch die Sauerstoffversorgung der Zellen kontrolliert. Bei üblichen Werten von $X > 2$ gTS/l (s. Abb. 4.44) ist X_1 relativ konstant und unabhängig von der Durchflußrate, wie bei dem in Kap. 4.4. beschriebenen Modell angenommen wurde. Voraussetzung ist, daß der pO_2 in der Fermentationsflüssigkeit auf gleichbleibende Höhe geregelt wird.

4.6. Reaktorauswahl

4.6.1. Wirbelschichtreaktor

Die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 ist nach (Gl. 4.24 und 4.25) direkt proportional zur Volumen- bzw. Gewichts-bezogenen Oberfläche A_s des Sinterglasmaterials. Dieses steigt bei Kugelgeometrie mit fallendem Radius linear an. Es sollten daher möglichst kleine Trägerkörper verwendet werden. Im Festbettumlaufreaktor konnten Sinterglaskugeln mit einem Durchmesser < 3 mm nicht eingesetzt werden. Bei kleineren Partikeln staut sich Gas unter den Trägerkörpern auf und strömt unregelmäßig durch die Schüttung. Es wurden daher Sinterglaskugeln mit einem Durchmesser von $1 - 1.4$ mm in einem Gas/Flüssigkeits-fluidisierten Wirbelschichtreaktor erprobt:

Reaktorvolumen [ml]:	195
Sinterglasfüllung (Kugeln $\varnothing 1 - 1.4$ mm; gesiebt) [g]:	52
oberflächenbehandelt gemäß Vorschrift 11, Kap. 3.3.1.2.	
Umpumprate [l/min]	4.8 - 5.1
Begasungsrate [vvm]	0.35 - 0.4
Bettausdehnung [%]	50

Medium Normal (s. Tab. 3.5), jedoch mit 2.4 g KH_2PO_4 wurde eingesetzt. Bei der hohen Phosphatkonzentration bilden die Mikroorganismen hydrophobe Zellwände aus, was den raschen Aufbau eines Biomassefilms ermöglicht.

Mit diesem Reaktor konnten allerdings keine besseren Ergebnisse erzielt werden als mit den Festbettumlaufreaktoren:

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/d]:	65
(bei 75 % Umsatz)	
Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/d]:	50
(bei 90 % Umsatz)	
Frei suspendierte Biomasse [gTS/l]:	10 - 17
Durchflußrate [l/h]	0.21 - 0.33
Gesamte Versuchsdauer [d]:	49

Nach dem in Kap. 4.4. beschriebenen Modell errechnet sich eine aktive immobilisierte Biomassekonzentration von etwa $X_1 = 10$ gTS/l. Diese liegt deutlich unter den Werten, die für Festbettumlaufreaktoren ermittelt wurden. Folgende Gründe sind dafür maßgeblich:

1) Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase

Es konnte trotz reiner O_2 -Begasung nicht ausreichend Sauerstoff in die Fermentationsflüssigkeit eingetragen werden. Der p_{O_2} fiel bei hohen Biomassekonzentrationen auf null ab. Die Begasungsrate ließ sich nicht weiter steigern, da sich im Wirbelbett sonst große Blasen bildeten und Sinterglaspartikel mit unter das Rückhaltenetz gerissen wurden.

Der im Vergleich zu den Festbettumlaufreaktoren schlechtere Sauerstoffübergang (k_{La} -Wert) ist durch den Einfluß der suspendierten Sinterglaspartikel zu erklären. Nach Nguyen-Tien et al. (1985) bzw. Darton (1985) kommt es in Wirbelschichtreaktoren mit suspendierten Glaskugeln von weniger als 3 mm Durchmesser zu einer Erniedrigung des Sauerstoffübergangs im Vergleich zu Reaktoren ohne Füllkörper. Die an dem Begasungsorgan gebildeten Mikroblasen stauen sich offensichtlich unter den Partikeln an und koaleszieren. Bei Teilchendurchmessern > 3 mm wurde eine Erhöhung des k_{La} -Wertes beobachtet und mit einer Neuzerteilung von Makroblasen durch die Füllkörper erklärt (Deckwer und Schumpe, 1983).

2) Sinterglaskonzentration im Reaktor

Für die Stabilität der Wirbelschicht bei hoher Begasungsrate sind hohe Strömungsgeschwindigkeiten der Flüssigphase erforderlich. Wegen der daraus resultierenden großen Bettdehnung kann nur verhältnismäßig wenig Sinterglas in den Reaktor gefüllt werden. Die durch die Mikroorganismen kolonisierbare Oberfläche ist begrenzt.

3) Biomasseanhäufung im Zwischenkornvolumen

Im Wirbelschichtreaktor wird die außen an den Trägerkörpern haftende Biomasse ständig durch Turbulenzen und gegenseitige Berührung der suspendierten Partikel entfernt. Bei den Festbettumlaufreaktoren war zum Teil eine Anhäufung von Mikroorganismen zwischen den einzelnen Trägerkörpern beobachtet worden, was zu einer Steigerung der insgesamt immobilisierten Biomasse führt.

4) Verstopfung der Poren des Sinterglases durch Zellen

Womöglich wurde der Reaktor zu lange mit Phosphat-reichem Medium betrieben, so daß die Poren des Sinterglases durch hydrophobe Zellen verstopft wurden.

5) Konvektiver Stofftransport im Sinterglas

Kap. 4.5.2. hat gezeigt, daß die Trägerkörper im Festbettumlaufreaktor teilweise durchströmt werden. Im Wirbelschichtreaktor dagegen ist der Staudruck an den einzelnen Partikeln relativ gering. Diese können sich außerdem in der Strömung drehen. Dadurch ist der konvektive Stofftransport in Sinterglas beim Wirbelschichtreaktor vermutlich relativ gering.

4.6.2. Festbettumlaufreaktor

Die besten Ergebnisse wurden im Festbettumlaufreaktor mit Sinterglas-Raschigringen erzielt:

Reaktorvolumen [ml]:	180
Sinterglasfüllung (Raschigringe ϕ 7.7 mm) [g]:	55
oberflächenbehandelt gemäß Vorschrift 11, Kap. 3.3.1.2.	
Durchflußrate [l/h]:	0.22 - 0.36
Frei suspendierte Biomasse [gTS/l]:	12 - 15
Ausbeute [%]:	90
Selektivität [%]:	95
Maximale Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/d]:	100 - 110
(über 18 Tage)	
Begasungsrate [vvm]:	0.5 - 0.7
Gesamte Versuchsdauer [d]:	99

In Abb. 4.33 (s. S. 125) ist der zeitliche Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute dieses Versuches dargestellt. Die aktive immobilisierte Biomassekonzentration X_1 beträgt über 30 gTS/l. Nach Kap. 4.5. muß ein relativ hoher konvektiver Sauerstofftransport im Sinterglas vorliegen. Das wurde möglicherweise deshalb erreicht, weil die Phosphatkonzentration im Medium nur kurz (durch einmaliges Einspritzen von 1 M KH_2PO_4 -Lösung) auf ein hohes Niveau angehoben wurde. Während dieser begrenzten Zeit erhalten die Mikroorganismen hydrophobe Zellwände und bilden einen Biomassefilm aus. Eine übermäßige Anhäufung von Biomasse und ein Zuwachsen der Poren tritt offenbar nicht auf, so daß die Trägerkörper von der Fermentationsflüssigkeit durchströmt werden können.

Die Versuche und theoretischen Überlegungen zeigen, daß bei aeroben Prozessen kleinere Trägerkörper in Verbindung mit der Wirbelschichttechnik nicht unbedingt zu besseren Raum-Zeit-Ausbeuten führen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich die Eigenschaften eines "idealen Reaktors" für die aerobe Aminosäurefermentation mit trägerfixierten Zellen folgendermaßen abschätzen:

Reaktor:	Festbettumlaufreaktor
Trägerkörperwerkstoff:	Anorganisches Material (z.B. Glas)
Trägerkörperoberfläche:	Modifiziert mit kationischen Polymeren (z.B. DEAE-Dextran)
Struktur der Trägerkörper:	Material möglichst hoher Porosität (Poren ϕ 100 - 150 μm) durchsetzt mit regelmäßigen durchgängigen Kanälen (ϕ 300 - 500 μm)
Form der Trägerkörper:	Jede beliebige Form, die ein Durchströmen der Trägerkörper erlaubt (z.B. wabenartiges Material)
Sauerstoffversorgung:	Möglichst hoher $p\text{O}_2$ in der Fermentationsflüssigkeit
Biokatalysator:	Mikroorganismen, deren Adsorptionsverhalten in vivo gesteuert werden kann, ohne deren Produktivität zu beeinflussen

4.6.3. Vergleich der erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten mit Literaturdaten

Die oben angegebenen Werte für die Raum-Zeit-Ausbeute sind auf das Reaktorflüssigkeitsvolumen bezogen (s. Begriffsdefinition). Für die kostenmäßige Auslegung eines Reaktors ist das "umbaute Flüssigkeitsvolumen" (s. Begriffsdefinition) maßgebend. Bezogen auf diese Größe ergibt sich für den oben beschriebenen Versuch eine Raum-Zeit-Ausbeute von 90 - 98 g/l/d. (Literaturwerte sind gewöhnlich auf das Reaktorflüssigkeitsvolumen bezogen.)

Die in dieser Arbeit erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten liegen deutlich über den in Tab. 1.2 (s. S. 6) angegebenen Werten aus der Literatur. Die Raum-Zeit-Ausbeute läßt sich in großen Reaktoren, in denen pro Reaktorvolumen mehr Trägerkörper untergebracht werden können (kleinerer Volumenanteil des äußeren Umlaufs und des Reaktorkopfes), wahrscheinlich noch weiter steigern. Tab. 4.17. zeigt einen Vergleich mit Ergebnissen, die mit dem gleichen mikrobiologischen System im Rührkessel in Verbindung mit einem der angegebenen Mittel der Zellrückführung gewonnen wurden. Die Adsorption an Sinterglas erweist sich als eine leistungsfähige Methode zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute bei aeroben Aminosäurefermentationen, die ökonomisch interessant sein könnte.

Methode	Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/d] ¹	Angabenquelle
Zentrifugalseparation	52	Wichmann et al. (1988)
Querstromfiltration	79	Wichmann et al. (1988)
Zentrifugalseparation	100	Wichmann (1988)
Adsorption an Sinterglas	100	Diese Arbeit

Tab. 4.17: Maximale Raum-Zeit-Ausbeuten bei der L-Leucinfermentation mit verschiedenen Methoden der Zellrückhaltung bzw. Rückführung

¹: Maximalwerte bei einem Umsatz 80 - 90 % bezogen auf das Reaktorflüssigkeitsvolumen

5. Zusammenfassung & Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Trägerfixierung von aeroben Mikroorganismen auf offenporigem Glassintermaterial zu entwickeln. Als Beispiel für einen mikrobiellen Prozeß mit hohem Sauerstoffbedarf wurde die fermentative Gewinnung von L-Leucin aus α -Ketoisocapronsäure mit *Corynebacterium glutamicum* gewählt.

Im einzelnen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Mikrobiologie

Die Corynebakterien setzen die Vorstufe α -Ketoisocapronsäure mit einer Selektivität von etwa 95 % zu L-Leucin um. Die dafür erforderlichen Reduktionsequivalente stammen aus dem Energiestoffwechsel der Zellen. Die eingesetzte Glucose wird unter aeroben Bedingungen vollständig zu CO_2 durchoxidiert. Die Leucinbildung ist unabhängig vom Wachstum und läuft auch bei Zellen ab, die 15 Tage ohne Phosphat kultiviert wurden. Vermutlich kontrolliert der Transport der α -Ketoisocapronsäure durch die Zellwand der Corynebakterien die Geschwindigkeit der Umsetzung. Die spez. Produktbildungsrate fällt mit der Verweilzeit der Zellen im Medium ab. Dafür wurde ein Inhibitormechanismus (s. Kap. 4.1.4.) vorgeschlagen. Die optimalen Kulturbedingungen betragen: 30°C, pH 7.4; bestes Wachstum bei geringem osmotischen Druck.

Eine chemische Zersetzung der α -Ketoisocapronsäure, die zur Bildung von toxischem iso-Valeraldehyd führt, hatte bisher eine kontinuierliche Kultivierung der Zellen unmöglich gemacht. Durch Zusatz von Citronensäure und EDTA lassen sich Manganionen, die für die Zersetzungsreaktion verantwortlich sind, in unschädliche Komplexe umwandeln.

Eine Mediumoptimierung kann man sehr effektiv in einem turbidostatisch geregelten Reaktor durchführen. Die Mikroorganismen wachsen ständig mit maximaler Geschwindigkeit und reagieren sofort auf Änderungen der Umgebungsbedingungen. Mit dieser Kulturtechnik konnte ein Spurenelemente- und Vitaminmangel im Medium aufgeklärt werden. Mit den modifizierten Medien ist nun eine stabile kontinuierliche Kultur der Corynebakterien über lange Zeit möglich.

2. Oberflächenmodifizierung des Sinterglases

Die eingesetzten Corynebakterien haften nicht an unbehandelten Glasoberflächen. Die Adsorptionsbedingungen lassen sich wesentlich verbessern, wenn die Trägerkörper durch positiv geladene Aminogruppen modifiziert werden. Diese binden die negativ geladenen Mikroorganismen durch elektrostatische Anziehungskräfte. Das kationische Polymer DEAE-Dextran ist für die Oberflächenmodifizierung besonders geeignet. Die Substanz bieten den

Mikroorganismen eine große Anzahl von Bindungsstellen und führt zu einer stabilen Haftung. Die Ionenstärke des Mediums, der pH und die Dissoziationskonstanten der Aminogruppen haben einen signifikanten Einfluß. Sinterglasmaterial mit kovalent gebundenem DEAE-Dextran weist selbst in 1 M Carbonatlösung, pH 11.5 eine gute Haltbarkeit auf. Einsatzmöglichkeiten dieser Trägerkörper zeichnen sich im Bereich der Zellkulturtechnik ab.

3. Oberflächeneigenschaften der Mikroorganismen

Neben den Oberflächeneigenschaften der Trägerkörper bestimmen die der Mikroorganismen Art und Stärke der gegenseitigen Anziehungskräfte. Unter Phosphat-Überschuß bzw. -Mangel aufgezogene Corynebakterien weisen einen bisher nicht beschriebenen Unterschied im Flockulations- und Adsorptionsverhalten auf. Dieses konnte durch Messung der Oberflächenladung und Hydrophobizität der Mikroorganismen erklärt werden. Phosphor-gesättigte Corynebakterien adsorbieren vergleichsweise gut. Sie besitzen eine hydrophobe Zellwand, was vermutlich auf die Anwesenheit von Lipoteichonsäuren zurückzuführen ist. Phosphor-verarmte Zellen sind offenbar nicht in der Lage, diese Phosphor enthaltenden Polymere zu synthetisieren. Sie sind daher hydrophil. Die Oberflächenladung beider Zelltypen ist ungefähr gleich. Die spez. Produktbildungsrate der Mikroorganismen wird durch ihren Phosphorgehalt nicht beeinflusst.

Durch Kontrolle der Phosphatkonzentration im Medium lassen sich die Oberflächeneigenschaften der Zellen im laufenden Prozeß gezielt verändern und den Erfordernissen der Fermentation anpassen. Die Methode der adsorptiven Bindung erhält durch diese neue Variationsmöglichkeit (in-vivo-Adsorptionskontrolle durch die Kulturbedingungen) eine große Flexibilität.

4. Modellierung des Reaktorverhaltens

Basierend auf den mikrobiologischen Ergebnissen wurde ein Modell der kontinuierlichen Leucinfermentation mit trägerfixierten Zellen erstellt. Die gebundenen Mikroorganismen sind in Form einer konstanten "aktiven immobilisierten Biomassekonzentration" X_1 berücksichtigt. Rechnungen belegen die positiven Auswirkungen der Immobilisierung auf das Reaktorverhalten. Mit dem Modell konnten Meßergebnisse einer kontinuierlichen Fermentation beschrieben werden. Als einzige Größe wurde die aktive immobilisierte Biomassekonzentration angepaßt.

5. Modellierung des Stofftransports im Sinterglas

Berechnungen des Stofftransports im adsorbierten Biomassefilm zeigen, daß Diffusionswiderstände nur beim Sauerstoff berücksichtigt werden müssen. Es ergibt sich unter Fermentationsbedingungen eine sehr geringe aktive (d.h. mit Sauerstoff versorgte) Filmdicke von etwa 30 μm . Dieses Ergebnis und Literaturdaten weisen darauf hin, daß hohe Produktivitäten bei immobilisierten aeroben Mikroorganismen nur mit Trägerkörpern großer Oberfläche erzielt werden können.

Mit einer modellmäßigen Erfassung des gesamten diffusiven Sauerstofftransports im Sinterglas läßt sich die aktive immobilisierte Biomassekonzentration abschätzen. Diese stimmt größenordnungsmäßig mit den Ergebnissen überein, die durch Messungen und das beschriebene Reaktormodell ermittelt wurden. Signifikante Unterschiede bei einigen Versuchen deuten jedoch darauf hin, daß zusätzlich zum diffusiven Sauerstofftransport ein konvektiver Anteil im Sinterglas existiert. Die Poren des Trägermaterials dürfen also nicht zuwachsen, was durch die in dieser Arbeit beschriebene Steuerung des Adsorptionsverhaltens der Zellen verhindert werden kann.

6. Reaktorauswahl

Die Modellierung des Stofftransports ergibt eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit der aktiven immobilisierten Biomassekonzentration vom Durchmesser der (kugelförmigen) Trägerkörper. Ein Wirbelschichtreaktor mit Sinterglasmaterial ϕ 1 - 1.4 mm bringt jedoch keine besseren Ergebnisse als die Festbettumlaufreaktoren mit Kugeln ϕ 3 mm oder Raschigringen ϕ 7.7 mm. Die Hauptursache ist der im Wirbelschichtreaktor unter diesen Bedingungen offenbar typische schlechte Sauerstoffübergang von der Gas- in die Flüssigphase. Der pO_2 konnte nicht auf ausreichende Werte angehoben werden.

Ein Festbettumlaufreaktor mit oberflächenmodifiziertem Sinterglas und günstiger Einstellung des Adsorptionsverhaltens der Corynebakterien wurde über 18 Tage bei einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute von 100 g/l/d und einem Umsatz von 90 % betrieben. Diese Werte liegen über den bisher in der aeroben Aminosäureproduktion erreichten Ergebnissen.

5.2. Vorschläge für weitere Arbeiten

1. Mikrobiologie

Endgültiger Nachweis des mikrobiologisch limitierenden Schrittes der L-Leucinbildung. Ist dies der Transport der α -Ketoisocaproinsäure durch die Zellwand der Corynebakterien? Aufklärung dieser Frage durch Bestimmung der zellinternen Konzentrationen der für die Umsetzung maßgebenden Substanzen. Warum fällt die spez. Produktbildungsrate in Abhängigkeit von der Kontaktzeit mit dem Medium ab? Ist dafür ein von den Zellen gebildeter Inhibitor verantwortlich? Suche nach diesem Inhibitor und nach Möglichkeiten, seine Entstehung zu unterdrücken.

2. Oberflächenmodifizierung des Sinterglases

Erprobung der in dieser Arbeit entwickelten oberflächenmodifizierten Trägerkörper mit anderen Mikroorganismen und in der Zellkulturtechnik. Gibt es eine "ideale Trägeroberfläche", oder erfordert jedes Immobilisierungsproblem eine spezifische Modifizierung? Untersuchung und evtl. Verbesserung der Haltbarkeit der Oberflächenmodifizierungen unter extremen Bedingungen (Mehrmales Verwenden und Regenerieren der Trägerkörper mit verschiedenen Reinigungsmethoden).

3. Oberflächenmodifizierung der Mikroorganismen

Sind die Lipoteichonsäuren tatsächlich für die Änderungen der Hydrophobizität der Corynebakterien verantwortlich? In diesem Fall lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit vermutlich auf alle Gram-positiven Mikroorganismen übertragen. Inwieweit kann die Oberflächenladung der Zellen durch hohe Ionenstärke und mehrwertige Metallionen beeinflusst werden? Weiterentwicklung und Systematisierung des Konzeptes der in-vivo-Adsorptionskontrolle durch die Kulturbedingungen an anderen mikrobiologischen Systemen.

4. Modellierung

Kinetische Untersuchung des Abfalls der spez. Produktbildungsrate in Abhängigkeit von der Kontaktzeit mit dem Medium. Aufnahme dieser Kinetik in das bestehende Reaktormodell.

5. Stofftransport im Sinterglasmaterial

Experimentelle Untersuchung des Sauerstofftransports im Sinterglas in Abhängigkeit von der Bewuchsdichte. Kann das Zuwachsen der Poren durch die Kontrolle der Adhäsionsseigenschaften der Zellen verhindert werden? Ist es möglich, die aktive immobilisierte Biomassekonzentration durch spezielles Trägermaterial, das besser durchströmt werden kann, zu erhöhen? Erweiterung des bestehenden Modells durch den konvektiven Stofftransport. Modellierung des Stofftransports im Sinterglas auch im Bereich der anaeroben Prozesse.

6. Reaktor

Weitere Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten eines Wirbelschichtreaktors bei der aeroben Aminosäurefermentation. Verfahrenstechnische Auslegung eines Wirbelschichtreaktors mit ausreichender Begasungsmöglichkeit. Evtl. Einbau von statischen Mischern. Entwicklung eines Festbettumlaufreaktors mit durchströmbaren porösen Trägerkörpern. Überführung der in dieser Arbeit entwickelten Technik in größere Maßstäbe.

Anhang

A.1. Pufferzusammensetzungen und Programme des Biotronic Aminosäureanalysators

Pufferzusammensetzung für das Hydrolysat-Trennprogramm

(18 Komponenten des Standard-Programms plus Cysteinsäure, Methioninsulfoxyd, Methioninsulfon und Tryptophan)

Gültig für die 3,2 mm Säule mit dem BIOTRONIK-Trennharz BIC 2710 (auch für 4 mm Säulen)

	Puffer A	Puffer B	Puffer C	Puffer D	Puffer E	Regenerier- lösung F	Probenver- dünnungs- puffer
pH-Wert	3,35(3,40)	3,85(3,95)	4,30	5,20	10,60	-	2,20
Natrium-Normalität	0,10 n	0,10 n	0,10 n	0,18 n	0,16 n	0,3 n	0,10 n
Citrat-Molarität	0,10 m	0,10 m	0,08 m	0,06 m	0,03 m	-	0,10 m
tri-Natriumcitrat x2H ₂ O	9,8 g	9,8 g	9,8 g	17,6 g	-	-	9,8 g
Citronensäure x H ₂ O	14,0 g	14,0 g	9,8 g	-	6,9 g	-	14,0 g
Methylcellulose	80 ml	-	-	-	-	-	-
Borsäure	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g	5,0 g	-	-
Salzsäure, 37 % ca.	1 ml	*)	*)	3,0 ml	-	-	>1 ml
Natriumhydroxid	-	*)	*)	-	6,4* g	12,0 g	-
Brij 35 (25% Lösung in H ₂ O)	1,0 ml**	1,0 ml**	1,0 ml**	1,0 ml**	1,0 ml**	-	-
2,2'-Thiodiethanol (25%) oder (100%)	-	-	-	-	-	-	20 ml 5 ml
Endvolumen	1,0 l	1,0 l	1,0 l	1,0 l	1,0 l	1,0 l	1,0 l

*) Das Einstellen des pH-Wertes muß bei den Puffern C und E (eventuell auch bei B) mit konzentrierter NaOH-Lösung erfolgen

**) 0,5 ml bei Verwendung einer frischen 25 % Fertiglösung

BIOTRONIK GR0 / 0784

LC 5000 PROGRAMM - DATENBLATT

P - Nr.: *1 Vorprogramm 29 Minuten*
Trennprogramm :

F - Step	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Step Time	10.5	10.4																		
Sample Inj.																				
Reag. / Int.	X			X																
S. 440+570																				
Aux.																				
Aux.																				
Aux.																				
FUNCTIONS	BUFFER	A		X	X															
		B																		
		C																		
		D																		
		E	X																	
		Reg. F		X																
Column Temp.	T1			X	X															
	T2																			
	T3	X																		
	T4		X																	
	Aux.																			
Recorder																				

Temperatur-Einheit

Gradient =
Säulen- T1 =
Temperatur T2 =
T3 =
T4 =
Coiltemperatur =

s/°C
°C
°C
°C
°C
°C
°C
°C

*siehe
Trenn-
prog.*

Trennsäule

Abmessungen: 3,2 mm x 400 mm
Harztyp: BTC 2710
Füllhöhe: mm

Vorwaschsäule

Abmessungen: 6 mm x 85 mm
Harztyp: BTC F
Füllhöhe: mm

Pumpe

Pufferdurchfluß = Flow = ml/min = ml/h
Reagenzdurchfluß = Flow x 0,55*
(* automatisch vorgegeben in der Pumpe BT 0510)

Puffersystem:	Gesamt-Citrat-Konzentration	Org. Lösemittel	pH
Puffer A n	m		
Puffer B n	m		
Puffer C n	m		
Puffer D n	m		
Puffer E n	m		
Reg.-Lösung F n	—		

LC 5000 PROGRAMM - DATENBLATT

P - Nr.: 2 Hydrolysat - Vollprogramm

Trennprogramm :

F - Step		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Step Time		5	70	9	1	70	6	20	3	2	74					= 80	Minuten					
Functions	Sample Inj.		X																			
	Reag. / Int.	X	X	X	X	X	X	X														
	S. 440+570																					
	Aux.																					
	Aux.																					
	Aux.																					
	BUFFER	A	X	X								X										
		B			X																	
		C				X	X															
		D						X														
		E							X													
		Reg. F							X	X	X											
	Column Temp.	T1	X	X	X	X						X										
		T2					X	X														
		T3							X													
T4									X	X												
		Aux.																				
	Recorder		X	X	X	X	X	X	X													

Temperatur-Einheit

Gradient = 2,5 s/°C
 Säulen- T1 = 48 °C
 Temperatur T2 = 56 °C
 T3 = 64 °C
 T4 = 70 °C
 Coiltemperatur = 125 °C

Trennsäule

Abmessungen: 3,2 mm x 400 mm
 Harztyp: BTC 2710
 Füllhöhe: 210 mm

Vorwaschsäule

Abmessungen: 6 mm x 85 mm
 Harztyp: BTC F
 Füllhöhe: 24 mm

Pumpe

Pufferdurchfluß = Flow = 0,30 ml/min = 18 ml/h
 Reagenzdurchfluß = Flow x 0,55*
 (* automatisch vorgegeben in der Pumpe BT 0510) Sampletime = 60 min.

Puffersystem:	Gesamt-Citrat-Konzentration	Org. Lösemittel	Verbrauch (ml) ^{pro} Analyse	pH
Puffer A 0,1 n	0,1 m	8% Methylecellulose	8,7	3,35
Puffer B 0,1 n	0,1 m		2,7	3,85
Puffer C 0,1 n	0,08 m		3,3	4,35
Puffer D 0,18 n	0,06 m		1,8	5,20
Puffer E 0,16 n	0,03 m		6,0	10,6
Reg.-Lösung F 0,3 n	—		1,5	

Kinhydrin-

10,07

LC 5000 PROGRAMM - DATENBLATT

P - Nr.: **3** *Spülprogramm*

Trennprogramm :

F - Step	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Step Time	25.5	25.5	25.5	25.5																
Sample Inj.																				
Reag. / Int.																				
S. 440+570																				
Aux.																				
Aux.																				
Aux.																				
FUNCTIONS	BUFFER	A	X	X																
		B																		
		C																		
		D																		
		E																		
		Reg. F	X																	
Column Temp.	T1			X	X															
	T2																			
	T3																			
	T4	X	X																	
	Aux.																			
Recorder																				

Temperatur-Einheit

Gradient = s/°C
 Säulen- T1 = °C
 Temperatur T2 = °C
 T3 = °C
 T4 = °C
 Coiltemperatur = °C

*siehe
Trenn-
progr.*

Trennsäule

Abmessungen: 3,2 mm x 400 mm
 Harztyp: BTC 2710
 Füllhöhe: mm

Vorwaschsäule

Abmessungen: 6 mm x 85 mm
 Harztyp: BTC F
 Füllhöhe: mm

Pumpe

Pufferdurchfluß = Flow = ml/min = ml/h
 Reagenzdurchfluß = Flow x 0,55*
 (* automatisch vorgegeben in der Pumpe BT 0510)

Puffersystem:	Gesamt-Citrat-Konzentration	Org. Lösemittel	pH
Puffer A n	m		
Puffer B n	m		
Puffer C n	m		
Puffer D n	m		
Puffer E n	m		
Reg.-Lösung F n			

LC 5000 PROGRAMM - DATENBLATT

P - Nr.: 4 *Urlaubs-Programm*

Trennprogramm :

F - Step		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Step Time		25	35	70																	
Functions	Sample Inj.																				
	Reag. / Int.																				
	S. 440-570																				
	Aux.																				
	Aux.																				
	Aux.																				
	BUFFER	A	X																		
		B																			
		C																			
		D																			
		E																			
		Reg. F	X																		
	Column Temp.	T1		X	X																
		T2		X	X																
		T3																			
		T4	X																		
		Aux.																			
	Recorder																				

Temperatur-Einheit

Gradient =
Säulen- T1 =
Temperatur T2 =
T3 =
T4 =
Coiltemperatur =

s/°C
°C
°C
°C
°C
°C
°C

*siehe
Trenn-
progr.*

Trennsäule

Abmessungen: 3,2 mm x 400 mm
Harztyp: BTC 2710
Füllhöhe: mm

Vorwaschsäule

Abmessungen: 6 mm x 85 mm
Harztyp: BTC F
Füllhöhe: mm

Pumpe

Pufferdurchfluß = Flow = ml/min = ml/h
Reagenzdurchfluß = Flow x 0,55*
(* automatisch vorgegeben in der Pumpe BT 0510)

Puffersystem:	Gesamt-Citrat-Konzentration	Org. Lösemittel	pH
Puffer A n	m		
Puffer B n	m		
Puffer C n	m		
Puffer D n	m		
Puffer E n	m		
Reg.-Lösung F n			

LC 5000 PROGRAMM - DATENBLATT

P - Nr.: 5 (Kurzprogramm)
Trennprogramm: *Hydrolysat: Methionin, Leucin, Isoleu*

r - Step	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Step Time	1	1	3	1	10	6	6	3	2	10	4									
Sample Inj.																				
Reag. / Int.																				
S. 440-570																				
Aux.																				
Aux.																				
Aux.																				
FUNCTIONS	BUFFER	A																		
		B																		
		C																		
		D																		
		E																		
		Reg. F																		
Column Temp.	T1																			
Aux.	T2																			
Recorder	T3																			

Temperatur-Einheit

Gradient = 2,5 s/°C
 T1 = 48 °C
 T2 = 56 °C
 T3 = 64 °C
 T4 = 70 °C
 Coiltemperatur = 125 °C

Trennsäule

Abmessungen: 3,2 mm x 400 mm
 Harztyp: BTC 2710
 Füllhöhe: 210 mm

Vorwaschsäule

Abmessungen: 6 mm x 85 mm
 Harztyp: BTC F
 Füllhöhe: 24 mm

Pumpe

Pufferdurchfluß = Flow = 0,30 ml/min = 18 ml/h
 Reagenzdurchfluß = Flow x 0,55*
 (* automatisch vorgegeben in der Pumpe BT 0510) *Stop time ~ 29 min*

Puffersystem:	Gesamt-Citrat-Konzentration	Org. Lösemittel	ml Verbräut pro Analyse	pH
Puffer A 0,1 n	0,1 m		4,8	3,35
Puffer B 0,1 n	0,1 m		0,9	3,85
Puffer C 0,1 n	0,08 m		3,3	4,30
Puffer D 0,18 n	0,06 m		1,8	5,20
Puffer E 0,16 n	0,03 m		1,8	10,5
Reg.-Lösung F 0,3 n	—		1,5	

Kinly Drin

4,62

A.2. Festbettreaktor für die Vergleichsversuche

Abb. A.1 zeigt eine Konstruktionszeichnung der Reaktoren, die von der Glasbläserei der Kernforschungsanlage Jülich hergestellt wurden. Die Schüttung der Sinterglaskörper (Raschigringe $\varnothing$ 7.7 mm) ruht auf einem von Noppen in der Reaktorwand gehaltenen spiralförmigen Glastragrost. Dieser ist durch ein Polypropylenetz mit einer Maschenweite von 2.5 mm abgedeckt und kann durch einen Silikonring gegen Verrutschen gesichert werden. Oberhalb der Schüttung ist das Reaktorrohr stark aufgeweitet und geht in den Gasraum über. In den Boden des Reaktors ist zentral eine Glasfritte eingeschmolzen, die von einer tiefer gelegenen Sammelrinne umgeben ist. Seitlich befindet sich der Ablaufstutzen. Er wird durch einen Silikonschlauch und Schlauchklemmen verschlossen. Durch diese Anordnung kann der Reaktor, wenn er schräg gestellt wird, vollständig entleert werden. Der Reaktionsraum ist von einem Thermostatisiermantel umgeben, der zum Ausgleich von Wärmespannungen mehrere Wülste besitzt.

A.3. Festbettumlaufreaktor für kontinuierliche Fermentationen

Abb. A.2 zeigt die Konstruktionszeichnung eines Festbettumlaufreaktorgefäßes. Die Sinterglasschüttung ruht auf einem Glastragrost und einem Polypropylenetz. Kommen kugelige Trägerkörper mit einem Durchmesser von 3 mm zum Einsatz, muß die Schüttung auch oben fixiert werden, um ein Aufwirbeln der Schüttung zu verhindern. Das geschieht durch ein Polypropylenetz (Maschenweite 2.5 mm) welches sich über ein V4A-Gestell gegen einen Silikonklemmring in der zentralen Einfüllöffnung abstützt. Der Gasraum enthält weitere Anschlüsse für Schaumsensor, Antischaumzuleitung, Abgas, Produktableitung und für den äußeren Umlauf. Die Schraubstutzen für Produktableitung und Umlauf sind schräg angesetzt. Dadurch werden beide Leitungen nicht durch mittig eintropfendes Medium getroffen und wachsen nicht zu. Unter der Schüttung befindet sich ein Schlauchanschluß, durch den der äußere Flüssigkeitsumlauf wieder in den Reaktor eintritt. Im Boden ist mittig ein Schraubstutzen eingeschmolzen. Mit einer Klemmverschraubung werden hier die herausnehmbaren Frittenhalter befestigt. Diese Konstruktion erleichtert die Reinigung und erlaubt es, Fritten mit verschiedenen Porenweiten und Gesamtdurchmessern einzusetzen. Der Reaktionsraum ist von einem Thermostatisiermantel umgeben.

A.4. Wirbelschichtreaktor für kontinuierliche Fermentationen

Der Reaktor besitzt am Boden einen angeschmolzenen Schraubstutzen, in dem ein Frittenhalter (aus Teflon) montiert werden kann (s. Abb. A.3). In diesen ist die Fritte (Filterplatte D3, Porenweite 16-40 μ m, Schott) eingepreßt. Über dem Bodenzulauf des Reaktors unterhalb des Kopfes des Frittenhalters sind durch Silikonringe zwei Teflonnetze (Maschenweite 2.5 und 0.5 mm) fixiert. Diese dienen als Auflagerost für eine Schüttung aus 2500 V4A-Kugeln $\varnothing$ 1.59 mm (Gebauer GmbH, Fulda), welche genau mit der Oberkante des Frittenhalters abschließen. Die Kugelschüttung dient als Flüssigkeitsverteiler und sorgt für eine gleichmäßige Anströmung der Wirbelschicht. Den oberen Abschluß der Wirbelschicht bilden zwei Teflonnetze (Maschenweite 0.5 und 1 mm). Sie werden durch ein V4A-Gestell, welches sich gegen einen Silikonring in der zentralen Einfüllöffnung abstützt, gehalten.

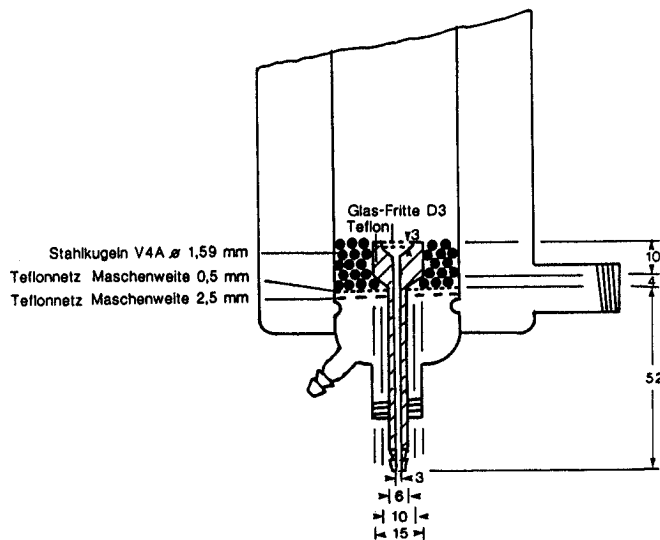


Abb. A.3: Boden des Wirbelschichtreaktors

A.5. Begasungsanlage

Abb. A.4 zeigt eine schematische Darstellung der gesamten Begasungsanlage. Das Signal der pO_2 -Elektrode wird auf den pO_2 -Meßverstärker (Typ 325, Ingold) gegeben. In den Ausgang ist der Plotter und der pO_2 -Regler (Typ Protronic-SK, Hartmann & Braun, Frankfurt) eingeschleift. Letzterer kontrolliert den Massendurchflußregler für Sauerstoff. Diese Regeleinheit ist aus einem elektronischen Steuergerät (Typ 4252), einem thermischen Massendurchflußmesser (Typ 5810 N) und einem elektrischen Stellventil (Typ 5835 N) der Firma Brooks (Veerendaal, Holland) aufgebaut. Das Steuergerät wurde von der Institutswerkstatt für die Möglichkeit der externen Ansteuerung durch den pO_2 -Regler hergerichtet. Der pO_2 -Sollwert wird am pO_2 -Regler eingestellt. Am O_2 -Massendurchflußregler erfolgt die Einstellung des maximalen Sauerstoffstromes bei maximaler "Öffnung" des pO_2 -Reglers. Der zweite, identisch aufgebaute Massendurchflußregler steuert den Gesamtgasstrom. Bei sich (durch die pO_2 -Reglung) änderndem Sauerstoffdurchfluß wird gerade so viel Luft zugemischt, daß der Gesamtstrom immer konstant bleibt. Das hat den Vorteil, daß die Strömungs- und Mischungsverhältnisse im Reaktor immer gleich und unabhängig von Änderungen des k_{La} -Wertes (z.B. bei Antischaumzugabe) oder biologisch bedingten Änderungen des Sauerstoffbedarfs bleiben. Dadurch ist der CO_2 -Austrag aus der Fermentationsflüssigkeit und damit die zutitrierte Laugemenge bzw. die Gesamtdurchflußrate durch den Reaktor konstant.

Die lageempfindlichen thermischen Massendurchflußmesser sind mitsamt den Stellventilen auf einem tarierbaren Metallblock montiert. Für beide Massendurchflußmesser werden mit Hilfe eines Seifenblasendurchflußmesser unter Berücksichtigung des Tagesdruckes Eichkurven erstellt. Die Preßluftversorgungsleitung enthält einen Druckminderer, der auf etwa 2 bar

eingestellt wird. Der Vordruck des Sauerstoffs wird an zwei parallel geschalteten 20 l-Flaschen auf etwa 3 bar reguliert.

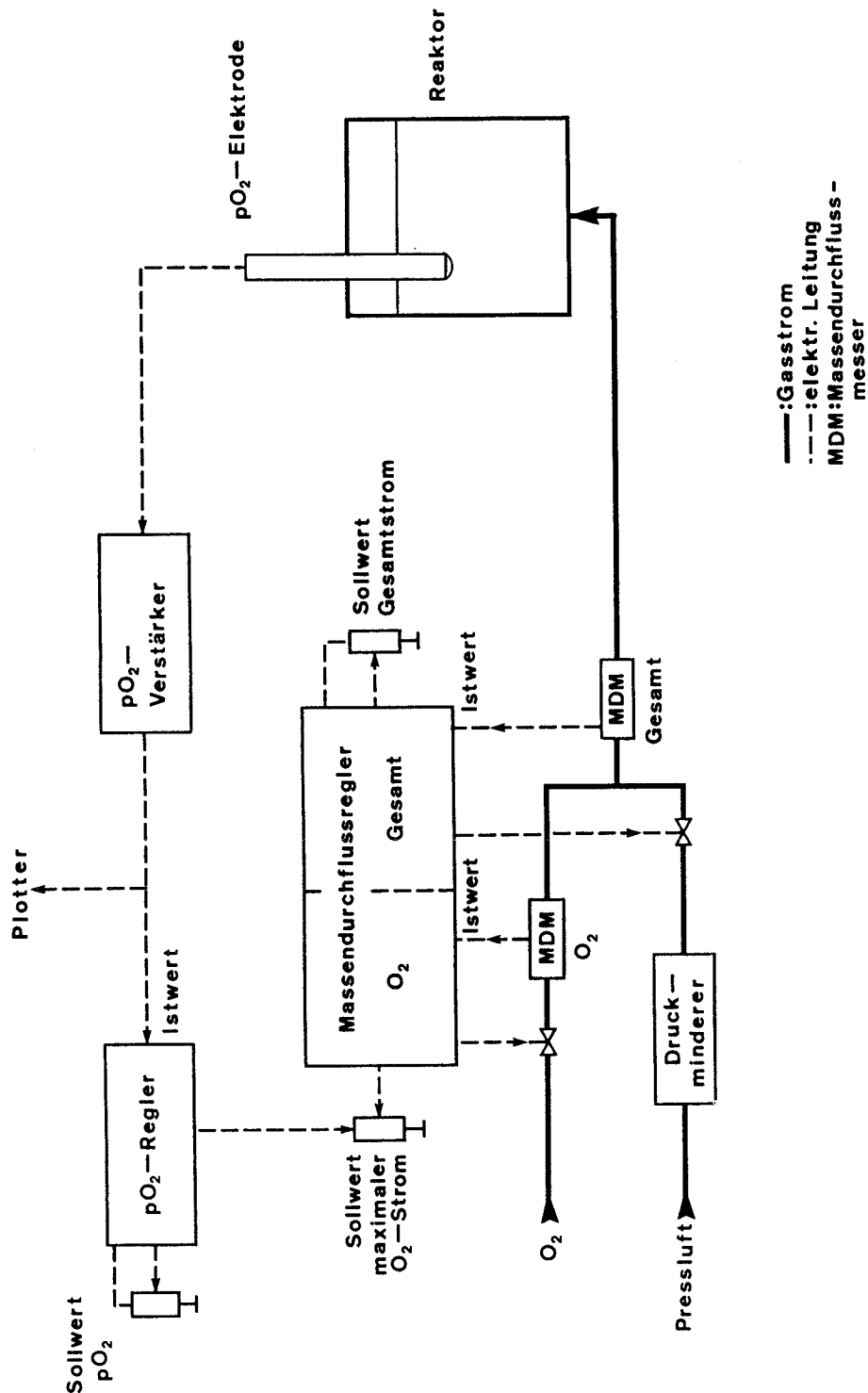


Abb. A.4: Begasungsanlage der kontinuierlichen Festbettumlaufreaktoren

A.6. Bilanzierung des Prozesses

Durch eine geschlossene Bilanzierung des gesamten Fermentationsprozesses läßt sich abschätzen, ob alle maßgebenden Substanzen meßtechnisch erfaßt wurden oder ob womöglich Nebenprodukte noch unbeachtet geblieben sind. Eine Bilanzierung ist vor allem dann sinnvoll, wenn noch grundsätzliche Unklarheiten bezüglich des Stoffwechsels der verwendeten Mikroorganismen bestehen.

Kohlenstoffbilanz

Bei der Kohlenstoff-(C)-Bilanz berechnet man die gesamte Kohlenstoffmenge der Ausgangssubstanzen und vergleicht sie mit der C-Menge der gelösten und gasförmigen (z.B. CO_2) Endprodukte. Der gesamte C-Gehalt der Ausgangsstoffe und der Endprodukte muß gleich sein. Wird ein kontinuierlicher Prozeß im Fließgleichgewicht bilanziert, so gehen in die Berechnung neben den Konzentrationen der Stoffe auch deren Volumenströme ein. Mit einer C-Bilanz kann daher auch die Meßgenauigkeit und Eichung der Geräte kontrolliert werden.

Die Berechnung des durch die Substanz i verursachten Kohlenstoffstroms c_i geschieht nach:

$$c_i = K_i \cdot C_i \cdot v_i \quad [\text{g/h}] \quad (\text{Gl. A1})$$

mit c_i = Kohlenstoffstrom der Substanz i [g/h]
 K_i = Konzentration der Substanz i [mol/l]
 C_i = Kohlenstoffgehalt der Substanz i [g/mol]
 v_i = Gesamtvolumenstrom [l/h]

Man muß beachten, daß der aus dem Reaktor abfließende Volumenstrom um die zur pH-Kontrolle zutitrierte Lauge- bzw. Säuremenge größer ist als der zufließende Volumenstrom. Der C-Gehalt der Mikroorganismen wird entweder gemessen oder anhand von Literaturdaten abgeschätzt.

Bei aeroben Prozessen entweichen große Mengen CO_2 , die mit einer Gasanalytik erfaßt werden müssen. Die Berechnung des Kohlenstoffstroms $c_{\text{CO}_2, \text{g}}$ erfolgt entsprechend (Gl. A1) nach:

$$c_{\text{CO}_2, \text{g}} = y_{\text{CO}_2, \text{a}} \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot v_{\text{a}} / V_{\text{mo}} \quad [\text{g/l}] \quad (\text{Gl. A2})$$

mit $c_{\text{CO}_2, \text{g}}$ = Kohlenstoffstrom durch gasförmiges CO_2 [g/h]
 $y_{\text{CO}_2, \text{a}}$ = CO_2 -Anteil im Abgas [l/l]
 C_{CO_2} = Kohlenstoffgehalt von CO_2 : 12 g/mol
 v_{a} = Abgasvolumenstrom [Nl/h]
 V_{mo} = Molares Normvolumen: 22.4 Nl/mol

Ein gewisser Anteil CO_2 verläßt den Reaktor mit der Produktlösung in gelöster Form oder als Bicarbonat. Um diesen Anteil abzuschätzen, benötigt man die CO_2 -Löslichkeit in der Fermentationsflüssigkeit und Daten über das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gleichgewicht in Abhängigkeit vom pH. Unter der Annahme, daß Gas- und Flüssigphase sich im Gleichgewicht befinden, gilt für die gelöste CO_2 -Konzentration $K_{\text{CO}_2,1}$ bzw. Bicarbonatkonzentration $K_{\text{HCO}_3^-}$:

$$K_{\text{CO}_2,1} = y_{\text{CO}_2,g} \cdot H_{\text{CO}_2} \cdot P_1 \quad [\text{mol/l}] \quad (\text{Gl. A3})$$

$$K_{\text{HCO}_3^-} = K_{\text{CO}_2,1} \cdot 10^{(\text{pH} - \text{pKs})} \quad [\text{mol/l}] \quad (\text{Gl. A4})$$

mit $K_{\text{CO}_2,1}$ = Konzentration des gelösten CO_2 [mol/l]
 H_{CO_2} = Henry-Konstante von CO_2 in Wasser bei 30°C : $29.28 \text{ mol/m}^3/\text{bar}$ (Sontheimer et al., 1980)
 P_1 = Fermenterinnendruck [bar]
 $K_{\text{HCO}_3^-}$ = Bicarbonatkonzentration [mol/l]
 pKs = Säurekonstante des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gleichgewichts in Wasser bei 30°C : 6.343 (Sontheimer et al., 1980)

Der Einfluß in der Fermentationsflüssigkeit gelöster Bestandteile (Ionenstärke) auf H_{CO_2} und pKs sei hier vernachlässigt. Der gesamte C-Strom in Form von gelöstem CO_2 und Bicarbonat $c_{\text{CO}_2,1}$ ergibt sich zu:

$$c_{\text{CO}_2,1} = (K_{\text{CO}_2,1} + K_{\text{HCO}_3^-}) \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot V_F \quad [\text{g/h}] \quad (\text{Gl. A5})$$

mit $c_{\text{CO}_2,1}$ = Kohlenstoffstrom durch gelöstes CO_2 und Bicarbonat [g/h]
 V_F = Produktflüssigkeitsstrom [l/h]

Redoxbilanz

Bei der biochemischen Umsetzung im Fermenter werden einige Substanzen oxidiert, sie geben Elektronen ab, während andere reduziert werden und Elektronen aufnehmen. Der Redoxzustand des gesamten Fermenterinhalt, d.h. die Gesamtzahl der verfügbaren Elektronen muß jedoch konstant bleiben.

Die Bezugsgrundlage für die Definition des Reduktionsgrades der einzelnen Substanzen ist willkürlich und kann frei gewählt werden (Gottschalk, 1986). Man muß allerdings beachten, daß abhängig von dieser Festlegung jeweils andere Substanzen den Reduktionsgrad 0 erhalten und damit in der Bilanzierung unberücksichtigt bleiben. Es wird hier die Konvention von Schügerl (1985) benutzt. Demnach sind die bei biochemischen Umwandlungen zur Verfügung stehenden Elektronen der betrachteten Elemente:

$$e_{\text{C}} = 4, \quad e_{\text{H}} = 1, \quad e_{\text{O}} = -2, \quad e_{\text{N}} = -3 \quad [\text{mol/atom}]$$

Der Reduktionsgrad einiger Substanzen berechnet sich dann z.B. zu:

$$e_{\text{H}_2\text{O}} = 0, \quad e_{\text{CO}_2} = 0, \quad e_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = 24 \quad \text{usw.} \quad [\text{mol/mol}]$$

A.7. Nebeneffekte bei Phosphor-verarmten Zellen

Bei Phosphor-verarmten Corynebakterien sind folgende drei Nebeneffekte zu verzeichnen:

- 1) Im Medium werden neben Leucin stets erhöhte Mengen an Begleitaminosäuren (z.B. Alanin, Valin) gefunden, was offensichtlich auf veränderte Zellwandeigenschaften zurückzuführen ist (s. Kap. 4.3.).
- 2) Abb. 4.2c (s. S. 67) zeigt einen deutlichen Abfall der Glucosekonzentration mit einem korrespondierenden Anstieg der Lactatkonzentration im Medium in Abhängigkeit von der anfänglichen Phosphatkonzentration. Auswirkungen auf Wachstum, Leucinbildung und Ausbeutekoeffizient sind oberhalb einer anfänglichen Phosphatkonzentration von 1.5 mM nicht zu verzeichnen. Generell wurden bei Schüttelkolbenversuchen in Medienansätzen mit niedriger Phosphatkonzentration weit geringere Lactatanhäufungen gefunden als in Phosphat-reichen Ansätzen. Die Phosphor-Verarmung der Zellen verlangsamt offensichtlich die Aufnahme der Glucose und verhindert, daß diese bei O₂-Mangel zu Lactat umgewandelt und wieder ausgeschieden wird.
- 3) Wird eine kontinuierliche Kultur Phosphor-gesättigter Zellen zusätzlich mit Phosphat versetzt, so sind keine Änderungen der Stoffwechselaktivitäten zu verzeichnen. Standen die Mikroorganismen jedoch vor der Zugabe unter Phosphatmangel, so kommt es zu einem augenblicklichen Rückgang der Sauerstoffaufnahme und Wachstumsrate. Eine plötzliche Phosphatzugabe wirkt offensichtlich toxisch auf Phosphor-verarmte Zellen. Sie erholen sich allerdings nach einiger Zeit wieder. Der Grund für dieses Verhalten ist nicht bekannt.

A.8. Berechnung von $Y_{L/s}$ für ruhende Zellen

In Tabelle 4.4 (s. S. 68) ist ein theoretisch berechneter Wert eingetragen. Er wurde unter der Annahme gewonnen, daß der Glucoseverbrauch der Zellen für das Wachstum (Glu_{Zell}) einerseits und für die Leucinbildung (Glu_{Leu}) andererseits unabhängig voneinander sind und sich zum Gesamtverbrauch (Glu_{Ges}) addieren:

$$Glu_{Ges} = Glu_{Zell} + Glu_{Leu} \quad [g] \quad (Gl. A6)$$

Die auf den Glucose-Gesamtverbrauch bezogene Zellmasse (TS) beträgt $Y_{x/s}$ (mit Leucinbildung) = $Y_{x/s(m)}$. Der ausschließlich für die Bildung der Zellmasse (TS) benötigte Anteil läßt sich aus $Y_{x/s}$ (ohne Leucinbildung) = $Y_{x/s(o)}$ berechnen:

$$Y_{x/s(m)} = TS/Glu_{Ges} \quad [g/g] \quad (Gl. A7)$$

$$Y_{x/s(o)} = TS/Glu_{Zell} \quad [g/g] \quad (Gl. A8)$$

Durch Umformen und Einsetzen von (Gl. A7) und (Gl. A8) in (Gl. A6) folgt:

$$Glu_{Leu} = Glu_{Ges} (1 - Y_{x/s(m)}/Y_{x/s(o)}) \quad [g] \quad (Gl. A9)$$

Die gebildete Leucinmenge (Leu) ist gegeben durch:

- 1) den molaren Ausbeutekoeffizienten $Y_{L/S}'$ (wachsende Zellen) = $Y_{L/S}'(w)$, der auf die gesamt verbrauchte Glucosemenge Gl_{Ges} bezogenen ist,
- 2) den molaren Ausbeutekoeffizient $Y_{L/S}'$ (ruhende Zellen) = $Y_{L/S}'(r)$, der auf die ausschließlich für die Leucinbildung verbrauchte Glucosemenge Gl_{Leu} bezogenen ist:

$$Leu = Y_{L/S}'(w) \cdot Gl_{Ges}/M_{Glu} = Y_{L/S}'(o) \cdot Gl_{Leu}/M_{Glu} \quad [mol] \quad (Gl. A10)$$

mit M_{Glu} = Molekulargewicht von Glucose [g/mol]

Es folgt aus (Gl. A9) und (Gl. A10):

$$Y_{L/S}'(r) = Y_{L/S}'(w)/(1 - Y_{X/S}(m)/Y_{X/S}(o)) \quad [mol/mol] \quad (Gl. A11)$$

Werden die in Tabelle 4.5 (s. S. 69) zusammengefaßten Werte in (Gl. A11) eingesetzt, so ergibt sich schließlich der in Tabelle 4.4 eingetragene Ausbeutekoeffizient von $Y_{L/S}'(r)$:

$$Y_{L/S}'(r) = 0.4/(1 - 0.27/0.38) = 1.38 \text{ mol/mol}$$

A.9. Auswahl der pH-Puffer für die Batch-Versuche

Der ursprünglich in den Schüttelkolbenmedien verwendete Kalk mußte durch einen löslichen pH-Puffer ersetzt werden. Dieser sollte möglichst inert in Bezug auf Chemikalien und die Mikroorganismen sein und keine Komplexe bilden. Als besonders geeignet werden die von Good et al. (1966) und Ferguson et al. (1980) beschriebenen meist zwitterionischen Puffer angesehen.

Medienzusätze	Vollmedium ¹		Medium B ²	
	Menge [mM]	Wachstum(OD ₆₀₀)	Menge [mM]	Wachstum(OD ₆₀₀)
Keine	–	38.9	–	–
Kalk-Puffer	–	–	200	38.8
MOPS-Puffer	100	27.1	200	33.2
MOPSO-Puffer	100	26.8	200	30.5
PIPES-Puffer	100	28.7	200	24.4
ACES-Puffer	100	30.0	200	34.5
PO ₄ -Puffer	100	27.6	200	13.8
NaCl	200	29.6	–	–

Tabelle A1: Wachstum auf mit verschiedenen pH-Puffern versetzten Medien

¹: Schüttelkolben mit insges. 100 ml Vollmedium (s. Tab. 3.1),
Zusätze wie angegeben, Inkubationszeit 16 h

²: Inges. 40 ml Medium B (s. Tab. 3.2), Zusätze wie angegeben,
Inkubationszeit 25.5 h

In Tabelle A.1 sind Versuche zur Auswahl eines für wachsende Corynebakterien geeigneten Puffers für den pH-Bereich um 7 zusammengefaßt. Sowohl beim Vollmedium als auch beim Mineralmedium wird mit löslichen pH-Puffern ein geringeres Wachstum erzielt als mit den ursprünglichen Medien. Eine Zugabe von NaCl hat die gleiche Auswirkung. Der Rückgang des Wachstums ist offensichtlich auf die Anhebung des osmotischen Druckes durch die zusätzlich gelösten Substanzen zurückzuführen (s. Kap. 4.1.2.3.). Bei 200 mM Phosphat ist allerdings ein spez. Hemmungsmechanismus zu vermuten. Aus Kostengründen wurde MOPS-Puffer für die weiteren Versuche ausgewählt.

Da von Gröger (1986) für ruhende Zellen ein pH-Optimum um 8 angegeben worden war, wurde nach einem alternativen Puffer für TRIS gesucht. TRIS ist ein primäres aliphatisches Amin und besitzt eine gewisse Reaktivität. Es ist darüberhinaus in organischen Phasen gut löslich und kann daher Zellmembranen von Mikroorganismen durchdringen. Vom Einsatz von TRIS in mikrobiellen Ansätzen wird abgeraten, da mehrere Nebenwirkungen bekannt sind (Good et al., 1966; Good und Izawa, 1972). TRIS komplexiert außerdem Kalium (Bridson und Brecker, 1970).

In mehreren Versuchen wurden HEPES-, HEPPSO- und TRIS-Puffer bei verschiedenen Kulturbedingungen verglichen. Die mit HEPES und HEPPSO angesetzten Kolben wiesen normales Wachstum auf. Die Zellen in den mit TRIS angesetzten Kolben wuchsen etwa die ersten 15 h vergleichsweise gut, begannen dann aber zu lysieren, obwohl das Medium noch nicht erschöpft war. Dieses Verhalten wurde mehrfach reproduziert. Es ist anzunehmen, daß der TRIS-Puffer nicht bekannte physiologische Nebenwirkungen auf die Corynebakterien ausübt. Kurzzeitexperimente, die mit TRIS-Puffer durchgeführt werden, sind wahrscheinlich nicht repräsentativ für normale Kulturbedingungen. Für die weiteren Untersuchungen wurde HEPES-Puffer ausgewählt, welcher von Good und Izawa (1972) empfohlen wird.

A.10. Rechnerprogramm Reaktormodell

In Abb. A.5 ist der Ablaufplan des Programms aus Kap. 4.4. dargestellt. Es berechnet die frei suspendierte Biomassekonzentration X , die Leucin- Le , Glucose- S und Ketosäurekonzentration K in Abhängigkeit von der variablen Durchflußrate D und der vorgegebenen aktiven immobilisierten Biomassekonzentration X_1 . Da sich das Gleichungssystem (Gl. 4.3 - 4.8) nicht nach einer der gesuchten Größen auflösen läßt, wird folgende Iterationsmethode verwendet:

- 1) Die Eingabedatei D.DAT enthält die Werte der variablen Größe D in geordneter Reihenfolge. Die Datei wird so erstellt, daß die hohen D -Werte am Anfang stehen und die kleinen Werte am Ende. Das Programm beginnt die Berechnung der gesuchten Größen also bei hohen Durchflußraten D .
- 2) Bei hohen Durchflußraten D sind hohe Ketosäurekonzentrationen K zu erwarten (s.a. Abb. 4.34; S. 130). Die spez. Produktbildungsrate p ist nach (Gl. 4.8) bei großem K nur wenig verschieden von $p_{\max}$.
- 3) Vorgabe einer spez. Produktbildungsrate $p_e = p_{\max}$ als Startwert (s. Abb. A.5)
- 4) Lösung des Gleichungssystems (Gl. 4.3 - 4.7) mit diesem p_e -Wert
- 5) Berechnung von p_n aus dem aktuellen K nach (Gl. 4.8)
- 6) Abfrage: $p_n - p_e < \text{Fehlerabweichung}$?
- 7) Wenn nein: Korrektur der spez. Produktbildungsrate ($p_e = p_n$)
Wiederholung des Iterationscycles
- 8) Wenn ja: Abspeichern der berechneten Werte für D , X , Le , S und K . Einlesen eines neuen D -Wertes.
- 9) Übernahme des zuletzt gültigen p_n -Wertes als Startwert für die neue Rechnung (Die spez. Produktbildungsrate p wird mit abnehmender Durchflußrate D infolge kleiner werdender Ketosäurekonzentration K stetig kleiner; s.a. Abb. 4.34). Auf diese Weise steht immer ein günstiger Startwert zur Verfügung und der Iterationsaufwand bleibt gering.
- 10) Abbruch des Programmes, wenn alle D -Werte bearbeitet wurden

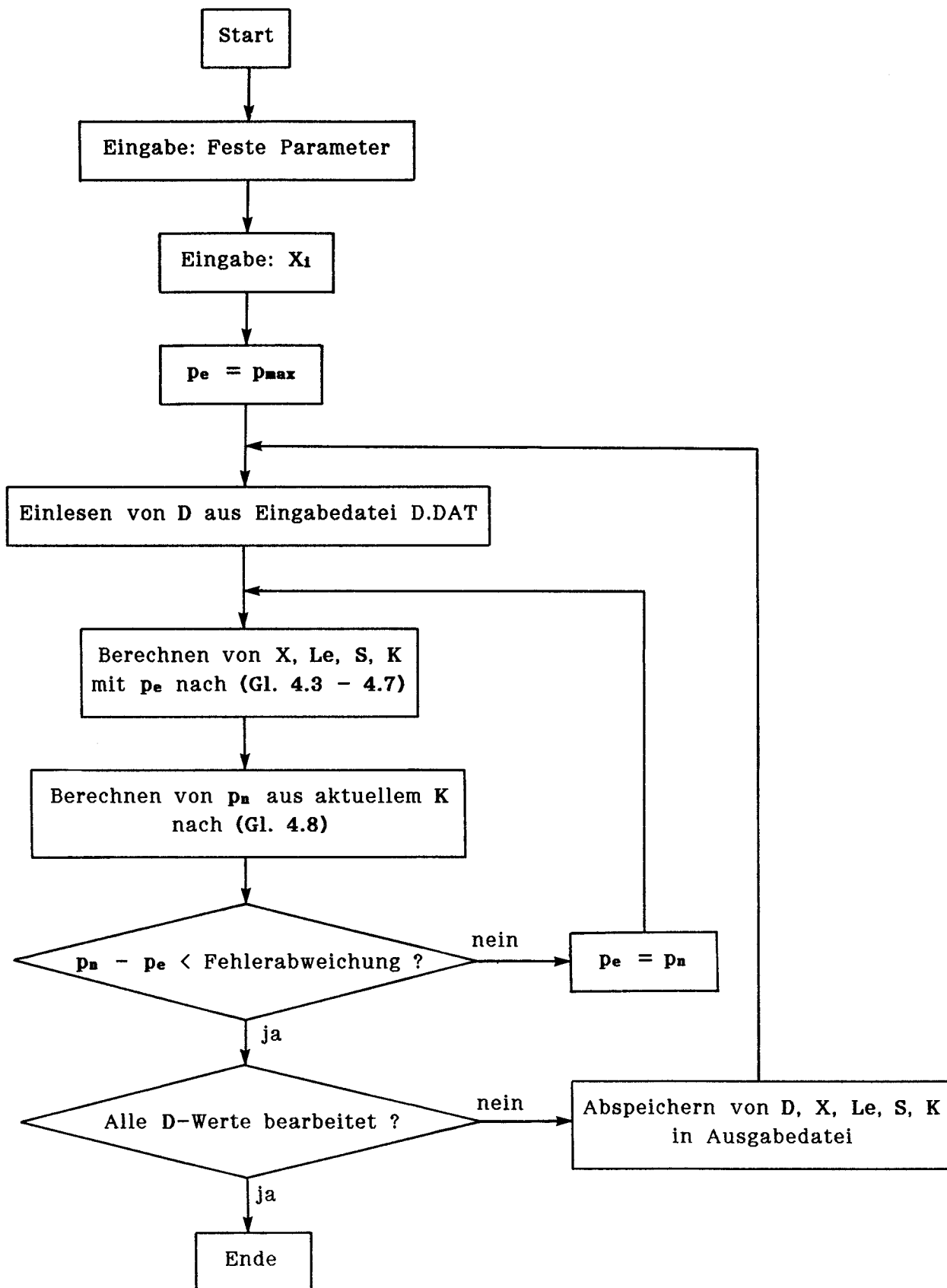


Abb. A.5: Programmablaufplan Reaktormodell

p_e : Iterationsgröße spez. Produktbildungsrate, Startwert

p_n : Iterationsgröße spez. Produktbildungsrate, aktueller Wert

```

C          modell5                      20.2.88
C-----
      byte infile(40),outfil(40)
      real Ks,K1,K2,K3,K4,K5,K10,K11,K20
      real C1,C2,C3,C4,C5,C6,C7,C8,C10,C11,w1
      real s,mf,dmax,de,d1,d2,dn,umax,Ko,Po,Ke,Kk
      data infile/'D','.','d','a','t',34*' ','0/
C-----
      Y=C.38                               Zuweisungen
      Yp=1.3*131.18/198
C-----
      write(5,41)
41      format('$Monod-Konstante(Glucose)  Ks (g/l)      : ')
      read(5,*)Ks
C-----
      write(5,44)
44      format('$Monod-Konstante(Ketos.)  Kk (g/l)      : ')
      read(5,*)Kk
C-----
      write(5,43)
43      format('$Produktivitaetsrate  dmax (g/gTS/h)    : ')
      read(5,*)dmax
C-----
1000    write(5,40)
40      format('$maximale Wachstumsrate  umax (1/h)     : ')
      read(5,*)umax
C-----
      write(5,42)
42      format('$Substratkonzentration  So (g/l)        : ')
      read(5,*)So
C-----
      write(5,45)
45      format('$Keticsaeurekonzentration Ko (g/l)      : ')
      read(5,*)Ko
      Po=Ko*131.18/153.13
C-----
      write(5,46)
46      format('$Parameter xf (gTS)          : ')
      read(5,*)mf
C-----
      write(5,20)
20      format('$Name der Ausgabe-Datei      : ')
      call assign(1,infile)
      read(5,30) outfil
30      format(4Ca1)
      outfil(40)=0
      call assign (2,outfil)

```

```

C2=Y*umax
C1=Yp*umax
C3=2.*Y*mf*umax
C5=Yp*umax*mf-Sc*Y*Yp*umax
C4=Y*Yp*(So+Ks)
C6=Y*mf
C7=Y*Yp*So*umax*mf
C8=Y*mf*mf*umax
C10=(Kk+Ko)/1.167
C11=dmax*Ko/1.167
C20=umax*mf*Y*(Po-Yp*So)
C21=umax*(Y*Po+mf*Yp-Y*Yp*So)
C22=Y*Yp*(So+Ks)-Y*Po
C-----
write(2,*)' umax=',umax,' Ks=',Ks,' So=',So
write(2,*)' cmax=',cmax,' mf=',mf,' Ko=',Ko,' Kk=',Kk
write(2,*)'      D (1/h)      X (g/l)      S (g/l)
@      K (g/l)      P (g/l)      RZA (g/l/d)'
write(2,*)
C-----
de=dmax
do 10 i=1,10000
  read(1,*,end=2000) D
  if ( umax .eq. D ) then
    write(5,*) ' $umax=D'
    goto 10
  end if
  K1=D*C1-D*D*Yp
  K2=C2-D*Y
  K3=D*D*C4+D*C5
  K4=C3-D*C6
  K5=-D*C7
  Z=0
C-----
88      W1=K1+de*K2
      if (abs(W1) .lt. 1E-30) then
        write(5,*) ' W1=0',W1
        goto 10
      end if
      p=(K3+de*K4)/W1
      q=(K5+de*C8)/W1
      wurzel=p*p/4.-q
      if (wurzel .lt. 0.) then
        write(5,*)' wurzel negativ; ce=',ce
        goto 10
      end if
      pw=sqrt(wurzel)
      x1=-p/2.+pw
      x2=-p/2.-pw
      if (W1 .lt. 0.) then
        x=x2
      else
        x=x1
      end if
      if (x .lt. 0.) x=0.

```

```

K10=(dmax+C10*D/(x+mf)
K11=C11*D/(x+mf)
wurzel=K10*K10/4.-K11
if (wurzel .lt. 0.) then
    write(5,*)' Wurzel de negativ'
    goto 10
end if
pw=sqrt(wurzel)
d1=(K10/2.+pw)
d2=(K10/2.-pw)
if (abs(de-d1) .lt. abs(de-d2)) then
    dn=d1
else
    dn=d2
end if
if (dn .gt. de) then
    write(5,*)' de wird groesser; D=',D,' dn=',dn,' de=',de
end if
if (abs(de-dn) .gt. (de*0.005)) then
    Z=Z+1
    if (Z .eq. 20) then
        write(5,*)' mf zu klein'
        goto 10
    end if
    de=dn
    goto 88
end if
de=dn

```

C-----

```

pr=(x+mf)*oe/D
if (pr .lt. Po) goto 100

```

C-----

```

K20=Yp*(umax-D)
if (abs(K20) .lt. 1E-30) then
    write(5,*)' K20 =',K20
    goto 10
end if
p=(C21+D*C22)/K20
q=C20/K20
wurzel=p*p/4.-q
if (wurzel .lt. 0.) then
    write(5,*)' Wurzel negativ'
    goto 10
end if
pw=sqrt(wurzel)
x1=-p/2.+pw
x2=-p/2.-pw
if (K20 .lt. 0.) then
    x=x2
else
    x=x1
end if
if (x .lt. 0.) x=0.
s=So-x/Y-Po/Yp
pr = Po
goto 101

```

```

100      s=So-x/Y-(x+mf)*ce/(D*Yp)
101      if (s .lt. 0.) s=C.
          pd=pr*D*24
          Ke=Ko-pr*153.13/131.18
          write(2,111) d,x,s,Ke,pr,pd
111      format(1x,6(2x,1PE10.3))
C-----
10      continue
2000    write(5,50)
50      format(/,' Naechster Parameter!')
        CLOSE(UNIT=1)
        CLOSE(UNIT=2)
        goto 1000
        end

```

A.11. Ableitung Diffusion eines Stoffes durch einen Biomassefilm

Aus einer Massenbilanz folgt für die zeitliche Änderung der Stoffdichte in einem dünnen Scheibchen (Dicke Δz_B) eines Biomassefilms (s. Abb. A.6):

$$\frac{dA}{dt} = A(z_B) - A(z_B + \Delta z_B) - A^* \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A12})$$

mit A = Stoffdichte in einer Biomassefilmscheibe der Dicke z_B [mmol/cm²]
 $A(z_B)$ = Stoffflußdichte an der Stelle z_B [mmol/cm²/sec]
 $A(z_B + \Delta z_B)$ = Stoffflußdichte an der Stelle $z_B + \Delta z_B$ [mmol/cm²/sec]
 A^* = Stoffverbrauch durch die Mikroorganismen [mmol/cm²/sec]
 z_B = Längenkoordinate im Biomassefilm [mm]

Für den stationären Fall gilt:

$$A(z_B) - A(z_B + \Delta z_B) - A^* = 0 \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A13})$$

Beim Übergang zu infinitesimal kleinen Differenzen Δz_B folgt mit:

$$-\frac{dA}{dz_B} \cdot \Delta z_B = A(z_B) - A(z_B + \Delta z_B)$$

$$\frac{dA}{dz_B} \cdot \Delta z_B + A^* = 0 \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A14})$$

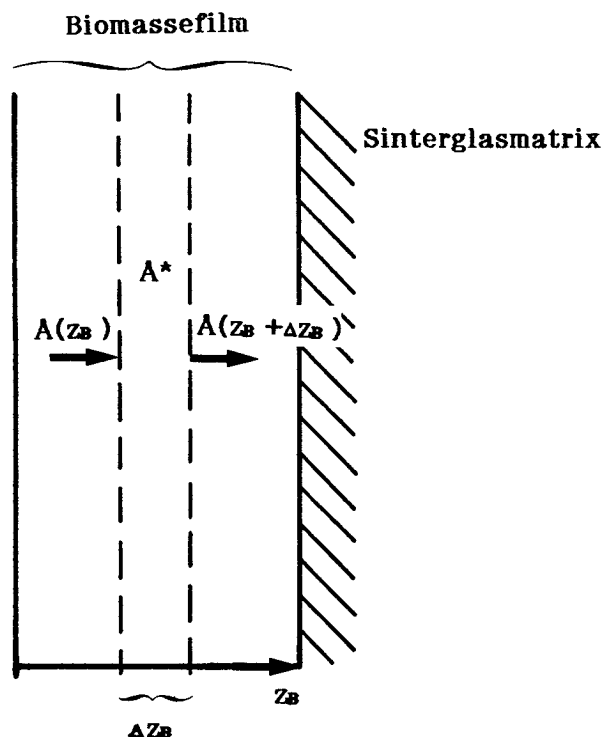


Abb. A.6: Ableitung Diffusion eines Stoffes durch einen Biomassefilm

Die Stoffflußdichte A läßt sich aus den örtlichen Konzentrationsgradienten nach dem 1. Fick'schen Gesetz berechnen:

$$A = - D_e \cdot \frac{dC}{dz_B} \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A15})$$

mit D_e = Effektiver Diffusionskoeffizient im Biomassefilm $[\text{cm}^2/\text{sec}]$

C = Konzentration des diffundierenden Stoffes $[\text{mmol/l}]$

Für den Stoffverbrauch durch die Mikroorganismen in der Biomassefilmscheibe gilt:

$$A^* = v_R \cdot \delta_B \cdot \Delta Z_B \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A16})$$

mit v_R = Spezifische Verbrauchsrate der Mikroorganismen $[\text{mmol/gTS/h}]$

δ_B = Zelldichte im Biomassefilm $[\text{gTS/cm}^3]$

Aus (Gl. 14) bis (Gl. 16) folgt:

$$\frac{d}{dz_B} \left(- D_e \cdot \frac{dC}{dz_B} \right) \cdot \Delta Z_B + v_R \cdot \delta_B \cdot \Delta Z_B = 0 \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A17})$$

$$\frac{d^2C}{dz_B^2} = \frac{v_R \cdot \delta_B}{D_e} \quad [\text{mmol/cm}^2/\text{l}] \quad (\text{Gl. A18})$$

A.12. Rechnerprogramm Diffusion von Ketosäure im Biomassefilm

FILE: DIFF FORTRAN A1 KFA ZAM

```

      IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
      REAL*8 ZETA(2),TOL(2),X(101),U(2,101)
      REAL*8 ALPHA,D,KM,CO,L,FAK,ETA,P,P0
      INTEGER M(1),NLIN,MSTAR,XDIM,IER
      CHARACTER*34 F0
      EXTERNAL KOLSYS,F2,G2
      COMMON KM,L,FAK,CO
C
C      KONSTANTEN-EINGABE
      WRITE(5,*) ' EINGABE VON ALPHA,D,KM,CO,L: '
      READ(5,*) ALPHA,D,KM,CO,L
      FAK=ALPHA/D
C
C      DEFINE NO. OF DIFFERENTIAL EQUATIONS
      N=1
C
C      ORDERS
      M(1)=2
C
C      INTERVAL ENDS
      A=0.00
      B=L
C
C      LOCATIONS OF SIDE CONDITIONS
      ZETA(1)=A
      ZETA(2)=B
C
C      NONLINEAR PROBLEM
      NLIN=1
C
C      SOLUTION REQUESTED AT
      XDIM=101
C
C      POINTS
      DO 210 I=1,XDIM
210  X(I)=A+DFLOAT(I-1)*(B-A)/DFLOAT(XDIM-1)
C
C      MSTAR=M(1)+...=M(N)
      MSTAR=2
C
C      DO 225 I=1,MSTAR
225  TOL(I)=1.0D-14
C
C      CALL KOLSYS(N,M,A,B,ZETA,NLIN,MSTAR,TOL,XDIM,X,U,F2,G2,IER)
C
C      OUTPUT OF RESULTS
C
      WRITE(6,*)
      WRITE(6,*) ' ALPHA= ',ALPHA
      WRITE(6,*) ' D    = ',D
      WRITE(6,*) ' KM   = ',KM
      WRITE(6,*) ' CO   = ',CO
      WRITE(6,*) ' L    = ',L
      WRITE(6,*)

```

```

WRITE(6,*)
WRITE(6,*) * I X(1) Z
C
F0='(2X,I3,2X,D11.4,3X,3D15.7)*
C
C MITTELWERT BERECHNEN VON  $P=C/(C+KM)$  UND AUSDRUCKEN
ETA=0.
P0=U(1,XDIM)/(U(1,XDIM)+KM)
DO 250 I=1,XDIM
P=U(1,I)/(U(1,I)+KM)
ETA=ETA+P
250 WRITE(6,F0)I,X(1), U(1,I),P,P/P0
ETA=ETA/(XDIM*P0)
C
WRITE(5,*)
WRITE(5,*) * ERROR PARAMETER: *,IER
WRITE(6,*)
WRITE(6,*)
WRITE(6,*) *MITTELWERT VON  $P=C/(C+KM)$ : *,ETA
END

SUBROUTINE F2(X,Z,F)
IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
REAL*8 Z(2),F(1),FAK,KM,CO,L
COMMON KM,L,FAK,CO
F(1)=FAK*Z(1)/(KM+Z(1))
RETURN
END

SUBROUTINE G2(I,Z,G)
IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
REAL*8 Z(2),FAK,KM,CO,L
COMMON KM,L,FAK,CO
GOTO(1,2),I
1 G=Z(2)
RETURN
2 G=Z(1)-CO
RETURN
END

```

2.9 KOLSYS

NAME	- KOLSYS
PURPOSE	- NUMERICAL SOLUTION OF AN EXPLICIT SYSTEM OF MIXED ORDER ORDINARY DIFFERENTIAL EQUATIONS WITH BOUNDARY CONDITIONS, USING A COLLOCATION METHOD. THE BOUNDARY CONDITIONS HAVE TO BE SEPARATED (E.G., PERIODIC BOUNDARY CONDITIONS ARE NOT ALLOWED). SOME (OR ALL) BOUNDARY CONDITIONS MAY RELATE TO POINTS IN THE INTERIOR OF THE INTERVAL OF INTEGRATION.
COMPILER	- VS FORTRAN / CRAY FORTRAN
PRECISION	- IBM DOUBLE / CRAY SINGLE
USAGE	- CALL KOLSYS (N, M, A, B, ZETA, NLIN, MSTAR, TOL, XDIM, X, Z, FSUB, GSUB, IER)
ARGUMENTS	N - NUMBER OF DIFFERENTIAL EQUATIONS. (INPUT) N <= 20 IS REQUIRED. M - INTEGER ARRAY OF LENGTH N. (INPUT) M(J) IS THE ORDER OF THE J-TH DIFFERENTIAL EQUATION. THE ORDERS M(J) MUST SATISFY M(1) <= M(2) <= ... <= M(N) <= 4 A, B - END POINTS OF THE INTERVAL. (INPUT) ZETA - ARRAY OF LENGTH MSTAR. (INPUT) J-TH SIDE CONDITION POINT (BOUNDARY POINT). ZETA(J) MUST SATISFY FOR J=1,...,MSTAR-1 <u>A <= ZETA(J) <= ZETA(J+1) <= B.</u> NLIN - NLIN = 0 IF THE PROBLEM IS LINEAR (INPUT) = 1 IF THE PROBLEM IS NONLINEAR MSTAR - MSTAR = M(1) + ... + M(N) <= 40 (INPUT) TOL - ARRAY OF LENGTH MSTAR. (INPUT) TOL(I) IS THE I-TH ERROR TOLERANCE OF THE I-TH COMPONENT OF A FIXED COLUMN FROM THE MATRIX Z XDIM - INTEGER VARIABLE. LENGTH OF ARRAY X. (INPUT) X - ARRAY OF LENGTH XDIM CONTAINING THE (INPUT) ABSCISSAES WHICH CORRESPOND TO THE APPROXIMATE SOLUTION STORED IN ARRAY Z. Z - ARRAY OF DIMENSION MSTAR BY XDIM. (OUTPUT) THE J-TH COLUMN CONTAINS THE APPROXIMATE SOLUTION AT X(J), 1 <= J <= XDIM.

- FSUB** - USER PROVIDED SUBROUTINE FOR (INPUT)
EVALUATING THE RIGHT HAND SIDE OF THE MIXED
ORDER SYSTEM.
THE SUBROUTINE MUST HAVE THE FORM
SUBROUTINE FSUB (X , ZZ, F)
...
FOR GIVEN ARGUMENTS X IN (A, B) AND A
VECTOR ZZ, FSUB RETURNS A VECTOR F.
FSUB MUST APPEAR IN AN EXTERNAL STATEMENT
OF THE CALLING PROGRAM.
- GSUB** - USER PROVIDED SUBROUTINE FOR (INPUT)
EVALUATING THE BOUNDARY CONDITIONS.
THE SUBROUTINE MUST HAVE THE FORM
SUBROUTINE GSUB (I , ZZ , G)
...
FOR GIVEN ARGUMENTS 1 .LE. I .LE. MSTAR AND ZZ
GSUB RETURNS THE VALUE OF THE I-TH BOUNDARY
VALUE LOCATED AT ZETA(I).
GSUB MUST APPEAR IN AN EXTERNAL STATEMENT
OF THE CALLING PROGRAM.
- IER** - RETURN CODE FROM KOLSYS. (OUTPUT)
= 1 FOR NORMAL RETURN
= 0 IF THE COLLOCATION MATRIX IS SINGULAR.
=-1 IF THE EXPECTED NUMBER OF SUBINTERVALS
EXCEEDS STORAGE SPECIFICATIONS.
=-2 IF THE NONLINEAR ITERATION HAS NOT CON-
VERGED.
=-3 IF THERE IS AN INPUT DATA ERROR.
- REQD. ROUTINES** - COL1, CONTRL, CONSTS, NEWMSH, ERRCHK, LSYSLV,
BLDBLK; APPSLN, APPROX, BSPFIX, BSPVAR, BSPDER,
APPDIF, HORDER; DFAPP, DGAPP; FCBLOK, FACTRB,
SHIFTB, SBBLOK, SUBFOR, SUBBAK
THE ABOVE ROUTINES ARE ALL PROVIDED.
SUBROUTINES FSUB, GSUB
MUST BE SUPPLIED BY THE USER.
- REFERENCES** - (1) ASCHER U., CHRISTIANSEN J. AND
RUSSELL R.D., A COLLOCATION SOLVER
FOR MIXED ORDER SYSTEMS OF BOUNDARY
VALUE PROBLEMS, TECH. REP. 77-13,
DEPT. COMPUTER SC., UNIV. B.C.,
VANCOUVER, CANADA. ALSO IN
MATH. COMP. 33 (1979), 659-679.
(2) ASCHER U., CHRISTIANSEN J. AND
RUSSELL R.D., COLLOCATION SOFTWARE FOR
BOUNDARY VALUE ODES, ACM TOMS VOL. 7,
NO. 2, (1981), 209-222.
(3) RUSSELL R.D. AND CHRISTIANSEN J.,
ADAPTIVE MESH SELECTION STRATEGIES FOR
SOLVING BOUNDARY VALUE PROBLEMS,
SIAM J. NUMER. ANAL. 7(1978), 59-80.

ALGORITHM

- KOLSYS SOLVES A MULTI-POINT BOUNDARY VALUE PROBLEM FOR A MIXED ORDER SYSTEM OF ODES GIVEN BY
$$D(M(I)) U(I) = F(I) \quad I=1, \dots, N,$$
AND BOUNDARY CONDITIONS
$$G(J, ZETA(J), ZZ(U(ZETA))) = 0,$$
$$J = 1, \dots, MSTAR.$$
WHERE:
$$U = (U(1), \dots, U(N))$$
 IS THE SOLUTION VECTOR;
$$D(M(I)) U(I)$$
 DENOTES THE $M(I)$ -TH DERIVATIVE OF $U(I)$ WITH RESPECT TO X ;
$$ZZ=(U(1), D(1) U(1), \dots, D(M(1)-1) U(1), \dots, U(N), D(1) U(N), \dots, D(M(N)-1) U(N))$$
$$MSTAR = M(1) + \dots + M(N).$$
THE SOLUTION OF THE BVP IS APPROXIMATED BY B-SPLINE COLLOCATION AT GAUSSIAN POINTS WITH AN ADAPTIVE MESH SELECTION STRATEGY (REF.(1)). IN CONTRAST TO COLSYS ALL REQUIRED DERIVATIVES ARE APPROXIMATED BY CENTRAL DIFFERENCES. THE BOUNDARY CONDITIONS RELATE TO BOUNDARY POINTS $ZETA(J)$, WHICH MUST SATISFY
$$A \leq ZETA(J) \leq ZETA(J+1) \leq B,$$
FOR $J=1, \dots, MSTAR-1$. THE BOUNDARY CONDITIONS MUST HAVE THE FORM
$$G(Z) = 0, \text{ AT } X = ZETA(J),$$
WHERE G IS A (GENERALLY) NONLINEAR FUNCTION OF Z , WHICH HAS TO BE SPECIFIED FOR EACH J ,
$$1 \leq J \leq MSTAR.$$

REMARKS

- KOLSYS REPRESENTS AN EASY-TO-USE VERSION OF COLSYS WHICH IS AVAILABLE THROUGH ALGORITHM 569 OF THE "COLLECTED ALGORITHMS FROM ACM" (UNDER THE OPERATING SYSTEM VM/CMS TYPE: MATHDEF SOURCE ACM) . THE SIMPLE PARAMETERLIST OF KOLSYS IS DUE TO SEVERAL DEFAULT VALUES WHICH WERE INITIALIZED BEFORE CALLING COLSYS FROM KOLSYS. IF THE NUMERICAL TREATMENT OF A SPECIFIC BOUNDARY VALUE PROBLEM SEEMS TO BE TOO COMPLICATED FOR KOLSYS ONE MAY SWITCH TO COLSYS WHICH IS ALSO AVAILABLE FROM ZAMLIB AS LOAD MODULE. FOR A DESCRIPTION OF THE APPROPRIATE PARAMETER LIST THE USER IS REFERRED DIRECTLY TO ALGORITHM 569 AND REF.(2). THERE ARE LOTS OF WELL SUITED TRANSFORMATIONS TO REFORMULATE MORE GENERAL BOUNDARY VALUE PROBLEMS INTO THE 'STANDARD FORM', WHICH IS NECESSARY FOR AN APPLICATION OF COLSYS OR DIFBD. MANY OF THESE TRANSFORMATIONS ARE SUMMARIZED IN ASHER U., RUSSEL R.D., REFORMULATION OF BOUNDARY VALUE PROBLEMS INTO 'STANDARD FORM', SIAM REVIEW, VOL. 23, NR. 2, APRIL 1981

A.13. Rechnerprogramm Gesamter diffusiver Sauerstofftransport

```

C      Stofftransport im Sinterglas                                1.4.1988
C      durch Poren- und Filmdiffusion
C-----
C      Eingabe von "epsilon" aus Datei: e.dat
C
      byte infile(40),outfil(40)
      real K1,d,e,wurzel,c,Z,F,emax,B,Ea,Bp,A,Aa,Ap,di,Rp,K2,L,L0
      data infile/'e','.', 'd','a','t',34*' ',0/
C-----
C      Zuweisung
      d=0.79
      L0=0.00252
      A=13.09
      Aa=A*0.4
      Ap=A*0.6
      di=0.17
      Rp=0.005
C-----
C      Eingabe der dimensionslosen Zelldichte
C
      write(5,40)
40      format('$dimlos x (-) : ')
      read(5,*)x
C-----
1000      write(5,20)
20      format('$Name der Ausgabe-Datei : ')
      call assign(1,infile)
      read(5,30) outfil
30      format(40a1)
      outfil(40)=0
      call assign (2,outfil)
C-----
      Marke=0.
      F=0.
      Z=0.
      Ba=Aa*L0*di
      do 10 i=1,10000
          read(1,*,end=2000) e
          K1=e*d
          wurzel=K1*K1-d*x*e*e+1
          o=-K1+sqrt(wurzel)
          L=L0*o
          K2=L/Rp
          Fe=2*K2-K2*K2
          F=F+Fe
          Z=Z+1
          if (Marke .eq. 1.) goto 69
          if (o .le. 0.03) then
              Bp=Ap*di*F/Z*e*L0
              emax=e
              marke=1.
          end if
69          write(2,111) o,e
111          format(1x,6(2x,1PE10.3))
10      continue
2000      B=Ba+Bp
          write(5,*)' emax=',emax,' Ba=',Ba,' Bp=',Bp,' B=',B
          CLOSE(UNIT=1)
          CLOSE(UNIT=2)
      end

```

A.14. Diffusion der Mikroorganismen aus den Poren des Sinterglases

Können die in den Poren nachwachsenden Mikroorganismen durch rein diffusive Transportvorgänge aus diesen heraustransportiert werden? Wachsen die Poren zu, wenn keine Durchströmung des Sinterglases (konvektiver Transport der Zellen) auftritt? Diese Fragen sollen anhand einer einfachen Rechnung größenordnungsmäßig abgeschätzt werden:

Der Diffusionskoeffizient von Makromolekülen läßt sich nach Stoeck-Einstein (Hoppe et al., 1978) folgendermaßen berechnen:

$$D_M = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_M} \quad [\text{cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A19})$$

mit D_M = Diffusionskoeffizient des Makromoleküls $[\text{cm}^2/\text{sec}]$
 k = Boltzmann-Konstante: $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ N} \cdot \text{m}/^\circ\text{K}$
 T = Absolute Temperatur $[^\circ\text{K}]$
 η = Dynamische Viskosität des Mediums $[\text{N} \cdot \text{sec}/\text{m}^2]$
 R_M = Radius des Teilchens (Makromoleküls) $[\text{cm}]$

Mit T = $303.15 \text{ }^\circ\text{K}$ (30°C)
 η = $10^{-3} \text{ N} \cdot \text{sec}/\text{m}^2$ (für Wasser)
 R_M = $0.5 \text{ }\mu\text{m}$ (Radius eines Mikroorganismus)

folgt für den Diffusionskoeffizienten eines Mikroorganismus:

$$D_M = 4.4 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

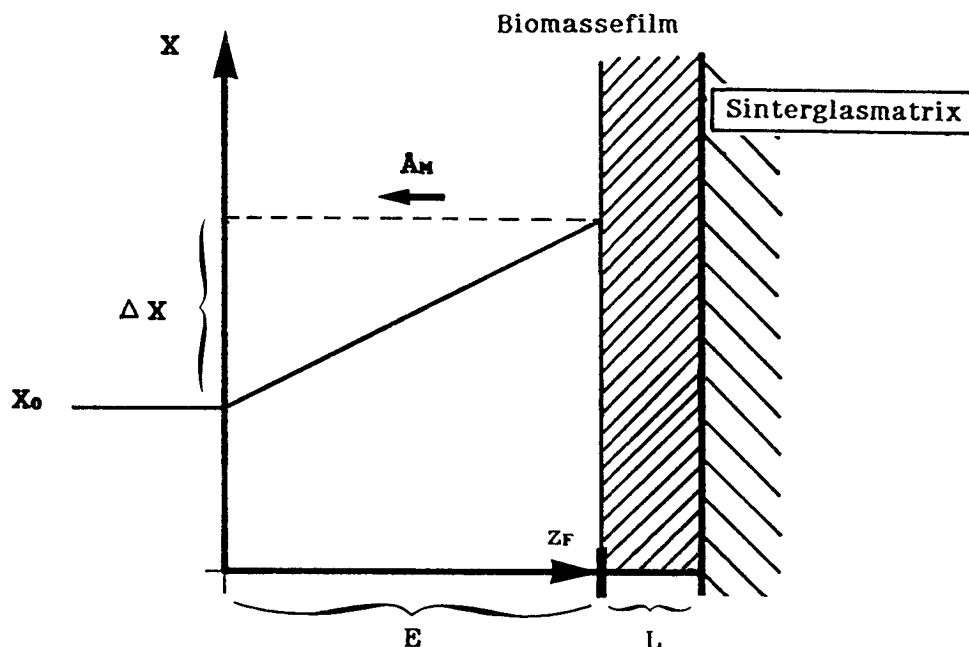


Abb. A.7: Diffusion der auf der Glasoberfläche nachwachsenden Mikroorganismen durch die unbewegte Fermentationsflüssigkeit

Anhand von Abb. A.7 soll die Erhöhung der Mikroorganismenkonzentration ΔX in einem unbewegten Flüssigkeitsfilm abgeschätzt werden (Vereinfachung analog zu Abb. 4.41 und 4.42; S. 146 und 147). Der Biomassefilm der Dicke L gibt laufend nachwachsende Zellen in die unbewegte Fermentationsflüssigkeit ab. Die Zellen diffundieren von der Oberfläche des Biomassefilms aufgrund eines Konzentrationsgefälles durch die unbewegte Flüssigkeit bis zum Eingang der Pore (Wegstrecke E).

Nach dem ersten Fick'schen Gesetz (Diffusionsterm) gilt:

$$A_M = - D_M \cdot \frac{\Delta X}{\Delta Z_F} \quad [\text{gTS/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A20})$$

mit A_M = Flußdichte der Mikroorganismen in der unbewegten Fermentationsflüssigkeit [gTS/cm²/sec]
 X = Konzentration der suspendierten Mikroorganismen in der Fermentationsflüssigkeit [gTS/l]
 z_F = Längenkoordinate im Flüssigkeitsfilm [mm]

Für die Flußdichte (Quellenterm) gilt:

$$A_M = \mu \cdot \delta_B \cdot L \quad [\text{gTS/cm}^2/\text{sec}] \quad (\text{Gl. A21})$$

mit μ = Wachstumsrate der Mikroorganismen [1/h]
 δ_B = Zelldichte im Biomassefilm [gTS/cm³]
 L = Dicke des Biomassefilms [mm]

Für den Unterschied der Mikroorganismenkonzentration ΔX zwischen dem Poreneingang und der Oberfläche des Biomassefilms (Wegstrecke E) folgt:

$$\Delta X = \frac{\mu \cdot \delta_B \cdot L \cdot E}{D_M} \quad [\text{gTS/l}] \quad (\text{Gl. A22})$$

Für ein Berechnungsbeispiel kann aus Abb. 4.43 (S. 149) ein Wertepaar von $L = 5 \mu\text{m}$ und $E = 100 \mu\text{m}$ abgegriffen werden.

Mit $\mu = 0.1/\text{h}$ (s. Kap. 4.4)
 $\delta_B = 0.17 \text{ gTS/cm}^3$ (s. Kap. 4.4)
 $D_M = 4.4 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ (s.o.)

folgt:

$$\Delta X = 5 \text{ gTS/l}$$

Dieser Konzentrationsunterschied bewegt sich also in der Größenordnung der Zellkonzentration der frei suspendierten Mikroorganismen. Ein Zuwachsen der Poren aufgrund einer unzureichenden Transportgeschwindigkeit der Zellen ist damit nicht zu erwarten.

A.15. Berechnung der Strömungsgeschwindigkeit in einer Pore

Der tatsächliche Lückengrad ε einer Kugelschüttung berechnet sich nach Blas (1978) zu:

$$\varepsilon = 0.375 + 0.34 \cdot d_P / d_K \quad [-] \quad (\text{Gl. A23})$$

mit ε = Lückengrad $[-]$
 d_P = Durchmesser der Trägerkörperpartikel $[\text{cm}]$
 d_K = Durchmesser der Kolonne $[\text{cm}]$

Der Druckverlust an einer Trägerkörperschüttung ergibt sich nach Buchholz (1982) zu:

$$\frac{\Delta p}{h} = 150 \frac{(1-\varepsilon)^2 \cdot \eta \cdot u}{\varepsilon^3 \cdot d_P^2} + 1.75 \frac{(1-\varepsilon) \cdot \delta \cdot u^2}{\varepsilon^3 \cdot d_P} \quad [\text{Pa/cm}] \quad (\text{Gl. A24})$$

wenn turbulente Strömung in der Schüttung vorliegt:

$$\text{Re} = u \cdot d_P \cdot \delta / \eta > 10 \quad [-] \quad (\text{Gl. A25})$$

mit Δp = Druckverlust an der gesamten Trägerkörperschüttung $[\text{Pa}]$
 h = Höhe der gesamten Trägerkörperschüttung $[\text{cm}]$
 η = Dynamische Viskosität des Mediums $[\text{Pa} \cdot \text{sec}]$
 u = Leerrohrgeschwindigkeit des Mediums $[\text{cm/sec}]$
 δ = Dichte des Mediums $[\text{kg/m}^3]$
 Re = Reynoldszahl $[-]$

Der Druckverlust an einem einzelnen Trägerkörper läßt sich errechnen, indem für h der Durchmesser der Partikel eingesetzt wird.

Die Strömungsgeschwindigkeit in einer Pore läßt sich nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz abschätzen:

$$\dot{u} = \frac{\pi \cdot R_P^4 \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l \cdot A_P} = \frac{R_P^2 \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l} \quad [\text{cm/sec}] \quad (\text{Gl. A26})$$

mit $\dot{u}$ = Strömungsgeschwindigkeit in einer Pore $[\text{cm/sec}]$
 R_P = Radius einer Pore $[\text{cm}]$
 l = Länge der Pore $[\text{cm}]$
 A_P = Querschnittsfläche einer Pore $[\text{cm}^2]$

Mit folgenden Werten wurde gerechnet:

$$d_P = 0.3 \text{ cm}$$

$$d_K = 3.4 \text{ cm}$$

$$u = 5 \text{ cm/sec}$$

$$\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{sec (für Wasser)}$$

$$\delta = 10^3 \text{ kg/m}^3 \text{ (für Wasser)}$$

$$h = 0.3 \text{ cm (Durchmesser der Trägerkörper)}$$

$$R_P = 0.005 \text{ cm (mittlerer Wert nach Herstellerangaben)}$$

$$l = 0.3 \text{ cm (Durchmesser der Trägerkörper)}$$

$$\text{Aus (Gl. A23) folgt: } \varepsilon \approx 0.4$$

$$\text{Aus (Gl. A24) folgt: } \Delta p/h \approx 184 \text{ Pa/cm}$$

$$\text{Aus (Gl. A25) folgt: } Re \approx 150 \gg 10$$

$$\text{Aus (Gl. A26) folgt: } \dot{u} \approx 0.6 \text{ cm/sec}$$

Liste der mathematischen Formelzeichen

A	= Stoffdichte in einer Biomassefilmscheibe der Dicke Δz_B [mmol/cm ²]
A_M	= Mit Biomasse bewachsene ringförmige Querschnittsfläche einer Pore [cm ²]
A_P	= Querschnittsfläche einer Pore [cm ²]
A_S	= Gesamte äußere Oberfläche des Sinterglases [cm ² /gGlas]
$A(z_B)$	= Stoffflußdichte an der Stelle z_B [mmol/cm ² /sec]
A^*	= Stoffverbrauch durch die Mikroorganismen [mmol/cm ² /sec]
A_B	= Sauerstoffflußdichte im Biomassefilm [mmol/cm ² /sec]
A_F	= Sauerstoffflußdichte im Flüssigkeitsfilm [mmol/cm ² /sec]
A_M	= Flußdichte der Mikroorganismen in der unbewegten Fermentationsflüssigkeit [gTS/cm ² /sec]
B_A	= Auf der äußeren nicht aus Pore bestehenden Oberfläche des Sinterglases immobilisierte aktive Biomassemenge [gTS/gGlas]
B_{Ges}	= Gesamte auf dem Sinterglas immobilisierte aktive Biomassemenge [gTS/gGlas]
B_P	= Gesamte in den Poren immobilisierte aktive Biomassemenge [gTS/gGlas]
C	= Konzentration des diffundierenden Stoffes [M]
C_{Ges}	= Konzentration aller Teilchen in der Fermentationsflüssigkeit [M]
C_i	= Kohlenstoffgehalt der Substanz i [g/mol]
$C_{O_2}^*$	= Sauerstoffsättigungskonzentration [M]
D	= Durchflußrate [1/h]
D_e	= Effektiver Diffusionskoeffizient im Biomassefilm [cm ² /sec]
$D_{e,K}$	= Effektiver Diffusionskoeffizient für Ketosäure im Biomassefilm [cm ² /sec]
$D_{e,O}$	= Effektiver Diffusionskoeffizient für Sauerstoff im Biomassefilm [cm ² /sec]
D_{krit}	= Kritische Durchflußrate [1/h]
D_M	= Diffusionskoeffizient für Mikroorganismen [cm ² /sec]
D_O	= Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in der Fermentationsflüssigkeit [cm ² /sec]
E	= Schichtdicke des unbewegten Flüssigkeitsfilms [mm]
E_{max}	= Maximale durch Mikroorganismen kolonisierte Porenlänge [mm]
F	= Verdünnungsfaktor [-]
G_{Ges}	= Gesamte Sinterglasfüllung des Reaktors [g]
H_{CO_2}	= Henry-Konstante von CO ₂ in Wasser [mol/m ³ /bar]
K	= Ketosäurekonzentration im Reaktor [M]
K_O	= Ketosäurekonzentration im Zulauf [M]
K_B	= Ketosäurekonzentration im Biomassefilm [g/l]
K_{BO}	= Ketosäurekonzentration auf der Oberfläche des Biomassefilms [g/l]
$K_{CO_2,l}$	= Konzentration von gelöstem CO ₂ [M]
$K_{HCO_3^-}$	= Bicarbonatkonzentration [M]
K_K	= Monod-Konstante für Ketosäure [M]
K_S	= Monod-Konstante für Glucose [M]
K_i	= Konzentration der Substanz i [M]
K_I	= Integrationskonstante [mmol/l/mm]

K_2	= Integrationskonstante [mmol/l]
L_e	= Leucinkonzentration im Reaktor [M]
L	= Dicke des Biomassefilms [mm]
L_0	= Dicke des Biomassefilms bei $O_{B0} = O_{F0}$ [mm]
O_B	= Sauerstoffkonzentration im Biomassefilm [M]
O_{B0}	= Sauerstoffkonzentration auf der Oberfläche des Biomassefilms [M]
O_F	= Sauerstoffkonzentration im Flüssigkeitsfilm [M]
O_{F0}	= Sauerstoffkonzentration in der freien Fermentationsflüssigkeit [M]
P_1	= Fermenterinnendruck [bar]
Q_{O2}	= Sauerstoffaufnahme rate [mol/l/h]
Q_{O2}'	= Zeitliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration [%/h]
R	= Gaskonstante [l·bar/mol/K]
Re	= Reynoldszahl [-]
R_M	= Radius eines Mikroorganismus [mm]
R_P	= Radius einer Pore [mm]
S	= Glucosekonzentration im Reaktor [M]
S_0	= Glucosekonzentration im Zulauf [M]
S_{stat}	= Stationäre Glucosekonzentration im Reaktor [M]
T	= Absolute Temperatur [K]
V_K	= Volumen einer Kugelschüttung [l]
V_P	= Volumen eines Partikels [l]
V_{1P}	= Biomassevolumen in einer zylindrischen Pore [cm ³]
V_R	= Reaktorvolumen [l]
V_{mo}	= Molares Normvolumen [Nl/mol]
X	= Suspendierte Biomassekonzentration im Reaktor [gTS/l]
ΔX	= Erhöhung der suspendierten Biomassekonzentration in der unbewegten Fermentationsflüssigkeit innerhalb der Poren [gTS/l]
X_{stat}	= Stationäre Biomassekonzentration im Reaktor [gTS/l]
X_i	= Aktive immobilisierte Biomassekonzentration [gTS/l]
$Y_{L/K}$	= Ausbeutekoeffizient (gLeu/gKet) [-]
$Y_{L/K}'$	= Molarer Ausbeutekoeffizient (molLeu/molKet) [-]
$Y_{L/S}$	= Ausbeutekoeffizient (gLeu/gGlu) [-]
$Y_{L/S}'$	= Molarer Ausbeutekoeffizient (molLeu/molGlu) [-]
$Y_{X/O2}$	= Ausbeutekoeffizient (gTS/gO ₂) [-]
$Y_{X/S}$	= Zellertrag bzw. Ausbeutekoeffizient (gTS/gGluc) [-]
a_P	= Anteil der gesamten Porenquerschnittsfläche an der gesamten äußeren Oberfläche des Sinterglases [-]
$C_{CO2,g}$	= Kohlenstoffstrom durch gasförmiges CO ₂ [g/h]
$C_{CO2,l}$	= Kohlenstoffstrom durch gelöstes CO ₂ und Bicarbonat [g/h]
c_i	= Kohlenstoffstrom der Substanz i [g/h]
d_K	= Durchmesser der Kolonne [cm]
d_P	= Durchmesser der Trägerkörper [cm]
h	= Höhe der Trägerkörperschüttung [cm]
k	= Boltzmann-Konstante [N·m/K]
l	= Länge einer Pore [cm]
$\bar{n}$	= Effektivitätskoeffizient [-]
p	= Spezifische Produktbildungsrate [mol/gTS/h]
p_{max}	= Maximale spezifische Produktbildungsrate [g/gTS/h]

P_{max}'	= Maximale spezifische Produktbildungsrate [mol/gTS/h]
ΔP	= Druckverlust an der gesamten Trägerkörperschüttung [Pa]
q	= Spezifische Sauerstoffaufnahme [mol/gTS/h]
q_{max}	= Maximale spezifische Sauerstoffaufnahme [mol/gTS/h]
u	= Leerrohrgeschwindigkeit des Mediums [cm/sec]
$\dot{u}$	= Strömungsgeschwindigkeit in einer Pore [cm/sec]
V_P	= Produktflüssigkeitsstrom [l/h]
V_a	= Abgasstrom [Nl/h]
V_e	= Eingasstrom [Nl/h]
V_l	= Gesamtvolumenstrom [l/h]
V_R	= Spezifische Verbrauchsrate der Mikroorganismen [mmol/gTS/h]
y	= Achsenabschnitt [-]
$y_{CO_2,a}$	= CO ₂ -Volumenanteil im Abgasstrom [-]
$y_{O_2,a}$	= O ₂ -Volumenanteil im Abgasstrom [-]
$y_{O_2,e}$	= O ₂ -Volumenanteil im Eingasstrom [-]
z_B	= Längenkoordinate im Biomassefilm [mm]
z_F	= Längenkoordinate im Flüssigkeitsfilm [mm]
α	= Produktbildungskonstante [g/g]
Π_o	= Osmotischer Druck [bar]
η	= Dynamische Viskosität des Mediums [Pa·sec]
μ	= Wachstumsrate [1/h]
μ_{max}	= Maximale Wachstumsrate [1/h]
τ	= Mittlere Verweilzeit [h]
δ	= Dichte des Mediums [kg/m ³]
δ_B	= Zelldichte im Biomassefilm [gTS/cm ³]
ϵ	= Lückengrad [-]

Literaturverzeichnis

Abbott A., Rutter P.R. and Berkeley R.C.W., The Influence of Ionic Strength, pH and a Protein Layer on the Interaction Between *Streptococcus mutans* and Glass Surfaces, J. Gen. Microbiol. 129, 439-445 (1983)

Aida K., Chibata I., Nakayama K., Takinami K. and Yamada H., eds. Biotechnology and Amino Acid Production, Progress in Industrial Microbiology, vol. 24, Kodansha Ltd., Tokyo (1986)

Aivasidis A., Process Development for Anaerobic Waste Water Treatment Using Porous Carriers for Microbial Colonization, accepted by Bioprocess Engineering (1988)

Ajinomoto Co., Amino Acids, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 58/187196 A2 [83/187196], 1. Nov. (1983)

Akashi K., Shibai H. and Hirose Y., Effect of Oxygen Supply on L-Valine Fermentation, J. Ferment. Technol. 55, 364 - 368 (1977)

Amory D.E., Genet M.J. and Rouxhet P.G., Application of XPS to the Surface Analysis of Yeast Cells, Surf. Interface Anal., in press (1988a)

Amory D.E., Mozes N., Hermesse M.P., Leonard A.J. and Rouxhet P.G., Chemical Analysis of the Surface of Microorganisms by X-ray Photoelectron Spectroscopy, FEMS Letters 49, 107 - 110 (1988b)

Andrews G.F., Fluidized-Bed Fermenters: A Steady-State Analysis, Biotechnol. Bioeng. 24, 2013 - 2030 (1982)

Araki K., Ueda H. and Saigusa S., Fermentative Production of L-Leucine with Auxotrophic Mutants of *Corynebacterium glutamicum*, Agr. Biol. Chem. 38, 565 - 572 (1974)

Atkinson B. and Daoud I.S., Microbial Flocs and Flocculation in Fermentation Process Engineering, Advances in Biochemical Engineering 4, Chap. 2, 41 - 124 (1971)

Bailey J.E. and Ollis D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, New York, USA (1986)

Berger R., Immobilisierung mikrobieller Zellen und deren Nutzung zur Substratwandlung - Eine Literaturstudie, Acta Biotechnologica 1, 73 - 102 (1981)

Berger R., Immobilisierung mikrobieller Zellen und deren Nutzung zur Substratwandlung - Eine Literaturstudie, Acta Biotechnologica 2, 434 - 358 (1982)

- Bhattacharjee J.W., Effect of Cadmium and Zinc on Microbial Adhesion, Growth and Metal Uptake, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 396 - 400 (1986)
- Biryukov V.V. and Tarasova S.S., Permeability Criterion of Microcolonies, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 4, 573 - 579 (1973)
- Bisping B. and Rehm H.J., Glycerol Production by Cells of *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Sintered Glass, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 174 - 179 (1986)
- Bjerrum J., Schwarzenbach G. and Sillen L.G., Stability Constants, The Chemical Society, London (1957)
- Black G.M., Webb C., Matthews T.M. and Atkinson B., Practical Reactor Systems for Yeast Cell Immobilization Using Biomass Support Particles, *Biotechnol. Bioeng.* 26, 134 - 141 (1984)
- Blanch H.W., Immobilized Microbial Cells, Chap. 4, Annual Reports on Fermentation Processes 7, 81 - 105 (1984)
- Blaß E., Verfahrenstechnische Dimensionierung von Stoff- und Wärmeaustauschern, Vorlesungsunterlagen Apparatebau, Lehrstuhl A für Verfahrenstechnik der Technischen Universität München (1978)
- Boirie M., Pons B.J. and Renauld C., Continuous Production of Amino Acids Using a Selected Bacterial Strain Adsorbed on a Porous Support, *Franz. Patent FR 2509748 A1*, 21 Jan (1983)
- Bridson E.Y. and Brecker A., Design and Formulation of Microbial Culture Media, *Methods in Microbiology* 3A, 229 - 295 (1970)
- Brodelius P., Hägerdal B. and Mosbach K., Immobilized Whole Cells of the Yeast *Trigonopsis variabilis* Containing D-Amino Acid Oxidase for the Production of α -Keto Acids, *Enzyme Eng.* 5, 383 - 387 (1980)
- Brown D.E., Aeration in Submerged Culture of Microorganisms, *Methods in Microbiology* 2 (Noris J.R. and Ribbons D.W., eds.), Academic Press, New York, USA, 127 - 274 (1970)
- Buchholz K., Reaction Engineering Parameters for Immobilized Biocatalysts, *Adv. Biochem. Bioeng.* 24, 39 - 71 (1982)
- Büchs J., Wandrey C., Kula M.-R. und Radke M., Anorganische Trägerkörper mit aminhaltiger Oberflächenschicht zur Immobilisierung von Mikroorganismen oder Zellen, Verfahren zur Herstellung derselben und deren Verwendung, Deutsche Patentanmeldung 13.8.1987, P 37 26 941.0-41 (1987a)
- Büchs J., Wandrey C. und Radke M., Trägerkörper zur Immobilisierung von Zellen oder Mikroorganismen aus anorganischem Material mit basischer aminhaltiger Oberflächenbeschichtung, Deutsche Patentanmeldung 13.8.1987, P 37 26 942.9-41 (1987b)

Busscher H.J., Weerkamp A.H., van der Mei H.C., van Pelt A.W., de Jong H.P. and Arends J., Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and its Relevance for Adhesion, *Appl. Env. Microbiol.* 48, 980 - 983 (1984)

Calleja G.B., *Microbial Aggregation*, CRC Press, Boca Raton, 93 - 147 (1984)

Champluvier B.P., Kamp B. and Rouxhet P.G., Immobilization of β -Galactosidase in Whole Cells of *Kluyveromyces* Adhering to a Support, *Proc. 4th European Congress on Biotechnol.* Amsterdam, Vol. 2, 192 (1987)

Chibata I., Tosa T. and Sato T., Immobilized Aspartase-Containing Microbial Cells: Preparation and Enzymatic Properties, *Appl. Microbiol.* 5, 878 - 885 (1974)

Chibata I., Tosa T. and Sato T., Immobilized Biocatalysts to Produce Amino Acids and Other Organic Compounds, in *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology* (Laskin A.I. ed.), The Benjamin/Cummings Publishing Comp. Inc., Menlo Park, California (1985)

Christensen G. D., Simpson W. A. and Beachey E. H., Adhesion of Bacteria to Animal Tissues: Complex Mechanisms, in *Bacterial Adhesion* (Savage D. C. and Fletcher M., eds.), Chap. 10, Plenum Press, New York (1985)

Constantinides A., Bhatia D. and Vieth W.R., Immobilization of *Brevibacterium flavum* on Collagen for the Production of Glutamic Acid in a Recycle Reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 23, 899 - 916 (1981)

Constantinides A. and Chotani G.K., Reproductive Immobilized Cells, *Enzyme Engineering* 7, *Annals N.Y. Acad. Sc.* 434, 347 - 362 (1984)

Cooper A.J., Ginos J.Z. and Meister A., Synthesis and Properties of the α -Keto Acids, *Chem. Rev.* 83, 321 - 358 (1983)

D'Souza S.F., Melo J.S., Deshpande A. and Nadkarni G.B., Immobilization of Yeast Cells by Adhesion to Glass Surface Using Polyethylenimine, *Biotechnology Letters* 8, Nr. 9, 643 - 648 (1986)

Daniels S.L. and Kempe L.L., The Separation of Bacteria by Adsorption onto Ion Exchange Resins, *Chem. Eng. Prog. Symp.* 62, Nr. 69, 142 - 148, (1966)

Darton R.C., The Physical Behaviour of Three-Phase Fluidized Beds, in *Fluidization* (Davidson J.F., Clift R. and Harrison D., eds.), Chap. 10, Academic Press, New York, USA, 495 - 528 (1985)

Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H. and Jones K.M. eds., *Data for Biochemical Research*, Clarendon Press, Oxford (1986)

Deckwer W.-D. und Schumpe A., Transporterscheinungen in Dreiphasen-Reaktoren mit fluidisiertem Feststoff, *Chem.-Ing.-Tech* 55 (8), 591 - 600 (1983)

- Dixon J. K., La Mer V. K., Cassian Li, Messinger S. and Linford H. B., Effect of the Structure of Cationic Polymers on the Flocculation and the Electrophoretic Mobility of Crystalline Silica, *Journal of Colloid and Interface Science* 23, 465-475 (1967)
- Durand G. and Navarro J.M., Immobilized Microbial Cells, *Process Biochemistry*, 14 - 23, Sept. (1978)
- Eddy A.A. and Rudin A.D., The Structure of the Yeast Cell Wall: Identification of Charged Groups at the Surface, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 148, 419 - 432 (1958)
- Eggeling L., Institut für Biotechnologie 1, KFA Jülich, Persönliche Mitteilung (1987)
- Ellwood D. C. and Tempest D. W., Effects of Environment on Bacterial Wall Content and Composition, *Adv. Microbio. Physiol.* 7, 83-117 (1972)
- Enei H., Shibai H. and Hirose Y., Amino Acids and Nucleic Acid-Related Compounds, *Annual Reports on Fermentation Processes* 5, 79 - 100 (1982)
- Enfors S.O. and Mattiasson B., Oxygenation of Processes Involving Immobilized Cells, Chap. 3 in *Immobilized Cells and Organelles*, Vol.2 (Mattiasson B. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida 41 - 60 (1983)
- Ferguson W.J., Braunschweiger K.I., Braunschweiger W.R., Smith J.R., McCormick J.J., Wasmann C.C., Jarvis N.P., Bell D.H. and Good N.E., Hydrogen Ion Buffers for Biological Research, *Analyt. Biochem.* 104, 300 - 310 (1980)
- Fujimura M., Kato J., Tosa T. and Chibata I., Continuous Production of L-Arginine Using Immobilized Growing *Serratia marcescens* Cells: Effectiveness of Supply of Oxygen Gas, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 79 - 84 (1984)
- Furui M. and Yamashita K., Diffusion Coefficients of Solutes in Immobilized Cell Catalysts, *J. Ferment. Technol.* 63 (2), 167 - 173 (1985)
- Ghommidh C., Navarro J.M. and Durand G., A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells: Oxygen Transfer, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 605 - 617 (1982)
- Good N.E. and Izawa S., Hydrogen Ion Buffers, *Methods in Enzymology* 24, 53 - 68 (1972)
- Good N.E., Wingert G.D., Winter W., Connolly T.N., Izawa S. and Singh R.M.M., Hydrogen Ion Buffers for Biological Research, *Biochemistry* 5 (2), 467 - 477 (1966)
- Gottschalk G., *Bacterial Metabolism*, Springer Verlag, New York, USA (1986)
- Gröger U., Mikrobielle Gewinnung von L-Leucin aus α -Ketoisocaproensäure, *Dissertationsarbeit Universität Düsseldorf* (1986)

Guilleth A., Union Carbide, Genf, Schweiz, Persönliche Mitteilung (1986)

Hänel F., Brezesinski G., Dörfler H.D., Hilliger M. and Gräfe U., Thermal Regulation of Phospholipid Fluidity in *Corynebacterium glutamicum*, J. Basic Microbiol. 26 (7), 409 - 413 (1986)

Harris R.F. and Adams S.S., Determination of the Carbon-Bound Electron Composition of Microbial Cells and Metabolites by Dichromate Oxidation, Appl. and Environ. Microbiol. 37 (2), 237 - 243 (1979)

Harris R.H. and Mitchell R., The Role of Polymers in Microbial Aggregation, Ann. Rev. Microbiol. 27, 27 - 50 (1973)

Hartmeier W., Rüscher G., Sieger C. and Bückner C., Continuous Production of Lactic Acids Using Carrier-Fixed and Flocculating Bacteria, Proc. 4th European Congress on Biotechnol. Amsterdam, Vol. 2, 192 (1987)

Hattori R. and Hattori T., Adsorptive Phenomena Involving Bacterial Cells and an Anion Exchange Resin, J. Gen. Appl. Microbiol. 31, 147 - 163 (1985)

Hattori T. and Furusaka C., Chemical Activities of *E. coli* Adsorbed on a Resin: Dowex-I, Nature 184, 1566 - 1567 (1959)

Heath C. and Belfort G., Modeling of Substrate Mass Transfer and Uptake in Hollow Fiber and Microcapsule Bioreactors, in Biochemical Engineering (Chmiel H., Hammes W.P. and Bailey J.E., eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 307 - 326 (1987)

Henkel H.-J., Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik Stuttgart, Persönliche Mitteilung (1988)

Hilliger M., Hänel F. und Menz J., Temperatureinfluss auf Wachstum und L-Lysin-Bildung von *Corynebacterium glutamicum*, Z. allg. Mikrobiol. 24 (7), 437 - 441 (1984)

Hirose Y., Yamanaka S., Okada H. and Kinoshita K., Studies on Oxygen Transfer in Submerged Fermentations Part III, Agr. Biol. Chem. 29 (11), 989 - 997 (1965)

Hirose Y. and Shibai H., Amino Acid Fermentation, Biotechnol. Bioeng. 22 (1), 111 - 125 (1980a)

Hirose Y. and Shibai H., Effect of Oxygen on Amino Acids Fermentation, Advances in Biotechnology I, Proc. 6th Int. Ferment. Symp. London, Canada, 329 - 333 (1980b)

Ho C.S. and Ju L.-K., Effects of Microorganisms on Effective Oxygen Diffusion Coefficients and Solubilities in Fermentation Media, Biotechnol. Bioeng. 32, 313 - 325 (1988)

Holzer P., Vereinigte Glaswerke Aachen, Persönliche Mitteilung (1986)

- Hoppe B. und Martens J., Aminosäuren - Bausteine des Lebens, Chemie in unserer Zeit 17 (2), 41 - 53 (1983)
- Hoppe B. und Martens J., Aminosäuren - Herstellung und Gewinnung, Chemie in unserer Zeit 18 (3), 73 - 86 (1984)
- Hoppe W., Lohmann W., Markl H. und Ziegler H., Biophysik: Ein Lehrbuch, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1978)
- Hummel D.O., Physikalische Chemie, Walter de Gruyter, Berlin, New York, (1983)
- Ibrahim M., Hubert P., Dellacherie E., Magdalou J., Muller J. and Siest G., Covalent Attachment of Epoxide Hydrolase to Dextran, Enzyme Microb. Technol. 7, 66 - 72 (1985)
- Jack T.R. and Zajic J.E., The Immobilization of Whole Cells, Advances in Biochemical Engineering 5, 125 - 145 (1977a)
- Jack T.R. and Zajic J.E., The Enzymatic Conversion of L-Histidine to Urocanic Acid by Whole Cells of *Micrococcus luteus* Immobilized on Carbodiimide Activated Carboxymethylcellulose, Biotechnol. Bioeng. 19, 631 - 648 (1977b)
- Johnen B., Quantifizierung der Biomasseakkumulation in einem Festbettumlaufreaktor, Diplomarbeit Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich (1986)
- Jones G.W., Adhesion to Animal Surfaces, in Microbial Adhesion and Aggregation (Marshall K.C., ed.), Springer-Verlag, Berlin (1984)
- Karel S.F., Libicki S.B. and Robertson C.R., The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles, Chem. Eng. Sci. 40, 1321 - 1354 (1985)
- Karube I., Wang Y., Tamiya E. and Kawarai M., L-Glutamate Production by Protoplasts Immobilized in Carrageenan Gel, J. of Biotechnology 6, 1 - 7 (1987)
- Kasche V. und Buchholz K., Mass Transfer Influence on Effectiveness, in Characterization of Immobilized Biocatalysts (Buchholz K., ed.) Dechema Monographs 84, Verlag Chemie, Weinheim, New York (1979)
- Kennedy J.F. and Cabral J.M.S., Immobilized Living Cells and their Applications, in Applied Biochemistry and Bioengineering, Immobilized Microbial Cells, Vol. 4 (Wingard L.B., Goldstein L. and Katchalski-Katzir E. eds.), 189 - 280 (1983)
- Kim H.S. and Ryu D.Y., Continuous Glutamate Production Using an Immobilized Whole-Cell System, Biotechnol. Bioeng. 24, 2167 - 2174 (1982)
- Kinoshita S., Amino Acids, in Biochem. Ind. Micro-Organisms (Rainbow C. and Rose A.H., eds.) Academic Press, New York, USA, 206 - 226 (1963)
- Kinoshita S., Uda S. and Shimono M., Studies on the Amino Acid Fermentation, Part I, Production of L-Glutamic Acid by Various Microorganisms, J. Gen. Appl. Microbiol. 3, 193 - 205 (1957)

Kitano K., Sugiyama Y. and Kanzaki T., L-Glutamate Fermentation with Acetic Acid by an Oleic Acid-requiring Mutant, J. Ferment. Technol. 50 (3), 182 - 191 (1972)

Kjelleberg S., Adhesion to Inanimate Surfaces, in Microbial Adhesion and Aggregation, Dahlem Konferenz Berlin 1984 (Marshall K.C. ed.), Springer Verlag, Berlin, S. 51 - 70 (1984)

Klein J. and Wagner F., Methods for the Immobilization of Microbial Cells, in Applied Biochemistry and Bioengineering, Immobilized Microbial Cells, Vol. 4 (Wingard L.B., Goldstein L. and Katchalski-Katzir E. eds.), 11 - 51 (1983)

Klein J. and Ziehr H., Immobilisierung von Mikroorganismen durch Adsorption, BioEngineering 3, 8 - 16 (1987)

Kolot F.B., Microbial Carriers - Strategy for Selection, Process Biochem. Aug./Sept., 2 - 9 (1981)

Konecny J., Industrial Approaches to Immobilized Biocatalysts, Swiss Biotech 2 (6), 24 - 27 (1984)

Lambert, P.A., Hancock I.C. and Baddiley J., Occurrence and Function of Membrane Teichoic Acids, Biochim. Biophys. Acta 472, 1 - 12 (1977)

Libicki S.B., Salmon P.M. and Robertson C.R., The Effective Diffusive Permeability of a Nonreacting Solute in Microbial Aggregates, Biotechnol. Bioeng. 32, 68 - 85 (1988)

Linko P. and Linko Y.-Y., Applications of Immobilized Microbial Cells, in Applied Biochemistry and Bioengineering, Immobilized Microbial Cells, Vol. 4 (Wingard L.B., Goldstein L. and Katchalski-Katzir E. eds.), 53 - 151 (1983)

Luria S. E., Bacterial Protoplasm: Composition and Organization, in The Bacteria (Gunsalus I. C. and Stainer R. Y., eds.), Vol. I, Chap. 1, Academic Press, New York (1960)

Lynn M., Inorganic Support Intermediates: Covalent Coupling of Enzymes on Inorganic Supports, Enzymology 1, 1 - 48 (1975)

Margaritis A. and Merchant F.J.A., Advances in Ethanol Production Using Immobilized Cell Systems, CRC Critical Reviews in Biotechnology 1, 339 - 393 (1984)

Markham J.L., Knox K.W., Wicken A.J. and Hewett M.J., Formation of Extracellular Lipoteichoic Acid by Oral *Streptococci* and *Lactobacilli*, Infect. Immun. 12, 378 - 386 (1975)

Mattiasson B., Immobilization Methods, Chap. 2 in Immobilized Cells and Organelles, Vol.1 (Mattiasson B. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida 3 - 25 (1983)

Mattiasson B., Larsson M. and Hahn-Hägerdal B., Metabolic Behaviour of Immobilized Cells - Effects of Some Microenvironmental Factors, *Annals N.Y. Acad. Sc.* 434, 475 - 478 (1984)

Measures J.C., Role of Amino Acids in Osmoregulation of Non-halophilic Bacteria, *Nature* 257, October 2, 398 - 400 (1975)

Messing R.A. and Oppermann R.A., Pore Dimensions for Accumulating Biomass, *Biotechnol. Bioeng.* 21, 49 - 58 (1979)

Messing R.A., Support-Bound Microbial Cells, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6, 167 - 178 (1981)

Miller L.T. and Thayer D.W., Influence of Substrate on the Amino Acid Profile and Macromolecular Composition of a *Brevibacterium* Species, *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1981 - 1994 (1979)

Miörner H., Johansson G. and Kronvall G., Lipoteichoic Acid is the Major Cell Wall Component Responsible for Surface Hydrophobicity of Group A Streptococci, *Infect. Immun.* 39, 336-343 (1983)

Momose H. and Takagi T., Glutamic Acid Production in Biotin-rich Media by Temperature-sensitive Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a Novel Fermentation Process, *Agric. Biol. Chem.* 42 (10), 1911 - 1917 (1978)

Monsan P., Optimization of Glutardialdehyde Activation of a Support for Enzyme Immobilization, *Journal of Molecular Catalysis* 3, 371 - 384 (1977)

Mosbach K. and Mosbach R., Entrapment of Enzymes and Microorganisms in Synthetic Cross-Linked Polymers and their Applications in Column Techniques, *Acta. Chem. Scand.* 20, 2807 - 2810 (1966)

Mozes N. and Rouxhet P.G., Methods of Measuring Hydrophobicity of Microorganisms, *Journal of Microbiol. Methods* 6, 99 - 112 (1987)

Mozes N., Marchal F., Hermesse M.P., Van Haecht J.L., Reuliaux L., Leonard A.J. and Rouxhet P.G., Immobilization of Microorganisms by Adhesion: Interplay of Electrostatic and Nonelectrostatic Interactions, *Biotechnol. Bioeng.* 30, 439 - 450 (1987)

Nakayama K., Amino Acids, Chapt. 17, in Prescott & Dunn's Industrial Microbiology (Reed G., ed.) Avi Publishing Comp., Westport, Conn. USA (1982)

Namikawa R., Okazaki H., Nakanishi K., Matsuno R. and Kamikubo T., Diffusion of Amino Acids and Saccharides in Solutions of Dextran and Its Derivatives, *Agric. Biol. Chem.* 41 (6), 1003 - 1009 (1977)

Nassenstein A., L-Isoleucinproduktion mit genetisch modifizierten Corynebakterien, Diplomarbeit RWTH Aachen, Institut IV (Mikrobiologie) (1987)

- Naumova I. B., Streshinskaya G. M., Agre N. S. and Kusnetsov V. D., Teichoic Acids of Actinomycetes: Structure and Regulatory Role in Cells, in Environmental Regulation of Microbial Metabolism (Kulaev I. S., Dawes E. A. and Tempest D. W., eds.) Academic press (1985)
- Navarro J.M. and Durand G., Modification of Yeast Metabolism by Immobilization onto Porous Glass, European J. Appl. Microbiol. 4, 243 - 254 (1977)
- Nguyen-Tien K., Patwari A.N., Schumpe A. and Deckwer W.-D., Gas-Liquid Mass Transfer in Fluidized Particle Beds, AIChE J. 31 (2), 194 - 201 (1985)
- Oishi K., Kim R., Aida K. and Uemura T., Control of Bacterial Respiration by Inorganic Orthophosphate, J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 301 - 314 (1970)
- Radke M., Schott Glaswerke Mainz, Persönliche Mitteilung (1987)
- Reiling H.E., Laurila H. and Fiechter A., Mass Culture of *Escherichia coli*: Medium Development for Low and High Density Cultivation of *Escherichia coli* B/r in Minimal and Complex Media, J. Biotechnol. 2, 191 - 206 (1985)
- Rittmann B.E. and McCarty P.L., Model of Steady-State-Biofilm Kinetics, Biotechnol. Bioeng. 22, 2343 - 2357 (1980)
- Robb I.D., Stereo-biochemistry and Function of Polymers, in Microbial Adhesion and Aggregation, Dahlem Konferenz Berlin 1984 (Marshall K.C. ed.), S. 39 - 49, Springer Verlag, Berlin (1984)
- Roberts R.B., Cowie D.B., Abelson P.H., Bolton E.T. and Britten R.J., Composition of the Cells; Fractionation and Hydrolysis, Chap. 2, in Studies of Biosynthesis in *Escherichia coli*, Carnegie Institution of Washington Publication 607, Washington (1955)
- Rogers H. J., Perkins H. R. and Ward J. B. eds., Microbial Cell Walls and Membranes, Chap. 7, Chapman and Hall, London, (1980)
- Rölla G., Inhibition of Adsorption: General Considerations, in Workshop on Microbial Aspects of Dental Caries (Stiles H. M., Loesche W J. and O'Brien T. O., eds.), 309 - 324 (1976)
- Rouxhet P.G., Mozes N., Hermesse M.P. and Matta-Ammouri G., Immobilization of Microorganisms by Adhesion to a Support: Influence of Physico-Chemical Factors, in Proc. 4th European Congress on Biotechnology 1987, Vol.2 (Neijssel O.M., van der Meer R.R. and Luyben K.C., eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1987)
- Rutter P.R. and Vincent B., Physicochemical Interactions of the Substratum, Microorganisms, and the Fluid Phase, in Microbial Adhesion and Aggregation, Dahlem Konferenz Berlin 1984 (Marshall K.C. ed.), Springer Verlag Berlin, 21 - 38 (1984)

Rutter P.R., The Physical Chemistry of the Adhesion of Bacteria and Other Cells, in Cell Adhesion and Mobility (Curtis A.S. and Pitts J.D., eds.), Cambridge University Press , 103 - 135 (1980)

Schellenberger A. und Selke R., Über die Decarboxylierung von α -Ketosäuren bei Gegenwart von Metallsalzen, J. prakt. Chem. 8 (4) 379 - 386 (1959)

Schinmyo A., Kimura H. and Okada H., Physiology of α -Amylase Production by Immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 14, 7 - 12 (1982)

Schubert H., Über den heutigen Stand der Randwinkelmessung an feinkörnigen Stoffen, in Veröffentlichung des Institutes für Boden- und Felsmechanik der Universität Karlsruhe (Leussink H. ed.) 35, 17 - 31 (1968)

Schügerl K., Bioreaktionstechnik Band 1, Otto Salle Verlag, Frankfurt a. M., Berlin (1985)

Schumpe A., Quicker G. and Deckwer W.D., Gas Solubilities in Microbial Culture Media, Advances in Biochemical Engineering 24, 1 - 38 (1982)

Schwengers D., Bestimmung des pH-Wertes von DEAE-Dextran in wässriger Lösung, der Säurezahl und des Gehaltes an Diethylaminoethylgruppen, Prüfvorschrift 0203, Pfeifer & Langen (1984)

Schwengers D., Pfeifer & Langen Dormagen, Persönliche Mitteilung (1987)

Shio I. and Ozaki H., Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-specific Glutamate-Dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a Glutamate-Producing Bacterium, J. Biochem. 68, 633 - 647 (1970)

Shio I. and Ujigawa-Takeda K., Presence and Regulation of α -Ketoglutarate-Dehydrogenase Complex in a Glutamate-Producing Bacterium, *Brevibacterium flavum*, Agric. Biol. Chem. 44 (8), 1897 - 1904 (1980)

Shio I., Mori M. and Ozaki H., Amino Acid Aminotransferases in an Amino Acid-Producing Bacterium, *Brevibacterium flavum*, Agric. Biol. Chem. 46 (12), 2967 - 2977 (1982)

Slowinski W. and Charm S.E., Glutamic Acid Production with Gel-Entrapped *Corynebacterium glutamicum*, Biotechnol. Bioeng. 15, 973 - 979 (1973)

Sontheimer H., Spindler P. und Rohmann U., Wasserchemie für Ingenieure, DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (1980)

Stanier R.Y., Adelberg E.A. and Ingraham J.L., in General Microbiology, Macmillan Press Ltd., London, G.B. (1976)

Sundberg L. and Porath J., Preparation of Adsorbents for Biospecific Affinity Chromatography: Attachment of Group-Containing Ligands to Insoluble Polymers by Means of Bifunctional Oxiranes, Journal of Chromatography 90, 87 - 98 (1974)

Szabo K., Ha N.L., Schneider P., Zeltner P. and Kovats E., Monofunctional (Dimethylamino)silane as Silylating Agent, *Helvetica Chimica Acta* 67, 2128 - 2142 (1984)

Tachiki T. and Tochikura T., Glutamine, Chapt. 11, in *Biotechnology of Amino Acid Produktion* (Aida K., Chibata I., Nakayama K., Takinami K. and Yamada H., eds.) Kodansha, Tokyo (1986)

Tayot J.L., Holmgren J., Svennerholm L., Lindblad M. and Tardy M., Receptor-Specific Large-Scale Purification of Cholera Toxin on Silica Beads Derivatized with LysoG_{M1} Ganglioside, *Eur. J. Biochem.* 113, 249 - 258 (1981)

Tempest D.W. and Neijssel O.M., The Utility of Chemostat Cultures in Studies of Microbial Physiology, *Advances in Biotechnology I, Proc. 6th Int. Ferment. Symp.* London, Canada, 185 - 190 (1980)

Thonart P., Custinne M. and Paquot M., Zeta Potential of Yeast Cells: Application in Cell Immobilization, *Enzyme Microbiol. Technol.* 4, 191 - 194 (1982)

Tsuchida T., Yoshinaga F., Kubota K., Momose H. and Okumura S., Cultural Conditions for L-Leucine Production by Strain No. 218, a Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256, *Agr. Biol. Chem.* 39, 1149 - 1153 (1975)

Unger K.K., Becker N. and Roumeliotis P., Recent developments in the Evaluation of Chemically Bonded Silica Packings for Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography* 125, 115 - 127 (1976)

Van Loosdrecht M.C., Lyklema J., Norde W., Schraa G. and Zehnder A.J., The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion, *Appl. and Environ. Microbiol.* 53, 1893 - 1897 (1987a)

Van Loosdrecht M.C., Lyklema J., Norde W., Schraa G. and Zehnder A.J., Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity as a Measure to Predict the Initial Steps of Bacterial Adhesion, *Appl. and Environ. Microbiol.* 53, 1898 - 1901 (1987b)

Venkatasubramanian K. and Karkare S.B., Process Engineering Considerations in the Development of Immobilized Living Cell Systems, Chap. 8 in *Immobilized Cells and Organelles*, Vol.2 (Mattiasson B. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida 133 - 144 (1983)

Venkatasubramanian K., Karake S.B. and Vieth W.R., Chemical Engineering Analysis of Immobilized-Cell Systems, in *Applied Biochemistry and Bioengineering, Immobilized Microbial Cells*, Vol. 4 (Wingard L.B., Goldstein L. and Katchalski-Katzir E. eds.), 311 - 349 (1983)

Verax, The Future of Large Scale Continuous Cell Culture is Here, *Firmenschrift* (1987)

Vijayalakshmi M., Macipar A., Segard E. and Broun G.B., Matrix-Bound Transition Metal Continuous Fermentation Tower Packing, *Annals N.Y. Acad. Sc.* 326, 249 - 254 (1979)

Voss H., Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, DDR, persönliche Mitteilung (1987)

Wada M., Uchida T., Kato J. and Chibata I., Continuous Production of L-Isoleucine Using Immobilized Growing *Serratia marcescens* Cells, *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1175 - 1188 (1980)

Wandrey C., Wichmann R., Leuchtenberger W., Kula M.-R. und Bückmann A.F., Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Umwandlung von wasserlöslichen α -Ketocarbonsäuren in die entsprechenden Aminosäuren, Amerikanisches Patent US 4.304.858 (1981)

Ward J. B., Teichoic and teichuronic acids: Biosynthesis, Assembly and Location, *Microbiol. Rev.* 45, 221-243 (1981)

Wedler G., Lehrbuch der Physikalischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim (1982)

Weetall H.H. and Filbert A.M., Porous Glass for Affinity Chromatography Applications, *Methods in Enzymology* 34, 59 - 72 (1974)

Weetall H.H., Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Material, in *Methods in Enzymology* 44, 134 - 148 (1976)

Wichmann R., Application of Centrifugal Separation and Crossflow Microfiltration Cells Retention in Continuous Fermentative Production of L-Amino Acids, Vortragsmanuskript für "Conference on Recovery of Biological Products", 17 - 22 April (1988)

Wichmann R., Wandrey C. und Berke J., Kontinuierliche, mikrobielle Herstellung von L-Leucin mit Zellrückhaltung, Vortragsmanuskript GVC-Jahrestreffen Freiburg 1987, eingereicht bei BTF-Biotech-Forum (1988)

Wicken A. J., Bacterial Cell Walls and Surfaces, in *Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance* (Savage D. C. and Fletcher M., eds.), Chap. 2, Plenum Press, New York (1985)

Wicken A.J. and Knox K.W., Bacterial Cell Surface Amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta* 604, 1 - 26 (1980)

Wuhrmann K., Microbial Aspects of Water Pollution Control, *Adv. Appl. Microbiol.* 6, 119 - 151 (1964)

Yoshinaga F. and Nakamori S., Production of Amino Acids, Chap. 22 in *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation* (Herrmann K.M. and Somerville R.L. eds.), Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts (1983)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 2 der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ch. Wandrey für die Überlassung des interessanten Themas, für die Übernahme des Coreferates, für die freundliche Unterstützung und die große Freiheit, die in allen Belangen gewährt wurde.

Herrn Prof. Dr. H. Märkl danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Hauptreferates.

Herrn Prof. Dr. P. Rouxhet und Frau Dr. N. Mozes bin ich für die ausgezeichnete Kooperation und große Diskussionsbereitschaft besonders dankbar.

Herr M. Radke von der Firma Schott stellte freundlicherweise das Sinterglasmaterial, Herr Dr. Leuchtenberger von der Firma Degussa die α -Ketoisocaproinsäure zur Verfügung.

Herr Dr. U. Gröger führte mich mit Geduld und Hilfsbereitschaft in die faszinierende Mikrobiologie der Corynebakterien ein.

Herr Dr. B. Mütze betreute mit viel Einsatz den Aminosäureanalysator.

Herr W. Nöthen und Herr H. Majer führten die Bestimmungen der α -Ketoisocaproinsäure mittels HPLC durch.

Frau H. Haase war an verschiedensten analytischen Arbeiten beteiligt.

Frau Ch. Zurhelle und Frau W. Steffens waren als Auszubildende, Frau S. Horbach, Frau C. Weber, Frau G. Huckfeld, Frau H. Spitze, Herr T. Bretschneider und Herr H.-P. Neidhardt als studentische Hilfskräfte bei den experimentellen und analytischen Arbeiten behilflich.

Von Frau U. Mackfeld und Frau M. Jonas wurde ich bei der Anfertigung der Abbildungen unterstützt.

Herr U. Kragl sah Text und Darstellung kritisch durch.

Weiterhin gilt mein aufrichtiger Dank allen weiteren Angehörigen der Institute für Biotechnologie der KFA, die durch ihre Hilfe und ihr Interesse am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren.

Frau G. Bockholt danke ich für ihre Unterstützung und viele Denkanstöße.

