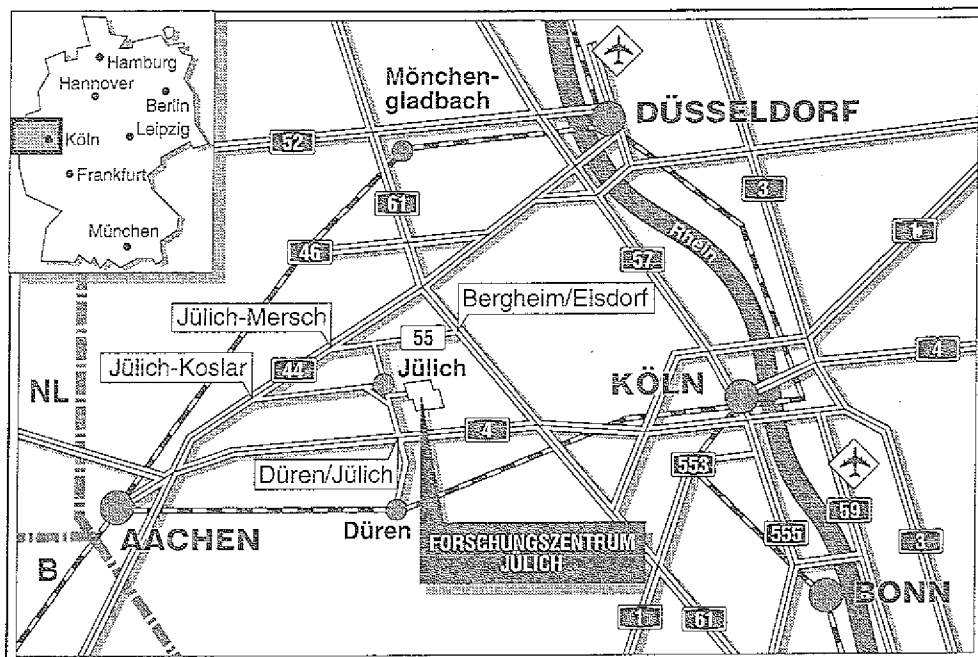


Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zum Einfluß von
Ethanol auf den Stoffwechsel
von *Zymomonas mobilis***

Monica Hermans



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2644

ISSN 0366-0885

Institut für Biotechnologie Jül-2644

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 024 61 / 61-61 02 · Telefax: 024 61 / 61-61 03 · Telex: 833 556-70 kfa d

1. The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process.

2. The second part of the paper presents the methodology used in the study. It details the data collection methods, the sample size, and the statistical techniques employed to analyze the data.

3. The third part of the paper discusses the results of the study. It presents the findings of the research and compares them with the existing literature. The results show that there is a significant difference between the two groups.

4. The fourth part of the paper discusses the conclusions of the study. It summarizes the main findings and provides recommendations for future research. The study concludes that the results are significant and that further research is needed to confirm the findings.

1. The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process.

2. The second part of the paper presents the methodology used in the study. It details the data collection methods, the sample size, and the statistical techniques employed to analyze the data.

3. The third part of the paper discusses the results of the study. It presents the findings of the research and compares them with the existing literature. The results show that there is a significant difference between the two groups.

4. The fourth part of the paper discusses the conclusions of the study. It summarizes the main findings and provides recommendations for future research. The study concludes that the results are significant and that further research is needed to confirm the findings.

1. The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process.

2. The second part of the paper presents the methodology used in the study. It details the data collection methods, the sample size, and the statistical techniques employed to analyze the data.

3. The third part of the paper discusses the results of the study. It presents the findings of the research and compares them with the existing literature. The results show that there is a significant difference between the two groups.

4. The fourth part of the paper discusses the conclusions of the study. It summarizes the main findings and provides recommendations for future research. The study concludes that the results are significant and that further research is needed to confirm the findings.

Untersuchungen zum Einfluß von Ethanol auf den Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis*

Monica Hermans

1. ~~Handwritten text, mostly illegible due to blurring.~~

Handwritten text, possibly a signature or date.

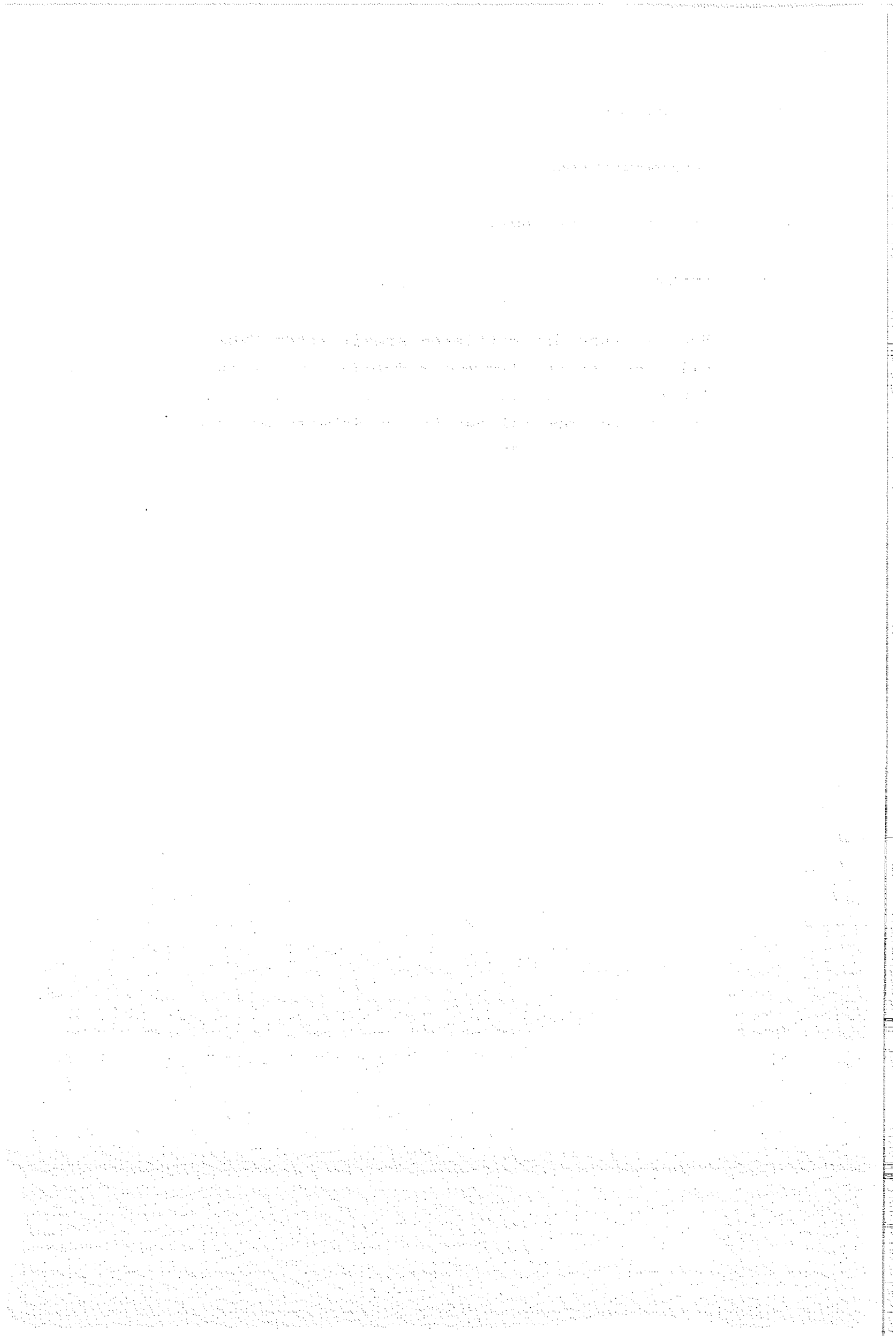
Extremely faint, illegible handwritten text covering the bottom half of the page.

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	8
1.	Chemikalien.....	8
2.	Organismen.....	8
3.	Nährmedien.....	9
4.	Kulturbedingungen.....	10
4.1.	Stammhaltung und Vorkulturen.....	10
4.2.	Kontinuierliche Fermentationen.....	10
5.	Bestimmung des Bakterienwachstums.....	12
6.	Substrat- und Produktbestimmungen im Kulturfiltrat....	13
6.1.	Glukosebestimmung.....	13
6.2.	Bestimmung von Glycerin, Dihydroxyaceton und Laktat.....	13
6.3.	Gaschromatografische Bestimmung von Ethanol, Acetat und Acetoin.....	13
7.	Ermittlung der CO ₂ -Bildungsrate.....	14
8.	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	15
8.1.	Herstellung von Permeabilisierten Zellen, Rohextrakt und Membranfraktionen.....	15
8.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	16
8.3.	Enzymmessungen.....	17
9.	Bestimmung der Zellinternen Glukosekonzentration.....	21
9.1.	Silikonölzentrifugation.....	21
9.2.	Bestimmung des Cytoplasmavolumens.....	22
10.	Bestimmung des zellinternen pH-Wertes.....	23
11.	Bestimmung der intrazellulären Adeninnucleotide.....	24
12.	Charakterisierung des Bakterien Wachstums.....	26
12.1.	Bestimmung der Zellgrößenverteilung.....	26
12.2.	Bestimmung der spezifischen Dichte.....	27
12.3.	Bestimmung der makromolekularen Zusammensetzung und des Phosphatgehalts von <i>Zymomonas mobilis</i> ...	27
13.	Analyse der Lipide.....	29
13.1.	Lipidextraktion.....	29
13.2.	Bestimmung der Hopanoide THBH, THBH-Ether und THBH-Glykosid mittels HPLC.....	30

13.3. Bestimmung der Hopanoide Hopan und Diplopterol mit GC.....	31
13.4. Bestimmung von Phospholipide.....	32
13.5. Fettsäurenbestimmung.....	33
14. Isolierung der Phospholipide aus <i>Zymomonas mobilis</i>	34
15. Charakterisierung der lateralen Lipidpackung mit Monoschicht Methoden.....	35
III. ERGEBNISSE.....	37
1. Fermentationskinetik von <i>Zymomonas mobilis</i> in kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen.....	37
1.1. Einfluß von verteilter Zufütterung der Glukose auf Fermentationsparameter und Nebenproduktbildung.....	37
1.2. pH Optimum der ersten Stufe.....	42
1.3. Die maximal erreichbare Ethanolkonzentration in zweistufigen Fermentationen.....	43
1.4. Einfluß von Ethanol auf die zellinternen Glukosekonzentration.....	50
2. Einfluß hoher Ethanolkonzentrationen auf die Physiologie von <i>Zymomonas mobilis</i>	53
2.1. Einfluß hoher Ethanolkonzentrationen auf den zellinternen pH und Energy Charge	53
2.2. Katabole Kapazität und Lebensfähigkeit von Zellen der zweiten Stufe.....	58
2.3. Kurzzeiteffekte hoher Ethanolkonzentrationen auf das Wachstum von <i>Zymomonas mobilis</i>	60
2.4. Charakterisierung des Wachstums von <i>Zymomonas mobilis</i> bei 80 - 100 g/l Ethanol.....	64
2.5. Charakterisierung der Biosynthese von <i>Zymomonas mobilis</i> bei 80 - 100 g/l Ethanol.....	67
3. Untersuchungen zur Bedeutung der Hopanoide in <i>Zymomonas mobilis</i>	72
3.1. Einfluß der Wachstumsbedingungen auf Hopanoidgehalt und -Zusammensetzung.....	72
3.2. Untersuchungen zur lateralen Lipidpackung von Gesamtlipiden und Phospholipiden aus <i>Zymomonas mobilis</i>	77

IV.	DISKUSSION.....	83
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
VII.	ANHANG.....	112
1.	Modellierung der mittleren spezifischen Ethanol- bildungsrate von <i>Zymomonas mobilis</i> in der zweiten Stufe.....	112
2.	Einfluß von oberflächenaktiven Substanzen in der Subphase auf den Anstieg des Filmdrucks bei Mono- schichtuntersuchungen.....	114



Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	American Type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
D	Durchflußrate
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
HEPES	Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatographie
K_i	Inhibitorkonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
NAD(H)	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
OD	optische Dichte
PPI	Pyrophosphat
Q_e	spezifische Ethanolbildungsrate (g/g*h)
Q_s	spezifische Glukoseverbrauchsrate (g/g*h)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
THBH	Tetrahydroxybacteriohopan
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
Upm	Umdrehungen pro Minute

I. Einleitung

Seit den 70-er Jahren findet die fermentative Herstellung von Ethanol als Energieträger und industrieller Rohstoff großes Interesse (Lynd et al. 1991, Piepenbrock und Perl 1988). Um die mikrobielle Ethanolerzeugung möglichst wirtschaftlich durchführen zu können, konzentrieren sich Forschung und Entwicklung auf Steigerung der Ausbeute, Produktkonzentration und volumetrische Produktivität (Herrero 1983, Piepenbrock und Perl 1988, Lynd et al. 1991). Traditionell erfolgte die mikrobielle Ethanolproduktion mit Hilfe von Hefen wie *Saccharomyces*- *Torula*- oder *Kluyveromyces*-Arten (Castillo 1982, Phaff 1984). In den letzten Jahren gewann die Fermentation mit dem Bakterium *Zymomonas mobilis* jedoch zunehmende Aufmerksamkeit (Rogers et al. 1982, Baratti und Bu'lock 1986, Godia et al. 1987, Sahm und Bringer-Meyer 1987).

Zymomonas mobilis ist ein gram-negatives Bakterium, das in den tropischen Gebieten Amerikas, Asiens und Afrika an der Fermentation von zuckerhaltigen Pflanzensäften beteiligt ist (Swings und de Ley 1977). Es ist obligat anaerob, jedoch aerotolerant und kann nur auf Glukose, Fruktose oder Saccharose wachsen. Diese Zucker werden über den Entner-Doudoroff-Weg zu Pyruvat und weiter zu Ethanol und CO_2 abgebaut (Gibbs und DeMoss 1951, 1954, Swings und de Ley 1977). Der Entner-Doudoroff-Weg kommt hauptsächlich in strikt aeroben Mikroorganismen vor und liefert nur 1 mol ATP pro mol umgesetzte Monosaccharide (Gottschalk 1986).

Im Vergleich zur Hefe *Saccharomyces cerevisiae* weist dieses Bakterium für die Ethanolproduktion folgende Vorteile auf (Rogers et al. 1982, Sahm und Bringer-Meyer 1987, Beavan et al. 1989):

- Die Ethanolausbeute ist um 5 % höher, da *Z. mobilis* weniger Glukose in Zellmaterial einbaut und weniger Nebenprodukte bildet (Amin et al. 1983).
- Die spezifische Ethanolbildungsrate ist mindestens 2 - 4 mal höher.
- Die Wachstumsrate in 25 % (w/v) Glukose ist etwa doppelt so hoch.
- Die Prozeßführung ist einfacher, da das Bakterium keinen Sauerstoff für das Wachstum benötigt.

Zymomonas mobilis zeichnet sich weiterhin durch hohe Zucker- und Ethanoltoleranz aus. Das Bakterium kann in Glukosekonzentrationen bis zu 40 % (w/v) wachsen (Swings und de Ley 1977, Kluyver und Hoppenbrouwers 1931). Diese Toleranz ist nach Struch et al. (1991) durch eine sehr schnelle Glukoseaufnahme mittels erleichterter Diffusion bedingt. In Batchfermentationen können deshalb hohe Glukosekonzentrationen (10 - 25 % (w/v)) effizient und schnell über den Entner-Doudoroff-Weg zu Ethanol umgesetzt werden. Die Wachstumsrate nimmt dabei jedoch mit steigender Glukosekonzentration ab und die lag-Phase verlängert sich bis über 10 Stunden (Rogers et al. 1982, Struch et al. 1991). Die Reduzierung der Wachstumsrate durch hohe Glukosekonzentrationen wird durch hohe Ethanolkonzentrationen noch verstärkt (Carey und Ingram 1983).

Die ausgeprägte Ethanoltoleranz ermöglicht in Batchfermentation die Bildung von bis zu 127 g/l Ethanol (Rogers et al. 1982). Die Akkumulation von Ethanol während der Fermentation führt jedoch zu einer Abnahme der Wachstumsrate, der spezifischen Ethanolbildungsrate und folglich der volumetrischen Ethanolproduktivität (Rogers et al. 1982, Schmid 1985). Die Mechanismen hierfür sind noch ungeklärt. Dabei wird das Wachstum stärker als die Ethanolbildung gehemmt (Lee und Rogers 1983, Jöbses et al. 1986). Die maximale Wachstumsrate von *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 als Funktion der Ethanolkonzentration wurde von Jöbses und Roels (1986) in kontinuierlicher, turbidostatistischer Kultur ermittelt. Zwischen 2 und 50 g/l Ethanol nahm die Wachstumsrate linear um die Hälfte ab und ab 72 g/l Ethanol war kein exponentielles Wachstum mehr möglich (Jöbses und Roels 1986). Für *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 und ATCC 31821 wurden vergleichbare Werte ermittelt (Rogers et al. 1982, Schmid 1985, Stevnsborg und Lawford 1986). In kontinuierlicher Fermentation wird die maximal erreichbare Ethanolkonzentration deswegen von der Inhibierung des Wachstums durch Ethanol begrenzt (Jöbses et al. 1985, Weuster 1991).

Um das Ausmaß der Produktinhibierung zu verringern wurden Verfahren entwickelt, bei denen das gebildete Ethanol während der Fermentation mittels Vakuumdestillation (Lee et al. 1981), Destillation (Weuster 1991) bzw. Extraktion des Ethanols über Per-

vaporationsmembranen (Calibo et al. 1989) oder mit Lösungsmitteln (Bruce et al. 1991) aus der Kultur abgetrennt wird. Eine technisch relativ einfache und deswegen interessante Alternative zur Produktabtrennung ist die Kaskadierung der Fermentation in Stufen mit unterschiedlichen Kulturbedingen (Ghose und Tyagi 1979, Moser 1985, Ryu et al. 1982, Lee et al. 1983, Maiorella 1985). In den ersten Stufen der Kaskade herrschen unter Substratsättigung und bei geringer Ethanolkonzentration maximale Wachstums- und Ethanolbildungsrate. In den letzten Stufen werden, trotz zunehmender Produktinhibierung, Substratumsätze $> 99\%$ erreicht. Zwei in Serie geschaltete Rührkessel stellen die einfachste Ausführung einer Kaskade dar. Da das Effluent der ersten Stufe außer Ethanol kontinuierlich neue Biomasse in die zweite Stufe einträgt, können vergleichsweise hohe Ethanolkonzentrationen erreicht werden. Für *Zymomonas mobilis* liegen Experimente zur kontinuierlichen Bildung von 100 g/l Ethanol in Labor- (Charley et al. 1983) und Pilotmaßstab vor (Lawford et al. 1984). Die Volumenverhältnisse der zwei Stufen wurden von Posten (1987) mathematisch optimiert. Dabei wurde jedoch der Einfluß der Kulturbedingungen in den einzelnen Stufen mit hohen Glukose- oder Ethanolkonzentrationen auf die Physiologie und Fermentationskinetik von *Zymomonas mobilis* nicht berücksichtigt. Über die maximal erreichbare Ethanolkonzentration in der zweistufigen Anlage liegen ebenfalls noch keine Daten vor.

Als Ursachen der vollständigen Wachstumsinhibierung durch Ethanol werden in der Literatur Energiemangel, Inhibierung der anabolen Vorgänge oder Kofaktorverlust durch Permeabilisierung diskutiert. Die Hypothese des Energiemangels wurde bis jetzt bevorzugt, da der Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis* wegen der geringen ATP Ausbeute auch bei sehr geringen Ethanolkonzentrationen als energielimitiert betrachtet wird (Gottschalk 1986, Thauer 1977). Zudem wurde bei steigenden Ethanolkonzentrationen eine Abnahme der spezifischen Glukoseverbrauchsrate, und damit der spezifischen ATP-Bildungsrate beobachtet (Rogers et al. 1982, Jöbses et al. 1985, Posten 1987, Weuster 1991). Gleichzeitig nahm der Maintenance-Energieverbrauch zu (Fieschko und Humpfrey 1983, Beyeler et al. 1984, Jöbses et al. 1987). Es wird daher vermutet, daß bei Ethanolkonzentrationen um 70 g/l der ATP-Ver-

brauch für Maintenance so hoch ist, daß für Wachstum kein ATP mehr zur Verfügung steht.

Im Gegensatz zum Katabolismus sind Transportsysteme, anabole Stoffwechselwege sowie deren Inhibierung durch Ethanol in *Zymomonas mobilis* bislang wenig untersucht worden. Lediglich eine irreversibele Desaktivierung der PEP-Carboxylaseaktivität nach *in vitro* Inkubation in 10 % (w/v) Ethanol ist bekannt (Bringer und Sahm 1989). Für *E.coli* wurde zum Beispiel noch die Inhibierung der Phosphatidylethanolaminsynthese durch Ethanol beschrieben (Ingram 1977, Ingram und Buttke 1984).

Kofaktor- und Metabolitverlust wurde von Ingram (1986) als Mechanismus für die Inhibierung der Fermentation durch Ethanol postuliert. Mit *Z. mobilis* beobachteten Osman und Ingram (1985) bei Ethanolkonzentrationen zwischen 0 und 100 g/l einen dosisabhängigen Verlust von Mg^{2+} -Ionen und Adenosinnucleotiden aus der Zelle, während gleichzeitig die Ethanolbildungsrate abnahm. Dieser Kofaktor- und Metabolitverlust würde ebenfalls die Wachstumsinhibierung durch steigende Ethanolkonzentrationen erklären.

Viele der beobachteten Effekte und Inhibierungen können durch die Wirkung des Ethanols auf die Zellmembran erklärt werden (Ingram und Buttke 1984, Michaelis und Michaelis 1983, Hoek und Taraschi 1988). Das amphiphile Ethanolmolekül kann sich in der Membran einlagern (Kreishmann et al. 1985) und beeinflusst den physikochemischen Zustand in den hydrophoben und hydrophilen Regionen auf mehrfache Weise. In dem hydrophoben Membrankern führt Ethanol zu einer Reduzierung des Ordnungsgrades (Fluidisierung), einer Abnahme der van der Waals-Wechselwirkungen und einer Zunahme der Polarität (Chin und Goldstein 1977, Michaelis und Michaelis 1983, Ingram und Buttke 1984, Hitzeman et al. 1986). Zwischen den hydrophilen Kopfgruppen nimmt bei steigenden Ethanolkonzentrationen die Coulombsche Wechselwirkung zu, was einerseits zu Deionisierung und andererseits zu zunehmender Abstoßung zwischen den polaren Lipidköpfen führt (Ingram und Buttke 1984). Außerdem wurden ab 50 - 60 g/l Ethanol der Übergang zur "interdigitated Gelphase" beobachtet, was eine Verkürzung der hydrophoben Region bedeutet (Rowe 1983, Rauh 1987, Ohki et al. 1990).

Die Aktivitäten membrangebundener und membranassoziierter Enzyme werden von diesen Effekten in einigen Fällen stimuliert (Rabin et al. 1986, Rosa und Sá-Correia 1992), jedoch zumeist inhibiert (Michaelis und Michaelis 1983). Zudem nimmt die passive Permeabilität der Membran mit steigender Ethanolkonzentration durch die Expansion und Fluidisierung zu, so daß für den Stoffwechsel relevante Moleküle der Zelle verloren gehen (Bernheim 1978, Leao und van Uden 1984, Ingram und Buttke 1984, Osman und Ingram 1985, Jones und Greenfield 1987, Chen und Engel 1990).

Viele Mikroorganismen ändern bei steigender Ethanolkonzentration in der Kultur die Lipidzusammensetzung der Membran, um diesen physikochemischen Effekten entgegenzuwirken (Ingram 1977, 1986). In der Regel wird hierbei die mittlere Kettenlänge der inkorporierten Fettsäuren erhöht, so daß die hydrophobe Region der Membran verlängert wird. Oft nimmt der Anteil an mono-ungesättigten Fettsäuren gleichzeitig zu. In *S. cerevisiae* und *E. coli* zum Beispiel kann der Anteil an mono-ungesättigten 18:1 Fettsäuren in der Phospholipidfraktion auf Kosten der Palmitinsäure (16:0) bis auf mehr als 50 % zunehmen (Ingram 1976, Clark et al. 1979, Ingram et al. 1980 a,b, Beavan et al. 1982). Der sehr ethanoltolerante *Lactobacillus heterohiochii* inkorporiert bei steigender Ethanolkonzentration vermehrt die langkettigen C-20, C-30 und Cyclopropanfettsäure (Uchida 1974, Tanigawa und Umezu 1979). Weiterhin kommen Sterole Bedeutung bei der Stabilisierung der Hefezellmembran in Anwesenheit von Ethanol zu (Hayashida und Ohta 1978, Mishra und Kaur 1991).

Für *Zymomonas mobilis* wurde bei steigender Ethanolkonzentration keine Änderung der Fettsäurezusammensetzung beobachtet (Carey und Ingram 1983). Die Phospholipidfraktion in *Zymomonas mobilis* enthält jedoch konstitutiv zu 70 % *cis*-Vaccensäurereste (18:1) (Carey und Ingram 1983, Tornabene et al. 1982, Barrow et al. 1983, Bringer et al. 1985), was die Anpassung dieses Bakteriums an Ethanol zeigt. Zudem sind Hopanoide in der Membran eingebaut (Tornabene et al. 1982, Barrow et al. 1983, Tahara et al. 1988), die wahrscheinlich zur ausgeprägten Ethanoltoleranz von *Z. mobilis* beitragen (Bringer et al. 1985, Schmidt et al. 1986).

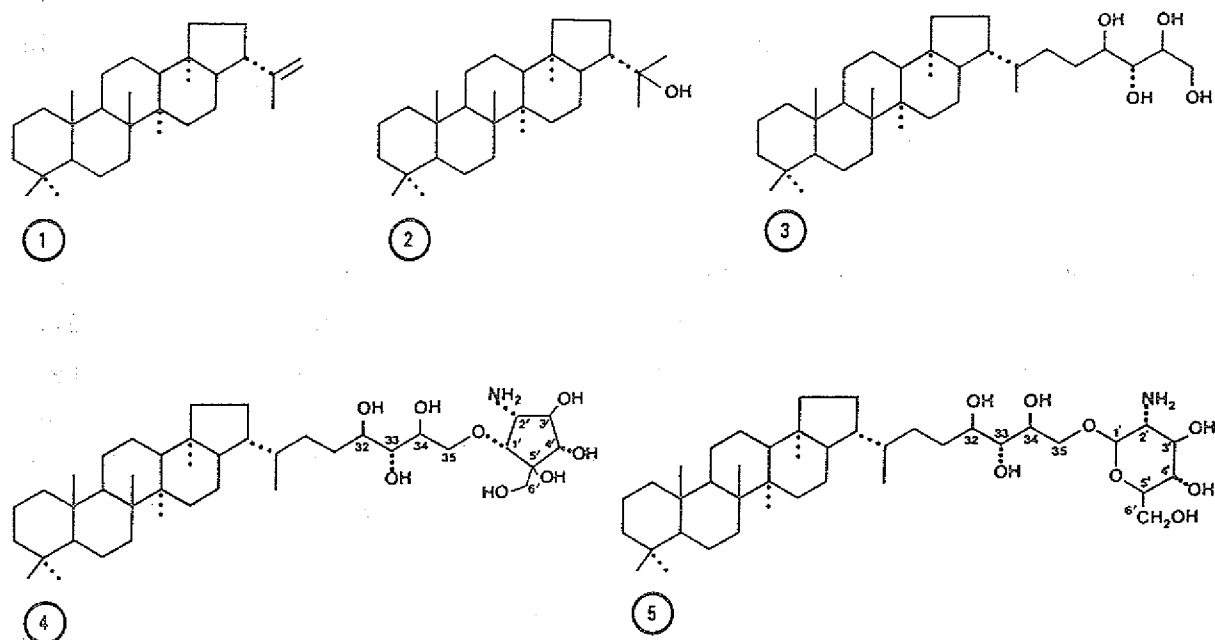


Abb. 1: Die Hopanoide in *Zymomonas mobilis*.

1 Hopen; 2 Diplopterol; 3 Bacteriohopantetrol; 4 Bacteriohopantetrol-Ether; 5 Glucosaminyl-Bacteriohopantetrol

Die Hopanoide bilden eine Gruppe pentacyclischer Triterpenoide, die unter den Prokaryoten weit verbreitet ist (Rohmer et al. 1984). Allen Hopanoiden ist eine rigide, planare und apolare Fünfringstruktur gemein. Viele Derivate haben eine polare Seitenkette und können als amphiphile Moleküle in der Phospholipidmembran integriert werden. In *Zymomonas mobilis* wurden bisher sechs verschiedene Derivate nachgewiesen. Die einfachsten Derivate, Hopen und Diplopterol, wurden nur in kleinen Mengen detektiert (Barrow et al. 1983). Die C35-Hopanoide, Bacteriohopantetrol, Glucosaminylbacteriohopantetrol und Bacteriohopantetrol-ether, bilden die Hauptfraktion der Hopanoide in *Zymomonas mobilis* (Abb. 1, Bringer et al. 1985, Tahara et al. 1986, Flesch 1987). Außerdem wurden geringe Mengen des Glucosaminyloxobacteriohopantetrols gefunden (Flesch und Rohmer 1989).

Strukturell weisen die Hopanoide große Ähnlichkeit mit den Steroiden auf, und es wurde postuliert, daß ihnen in Prokaryonten eine entsprechende Funktion wie den Steroiden in Eukaryonten zukommt (Rohmer et al. 1979, Poralla 1982). Aus Monoschichtversuchen sowie Kalorimetrie-, ESR-, NMR- und Fluoreszenzdepolarisations-Studien an Vesikeln ist bekannt, daß Cholesterol eine fluiditätsmodulierende Wirkung auf Phospholipidmembranen ausübt: flüssiganaloge Lipide werden kondensiert, festanaloge Lipide fluidisiert und Phasenübergänge geschwächt oder ganz gelöscht (Demel und De Kruffy 1976, Albrecht et al. 1981, Kannenberg 1983). Bei Kondensation werden die Lipide in der Membran dichter gepackt, so daß Verteilungskoeffizienten und Permeabilität für hydrophile und hydrophobe Substanzen reduziert und die Stabilität der Membran erhöht wird (Demel und De Kruffy 1976, Korten et al. 1980, Bissere et al. 1983, Antunes-Madeira und Madeira 1983, De Young und Dill 1988).

Hinweise für eine ähnliche Wirkung der Hopanoide in der Bakterienmembran kommen aus Versuchen mit den Derivaten Tetrahydroxybacteriohopan (THBH) und Diplopterol. THBH konnte Temperaturintervalle von Phasenübergängen verbreitern und Monoschichten flüssiganaloger Phospholipide kondensieren (Kannenberg et al. 1980, 1985). In Vesikeln wurde eine membranstabilisierende Wirkung des THBH beobachtet (Bissere et al. 1983). Zudem reduzierte Diplopterol die Permeabilität und erhöhte die Stabilität von Liposomen (Benz et al. 1983, Kannenberg et al. 1985).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß der Kulturbedingungen auf die Fermentationskinetik von *Zymomonas mobilis* in zweistufigen kontinuierlichen Fermentationen zu untersuchen und die produktivitäts- und wachstumslimitierenden Einflüsse von Ethanol auf den Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis* kinetisch und physiologisch zu charakterisieren.

Weil den Hopanoiden Bedeutung für die Ethanoltoleranz von *Zymomonas mobilis* zugeschrieben wird, wurde auch der Einfluß von Kulturbedingungen auf den Gehalt und die Zusammensetzung der Hopanoide, sowie deren physiko-chemisches Verhalten in Monoschichten untersucht.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet. Enzyme, Cofaktoren und phosphorylierte Substrate waren von Boehringer GmbH, Mannheim. Produkte anderer Hersteller sind nachfolgend aufgeführt.

Silikonöl (d = 1.050)	Aldrich-Chemie, Steinheim
[U- ¹⁴ C]-Maltose	Amersham Buchler GmbH & Co. KG,
[U- ¹⁴ C]-Taurin	Braunschweig
³ H ₂ O	
N,O-Bis-(trimethylsilyl-) trifluoracetamid	Chromatographie-Service, Eschweiler
(BSTFA)/Trimethylsilylchlorid 99/1	
Fettsäuremethylestermischung	
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Hefeextrakt	
[7- ¹⁴ C]-Benzoat	NEN Division, Dreieich
D-Glukosemonohydrat	Fluka AG, Buchs (CH)
Traubenzucker (D-Glukosemonohydrat)	NIO Nahrungsmittel GmbH, Heilbronn
Percoll	Pharmacia, Uppsala (Sw)
Baysilonöl PH 300 (d = 1.03)	Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Berberinchlorid	
1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure (ANSA)	Serva Feinbiochimica, Heidelberg
Rinderserumalbumin	
Diazoresorcinol (Resazurin)	
Dodecylsulfat, Natriumsalz	
Glycylglycin	
MES	
HEPES	
Pantothenat	Sigma GmbH, München
Maltose	
Triethanolamin	
5-Methylresorcinol (Orcinol)	
n-Triacontan	
Phosphatidylcholin	
Phosphatidylethanolamin	
Phosphatidylglycerin	
Phosphatidylserin	
Cardiolipin	
CCCP	
DCCD	
Luciferin/Luciferase	

2. Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurde *Zymomonas mobilis ssp. mobilis* ATCC 29191 (ZM 6) verwendet. Zum Vergleich wurden einige Versuche mit *Zymomonas mobilis ssp. mobilis* ATCC 31821 (ZM 4) durchgeführt.

3. Nährmedien

Die Kultivierung von *Zymomonas mobilis* erfolgte in Vollmedium, wenn im Text nicht anders vermerkt. Das Vollmedium hatte folgende Zusammensetzung :

Vollmedium (Bringer et al. 1984)

Hefeextrakt	5	g	
KH_2PO_4	1	g	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	g	
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.5	g	
Glukose, variierend	10-200	g	
Aqua dest.	ad 1000	ml	pH = 5.0

Bei einer Glukosekonzentration von mehr als 50 g/l wurde die Glukose getrennt autoklaviert und steril zugegeben. Das Medium zur Herstellung von Agarplatten enthielt 20 g/l Glukose als C-Quelle und zusätzlich 2 % (w/v) Bacto-Agar. Bei Batchfermentationen ohne pH-Regelung wurde das Vollmedium mit 0.1 M MES/KOH (pH = 6.0) gepuffert. Zur Kontrolle der anaeroben Bedingungen wurde pro l Medium 1 ml einer 0.1 % (w/v) Resazurinlösung zugesetzt (Ljungdahl und Wiegel 1986). Das Medium wurde vor dem Autoklavieren durch Begasung mit Argon anaerobisiert.

Um die Fähigkeit zur Aminosäurenbiosynthese bei Ethanolkonzentrationen ≥ 80 g/l zu untersuchen, wurde zur Kultivierung Minimalmedium mit folgender Zusammensetzung verwendet :

Minimalmedium (Fein et al. 1983, modifiziert)

KH_2PO_4	3.5	g	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	g	
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1	g	
Trinatriumcitrat $\times \text{H}_2\text{O}$	0.2	g	
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.01	g	
MES	19.5	g	
Glukose	20	g	
Vitaminlösung	10	ml	
Aqua dest.	ad 1000	ml	pH = 6.0

Die Vitaminlösung mit je 0.1 mg/ml Ca-Pantothenat und Biotin in Aqua dest. wurde über einen Einwegfilter (0.2 μ m, Schleicher und Schüll) steril filtriert und erst nach dem Autoklavieren dem Nährmedium zugegeben.

4. Kulturbedingungen

Für Stammhaltung, Vorkulturen und Batchfermentationen wurden 25 ml Bellco-Röhrchen (Bellco-Glass Inc., New Jersey, USA), 100 ml Flaschen, 200 ml-Zweihalskolben bzw. 2 l-Zweihalskolben (Glasbläserei, KFA Jülich) verwendet. Alle Gefäße wurden mit Butylgummi-Stopfen und Aluminiumbördelkappen verschlossen. Kulturen, die mehr als 20 g/l Glukose enthielten, wurden zur Entgasung des gebildeten CO₂ mit sterilen Einwegfiltern (0.2 μ m, Schleicher und Schüll, Dassel) versehen.

4.1. Stammhaltung und Vorkulturen

Zur Stammhaltung wurde *Zymomonas mobilis* in Bellco-Röhrchen in 10 ml Voll- bzw. Minimalmedium mit 20 g/l Glukose bei Raumtemperatur kultiviert und alle zwei Tage überimpft.

Vorkulturen wurden in 200 ml-Zweihalskolben mit 150 ml Nährmedium bzw. 2 l-Zweihalskolben mit 1 l Nährmedium und 20 oder 50 g/l Glukose gezogen. Die Vorkulturen wurden mit 10 % (v/v) Inokulum der Stammkultur oder einer frischen Vorkultur beimpft und bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase steril durch Zentrifugation (10 min, 5500 x g) geerntet, in steriles Medium aufgenommen und als Inokulum verwendet.

4.2. Kontinuierliche Fermentationen

Kontinuierliche Fermentationen wurden im Laborfermenter des Typs Biostat E (Fa. Braun, Melsungen) mit automatischer pH- und Temperaturregulation durchgeführt. Temperatur (Pt100), pH-Wert (pH Einstabmeßkette, Ingold AG, Frankfurt), Redoxpotential (Platinelektrode, Ingold AG, Frankfurt), Druck (piezoresistiver Überdruckaufnehmer) und Trübung (Trübungssonde, BTG Bochum) wurden mit *in situ* sterilisierbaren Sonden erfaßt. Die CO₂-Bildungsrate

wurde über die Volumenbestimmung des Abgases mit einem Gaszähler (1 l, nasse Bauart, Ritter Bochum) erfaßt. Das Kulturvolumen wurde über eine Waage TSM 2520 (Toledo, Köln) geregelt. Die Kulturflüssigkeit wurde über eine Thermofalle (80 °C) in eine Auffangflasche gepumpt. Die Durchflußrate wurde durch den kontinuierlichen Zulauf frischen Mediums über eine geregelte Dosierstrecke YPP01 (Sartorius, Göttingen) eingestellt. Wenn nicht anders im Text vermerkt, wurden folgende Bedingungen verwendet:

Fermentergefäß	3.5	l
Arbeitsvolumen	2.0	l
Temperatur	30	°C
pH	5.0	
pH Titrationsmittel	3 M	NaOH
Rührerdrehzahl	300	Upm

Zur online Meßwerterfassung und Prozeßregelung wurde ein Personalcomputer (IBM-AT) mit 640 kB RAM, 20 MB Festplatte, Arithmetikprozessor und Hercules Graphics Card eingesetzt. Als Betriebssystem wurde das Echtzeit-Multitasking-System "Concurrent DOS" verwendet. Für Meßwerterfassung, Auswertung und Prozeßregelung wurde die Software MEAS (Steinke 1987) benutzt. Die Meßsignale für Pumprate der Dosierstrecke, Kulturvolumen, Trübung, Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential, Druck und Laugeverbrauch wurden über eine Siemens SMP-Interface (16 Analogeingänge, 4 Analogausgänge, 2 V24-Schnittstellen) dem Rechner übermittelt. Der Sollwert für die Zulaufpumpe wurde von dem in MEAS eingebundenen Programm Sartorius (Steinke 1987) über den Sartonet-Wandler (Sartorius, Göttingen) der Dosierstrecke übermittelt. Bei turbidostatistischen Fermentationen wurde die Trübung über den Sollwert für die Zulaufpumpe geregelt.

Für die Durchführung der zweistufigen Fermentationen wurde der Ablauf eines Fermenters im kontinuierlichen Betrieb in einen zweiten, vergleichbar ausgerüsteten Biostat E Laborfermenter (5 l oder 10 l Gefäß) gepumpt. Über eine Schlauchpumpe erfolgte die Zudosierung einer 50 %-igen (w/v) Glukoselösung. Der Ablauf der Kulturflüssigkeit erfolgte passiv durch den Boden des Gefäßes, um das Ansammeln flokkulierter Zellen zu vermeiden. Das Kulturvolumen wurde über einen externen Überlauf mit Druckausgleich eingestellt und konstant gehalten.

5. Bestimmung des Bakterienwachstums

Das Wachstum der Bakterien wurde über die optische Dichte bei 550 nm bestimmt. Um die Linearität zwischen Extinktion und Zellkonzentration zu gewährleisten, wurden die Proben so verdünnt, daß die Extinktionen einen Wert von 0.25 nicht überstiegen. In kontinuierlichen Fermentationen wurde die Bakteriendichte mit einer Trübungssonde im Fermenter (BTG-Bochum) gemessen. Das Trübungssignal korrelierte gut, jedoch nicht linear mit OD und Trockengewicht und wurde als Meßgröße für die Regelung der turbidostatischen Fermentationen benutzt.

Die Bakterienmasse wurde über eine Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Hierzu wurden 10 ml Bakteriensuspension in vorgetrockneten und vorgewogenen Zentrifugengläsern geerntet (10 min, 4 °C, 5500 x g) und 2-fach mit kaltem Aqua bidest. gewaschen. Die Zentrifugengläser mit Sediment wurden getrocknet (24 Stunden bei 105 °C, 1 Stunde im Exsikkator) und gewogen. Die Korrelation zwischen Trockengewicht und OD war abhängig von den Wachstumsbedingungen. Bei steigenden Glukose- und Ethanolkonzentrationen nahm das Trockengewicht pro OD-Einheit von 0.25 g/l*OD auf 0.20 g/l*OD ab.

In einigen Versuchen wurde das Bakterienwachstum anhand der Zellzahl bestimmt. Hierzu wurde die Bakteriensuspension auf $1 - 2.5 \cdot 10^7$ Zellen/ml verdünnt und in einer Zählkammer (Thoma, Schichtdicke 0.05 mm, Raster 0.0025 mm²) gezählt.

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl im Fermenter wurden Zellproben steril durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 6000 x g) geerntet, in anaerobes Vollmedium ohne Glukose aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im gleichem Medium eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils 2-fach ca. 20, 250 und 2500 Zellen pro Platte ausplattiert. Die Platten wurden zwei Tage bei 30 °C mit H₂/CO₂ Entwickler (Oxoid Gas-Generating-Kit) anaerob in einem Anaerobentopf (Oxoid anaerobic) inkubiert. Aus der Lebendzellzahl und der parallel bestimmten Gesamtzellzahl wurde die Lebensfähigkeit berechnet.

6. Substrat- und Produktbestimmungen im Kulturfiltrat

6.1. Glukosebestimmung

Die Glukosekonzentration im Kulturmedium wurde mit einem Glukoseanalysator (Glukoseanalysator II, Beckman München) ermittelt. Die Messung wurde nach Vorschrift der Hersteller durchgeführt.

Zur Bestimmung von Glukosekonzentrationen < 1.5 g/l wurde ein enzymatischer Test von Boehringer Mannheim verwendet, da damit eine höhere Genauigkeit erzielt wurde. Glukose wird dabei durch das Enzym Hexokinase mit ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, welches durch das Enzym Glukose-6-Phosphatdehydrogenase mit NAD zu Glukonat-6-Phosphat oxidiert wird. Die dabei entstehende NADH-Menge wird bei 340 nm photometrisch bestimmt und ist der Glukosemenge equivalent (Bergmeyer et al. 1974).

6.2. Bestimmung von Glycerin, Dihydroxyaceton und Laktat

Die Glycerin- und Dihydroxyacetonbestimmung erfolgte enzymatisch nach den Methoden von Eggstein und Kuhlmann (1974) bzw. Wieland und Witt (1974) mit einer Testkombination für Glycerin der Firma Boehringer Mannheim. Die D- und L-Laktatbestimmung erfolgte ebenfalls enzymatisch mit einer Testkombination der Firma Boehringer Mannheim nach einer Methode von Noll (1974).

6.3. Gaschromatographische Bestimmung von Ethanol, Acetat und Acetoin

Ethanol, Acetat und Acetoin wurden mit einem Gaschromatographen der Firma Hewlett Packard Typ 5790 A ausgerüstet mit Flammenionisationsdetektor (FID), automatischem Probengeber 7671 A und Integrator 3390 A quantitativ bestimmt. Die Proben wurden vor Analyse verdünnt, so daß die Konzentrationen unter 0.8 g/l lagen, 1:1 mit internem Standard (1.6 g/l Methanol oder 0.99 g/l Propionsäure in 0.2 N HCl) gemischt und unter folgenden Bedingungen analysiert (Finn et al. 1984, modifiziert):

Analysebedingungen für die Ethanolbestimmung

Säule	Porapack QS, 80 - 100 mesh, 2 m x 2 mm I.D. (Werner Günther Analysentechnik, Düsseldorf)
Säulentemperatur	140 °C isotherm
Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	250 °C
Trärgas	N ₂ (30 ml/min.)
Probenvolumen	1 µl
Retentionszeiten	0.97 min Methanol (interner Standard) 2.36 min Ethanol

Trennbedingungen für die Acetat- und Acetoinbestimmung

Säule	Porapack QS, 80 - 100 mesh, 2 m x 2 mm I.D. (Werner Günther Analysentechnik, Düsseldorf)
Säulentemperatur	Temperaturprogramm 140-170 °C
Temperaturgradient	10 °C/min, nach 2.5 min
Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	250 °C
Trärgas	N ₂ (30 ml/min.)
Probenvolumen	1 µl
Retentionszeiten	7.15 min Acetat 12.57 min Propionsäure (int. Standard) 15.30 min Acetoin

Zur Eichung wurden Lösungen mit 0.79 g/l Ethanol oder 0.136 g/l Natriumacetat x 3 H₂O und 0.88 g/l Acetoin verwendet.

7. Ermittlung der CO₂-Bildungsrate

Die CO₂-Bildungsraten von *Zymomonas mobilis* bei unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Warburg-Apparatur (B. Braun, Melsungen) ermittelt. Die Schüttelfrequenz betrug 120/min, die Amplitude 4 cm. Das Wasserbad wurde auf 30 °C ± 0.1 °C temperiert. Die Messungen wurden im gepufferten, anaeroben Vollmedium pH 6.0 durchgeführt. Bei geringen Ethanolkonzentrationen wurde eine Zelldichte von ca. 0.12 mg Trockenge-

wicht/ml eingesetzt. Bei Ethanolkonzentrationen von 50 bis 130 g/l wurden Zelldichten von 0.14 bis 0.20 mg Trockengewicht/ml eingesetzt. Falls Ethanol während der Messung zugegeben werden sollte, wurden spezielle Reaktionsgefäße mit einem Septum verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden vor und beim Einfüllen der Zellsuspension mit Argon begast.

Für die Ermittlung der CO_2 -Bildungsrate einer fermentierenden *Zymomonas mobilis*-Kultur wurden 3 ml Zellsuspension direkt von der Hauptkultur in das Warburgreaktionsgefäß überführt. Nach Temperaturequilibration (10 min) wurde die Messung gestartet.

Für die Bestimmung der CO_2 -Bildungsraten von *Zymomonas mobilis* in Medium ohne Ethanol wurden Zellproben zuerst in Medium ohne Glukose gewaschen, verdünnt und, zur Adaption an das frische Medium, eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 2.8 ml der Suspension zum Warburgreaktionsgefäß überführt, wo, nach Temperaturequilibration, die Fermentation durch Zugabe von 0.2 ml 20 % (w/v) Glukoselösung gestartet wurde.

8. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden in permeabilisierten Zellen, Rohextrakten oder Membranfraktionen bestimmt. Membranfraktionen wurden für die Charakterisierung der membrangebundenen ATPase Aktivität in *Zymomonas mobilis* verwendet. Bei der Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten wurden bevorzugt permeabilisierte Zellen eingesetzt, da es sich gezeigt hat, daß bei Ultraschall- oder X-Press-aufschluß die Enzymaktivität abnehmen kann. Bei der Glukokinase von *Zymomonas mobilis* war dieser Effekt besonders ausgeprägt. Die PEP-Carboxylase-Aktivität konnte nicht in mit Chloroform permeabilisierten Zellen gemessen werden und wurde daher nach dem Aufschluß mittels einer X-Press im Rohextrakt ermittelt. Es zeigte sich, daß die Aktivitäten aller in dieser Arbeit bestimmten Enzyme bei - 25 °C voll erhalten blieben.

8.1. Herstellung von Permeabilisierten Zellen, Rohextrakt und Membranfraktionen

Die Permeabilisierung von *Zymomonas mobilis*-Zellen erfolgte nach Osman et al. (1987). Hierzu wurden 1-2 ml Zellen einer Kultur abzentrifugiert (2 min, 12500 x g), zweimal im entsprechenden eiskalten Testpuffer gewaschen und in 200 µl Testpuffer aufgenommen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 50 µl Chloroform

zugegeben und der Ansatz 20 s auf dem Laborschüttler (Vortex) gemischt. Anschließend wurden sofort 900 µl eiskalter Testpuffer zugesetzt, die wässrige Phase abpipetiert und ein entsprechendes Aliquot in den Enzymtest eingesetzt.

Rohextrakte wurden durch Aufschluß mit einer X-Pressen hergestellt. Hierzu wurden jeweils 250 - 300 mg Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 6000 x g) geerntet, zweimal in Testpuffer gewaschen und in 5 ml Testpuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einer vorgekühlten 5 ml X-Pressen (Bachofen) eingefüllt, übernacht eingefroren (-25 °C) und anschließend zum Aufschluß dreimal mit einem Druck bis 2000 kg/cm² mit einer hydraulischen Presse durch eine kleine Öffnung gepresst. Der kleinere Anteil noch intakte Zellen wurde durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 6000 x g) abgetrennt.

Membranfraktionen von *Zymomonas mobilis* wurden nach der Methode von Strohecker et al. (1988) hergestellt. Hierzu wurden 250 - 300 mg Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 6000 x g) geerntet, zweimal in Puffer (100 mM HEPES mit 50 mM KCl pH 7.5) gewaschen und in 5 ml Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier B15, Branson Sonic Power CO., USA) mit stufenförmiger Mikrospritze bei 50 % der maximalen Leistung (60 Watt). Die Beschallzeit in Pulsbetrieb unter Kühlung der Zellen im Eiswasserbad betrug 5 x 30 s mit Kühlpausen von jeweils 30 s. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 6000 x g) abgetrennt. Die Membranfraktion wurde danach durch Ultrazentrifugation des Rohextraktes (60 min, 4 °C, 145000 x g) sedimentiert, einmal mit Puffer gewaschen und anschließend in Puffer zu einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml aufgenommen. Die Membranfraktionen wurden entweder sofort für die Aktivitätsbestimmung verwendet oder eingefroren (-25 °C), wobei sich die ermittelten Aktivitäten nicht voneinander unterschieden.

8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Membranfraktionen, der Rohextrakte und Zellsuspensionen wurden nach Markwell et al. (1978) bestimmt. Hierzu wurden 200 µl Probe mit einer Proteinkonzentration zwischen 10 und 100 µg/ml mit je 600 µl Markwell-Reagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurden 90 µl Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (1:1 verdünnt mit Aqua bidest.) zugegeben, sofort gemischt und 2 - 3 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Probe (10 min, 12500 x g) wurde die Extinktion bei 660 nm gegen Wasser gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden aus der unter gleichen Bedingungen erstellten Eichgerade (Rinderserumalbumin 10 - 100 mg/ml) ermittelt. Das Markwellreagenz wurde kurz vor Gebrauch durch Mischen von je 100 Teilen der Lösung A mit einem Teil der Lösung B hergestellt.

Lösung A:	2% (w/v)	Na ₂ CO ₃
	0.4% (w/v)	NaOH
	0.16 % (w/v)	Na-Tartrat
	1 % (w/v)	SDS
Lösung B:	2.6 % (w/v)	CuSO ₄

8.3. Enzymmessungen

Alle nachfolgenden Enzymmessungen wurden bei 30 °C mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer mit temperierbarem Küvettenblock durchgeführt (Shimadzu UV 160 A).

Glukokinase (E.C. 2.7.1.2)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend der Methode von Scopes et al. (1985). In einem gekoppelten optischen Test wurde die Glukose von der Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt, das Glukose-6-Phosphat von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc* zu Gluconat-6-phosphat oxidiert und die Bildung von NADH bei 340 nm gemessen.

Testansatz	Konzentration im Test	
MES/KOH-Puffer	50	mM; pH 6.5
MgCl ₂	10	mM
KH ₂ PO ₄	20	mM
ATP	10	mM
NAD	1.2	mM
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	5.5	U/ml
permeabilisierte Zellen	8-16	mU/ml
Nach Temperaturequilibration wurde der Leerwert ermittelt und der Test gestartet durch		
Zugabe von Glukose	100	mM

Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.49)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend der Methode von Algar und Scopes (1985). Die Bildung von NADH bei der Oxidation von Glukose-6-Phosphat zu Gluconat-6-phosphat wurde bei 340 nm gemessen.

<u>Testansatz</u>	<u>Konzentration im Test</u>	
MES/KOH-Puffer	50	mM; pH 6.5
MgCl ₂	10	mM
KH ₂ PO ₄	20	mM
NAD	1	mM
permeabilisierte Zellen	8-16	mU/ml
Nach Temperaturequilibration wurde der Leerwert gemessen und der Test gestartet durch Zugabe von Glukose-6-Phosphat		
	1	mM

3-Phosphoglyceratkinase (E.C. 2.7.2.3)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend der Methode von Pawluk et al. (1986) in einem gekoppelten optischen Test. Gemessen wurde die Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat zu 1,2-Bi-phosphoglycerat, wobei das Biphosphoglycerat mit NADH von Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und NAD umgesetzt wurde. Die Abnahme von NADH wurde bei 340 nm verfolgt.

<u>Testansatz</u>	<u>Konzentration im Test</u>	
MES/KOH-Puffer	50	mM; pH 6.5
MgCl ₂	10	mM
KH ₂ PO ₄	20	mM
β-Mercaptoethanol	10	mM
ATP	1	mM
NADH	0.2	mM
Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase	10	U/ml
permeabilisierte Zellen	8-16	mU/ml
Nach Temperaturequilibration wurde der Leerwert gemessen und der Test gestartet durch Zugabe von 3-Phosphoglycerate		
	5	mM

Pyruvatdecarboxylase (E.C. 4.1.1.1)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend der Methode von Ullrich (1970) in einem gekoppelten optischen Test. Gemessen wurde die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd. Acetaldehyd wurde von der Alkoholdehydrogenase zu Ethanol umgesetzt und die Abnahme von NADH bei 340 nm gemessen.

<u>Testansatz</u>	<u>Konzentration im Test</u>
MES/KOH-Puffer	50 mM; pH 6.5
MgCl ₂	10 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM
Thiaminpyrophosphat	1.5 mM
Na-Pyruvat	17 mM
NADH	0.18 mM
Alkoholdehydrogenase	88 U/ml
Nach Temperaturequilibration wurde der Test gestartet durch Zugabe von permeabilisierten Zellen	
	8-16 mU/ml

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (E.C. 4.1.1.38)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach Bringer und Sahm (1989) in einem gekoppelten optischen Test. Gemessen wurde die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat. Oxalacetat wurde von der Malatdehydrogenase zu Malat umgesetzt und die Abnahme von NADH bei 340 nm gemessen. Ferner wurde die Laktatdehydrogenase dem Test zugegeben, um das durch spontane Decarboxylierung von Oxalacetat entstehende Pyruvat mit zu erfassen.

<u>Testansatz</u>	<u>Konzentration im Test</u>
Tris/H ₂ SO ₄ -Puffer	100 mM; pH 8
KHCO ₃	20 mM
MgSO ₄	10 mM
NADH	0.2 mM
Malatdehydrogenase	12 U/ml
Laktatdehydrogenase	5.5 U/ml
Rohextrakt	8-16 mU/ml
Nach Temperaturequilibration wurde der Leerwert gemessen und der Test gestartet durch Zugabe von Phosphoenolpyruvat	
	10 mM

ATPase

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in einem diskontinuierlichem Test, entsprechend der Methode von Cartwright et al. (1987). Gemessen wurde die Freisetzung von Phosphat aus ATP.

<u>Testansatz</u>	<u>Konzentration im Test</u>	
HEPES/KOH-Puffer	100	mM; pH 7.5
KCl	50	mM
ATP	4	mM
MgCl ₂	4	mM
Ethanol	0-150	g/l
permeabilisierte Zellen oder Membranfraktion	3-10	mU/ml
Nach Temperaturequilibration wurde der Test gestartet durch Zugabe von		
ATP	4	mM
Nach Inkubationszeiten von 0, 5, 10, 15 oder 20 min wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von		
Stopreagenz	2	ml/ml Ansatz
Ascorbinsäure, 10 % (w/v), frisch	20	µl/ml Ansatz
Nach 5 min bei 30 °C wurde die Extinction bei 750 nm gegen Aqua bidest gemessen.		

Die Zusammensetzung des Stopreagenz lautet:

H ₂ SO ₄ (konz.)	2	% (v/v)
Ammoniummolybdat	0.5	% (w/v)
SDS	0.5	% (w/v)

Die Konzentration des freigesetzten Phosphats wurde anhand einer mit 0 - 0.5 mM KH₂PO₄ erstellten Eichgerade ermittelt.

Die Enzymaktivitäten wurden in Units angegeben. Ein Unit (U) entspricht der Enzymaktivität, welche die Umwandlung von einem µmol Substrat pro Minute unter den angegebenen Bedingungen katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in U/mg Protein angegeben. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde für NADH eine Extinktionskoeffizient von 6,3 ml/(µmol * cm) zugrundegelegt.

9. Bestimmung der zellinternen Glukosekonzentration

Zur Bestimmung der zellinternen Glukosekonzentration in *Zymomonas mobilis* (Struch et al. 1991) wurden aus einer kontinuierlichen Fermentation Proben entnommen. Die schnelle Trennung der Zellen vom Kulturmedium erfolgte mittels Zentrifugation durch eine Silikonölschicht in 20 %-ige (w/v) Perchlorsäure, in der alle zellulären Prozesse sofort inaktiviert werden (Klingenberg und Pfaff, 1967). In einem Parallelansatz wurde das Cytoplasmavolumen sowie den Anteil an Überstand, der mit durch die Ölschicht hindurch gerissen wurde, ermittelt.

9.1. Silikonölzentrifugation

In 400 µl Mikroteströhrchen (Beckman) wurden 30 µl 20 % (w/v)-ige Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl pipettiert und die beiden Phasen durch kurze Zentrifugation (10 s, Mikrofuge E, Beckman) voneinander getrennt, so daß sich die Ölschicht über der Perchlorsäure befand. Bei zellexternen Glukosekonzentrationen bis 80 g/l wurde Silikonöl mit einer Dichte von 1.03 g/ml benutzt. Bei höheren Glukosekonzentrationen mußte wegen der höheren Dichte des Kulturmediums eine 1:1 Mischung von Silikonölen mit der Dichte 1.03 und mit der Dichte von 1.05 g/ml verwendet werden. In 16 dieser Röhrchen wurden bei der Probenahme je 100 oder 200 µl Kultur gegeben. Sofort wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 12500 x g, Beckman-Mikrofuge) durch die Ölschicht hindurch in der Perchlorsäurephase sedimentiert. Im Überstand wurde die extrazelluläre Glukosekonzentration bestimmt. Zur Aufarbeitung des Sediments wurde die Perchlorsäurephase mit einem Skalpell von dem Rest der Reaktionsgefäße abgetrennt, die Spitze des Röhrchens umgekehrt in ein 750 µl Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 2 min. zentrifugiert (12500 x g). Das Sediment wurde resuspendiert und die Zellen anschließend durch 5-minütige Beschallung im Ultraschallbad (Branson 2200) homogenisiert. Zur Neutralisierung wurden die Proben mit 24 µl eiskalter 5 M KOH/1 M Triethanolamin Lösung versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Kaliumperchlorat, Zelltrümmer und Öl wurden durch Zentrifugation (4 °C, 2 min, 12500 x g) vom Überstand getrennt. Die Überstände von jeweils fünf parallelen Röhrchen wurden vereinigt, um ein ausreichendes Probenvolumen für die Glukosebestimmung zu erhalten.

9.2. Bestimmung des Cytoplasmavolumens

Bei der Volumenbestimmung schließt man aus der Verteilung permeabler, ^3H -markierter Substanzen und nicht permeabler, ^{14}C -markierter Substanzen in den Zellen und im Überstand auf das Cytoplasmavolumen der Zellen (Rottenberg 1979). Während $^3\text{H}_2\text{O}$ sofort in die Zellen diffundiert, können $[^{14}\text{C}]$ -Taurin oder $[^{14}\text{C}]$ -Maltose die Cytoplasmamembran von *Zymomonas mobilis* nicht passieren. Somit ist bei der Silikonölzentrifugation die Menge an $^3\text{H}_2\text{O}$ im Pellet ein Maß für den intra- plus extrazellulären Wasserraum und die Menge an $[^{14}\text{C}]$ -Taurin oder $[^{14}\text{C}]$ -Maltose ein Maß für den Anteil an Überstand, der mit durch die Ölschicht hindurch gerissen wurde. Aus der Differenz dieser beiden Werte läßt sich das Cytoplasmavolumen der Zellen berechnen. In der Regel wurde $[^{14}\text{C}]$ -Taurin als impermeable Substanz eingesetzt. Bei Ethanolkonzentrationen über 80 g/l nahm der Menge an Taurin im Sediment mit der Inkubationszeit im Testansatz zu, was auf unspezifische Adsorption hinweist. Deshalb wurde bei hohen Ethanolkonzentrationen $[^{14}\text{C}]$ -Maltose als impermeabler Marker verwendet.

500 μl Kultursuspension wurden zu einer Mischung aus 5 μl $[^{14}\text{C}]$ -Taurin (0.5 μCi), 10 μl ^{12}C -Taurin (10 mM) und 5 μl $^3\text{H}_2\text{O}$ (1 - 2 μCi) gegeben, der ganze Ansatz gut durchmischt und 3 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 mal 100 μl Kultursuspension dem Testansatz entnommen, in Silikonölröhrchen pipettiert und zentrifugiert (1 min, 12500 x g). Für die Ermittlung der jeweiligen spezifischen Radioaktivitäten des Wassers und des Taurins wurden 20 μl Aliquots der Überstände mit 200 μl Aqua bidest. und 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Instagel Canberra-Packard) gemischt und in einem Flüssig-Szintillationszähler (Rackbeta 1214, LKB) gezählt. Zur Bestimmung der im Sediment befindlichen Radioaktivität wurden die Perchlorsäureschichten wiederum mit einem Skalpell vom dem Rest des Reaktionsgefäßes abgetrennt, in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt, mit 750 μl H_2O resuspendiert und durch Beschallung bei Raumtemperatur im Ultraschallbad (10 min) homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 min, 12500 x g) wurden 650 μl der Überstände mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und im Szintillationszähler gezählt.

Die Berechnung der intra- und extrazellulären Volumina erfolgte folgendermaßen:

$$^3\text{H}_2\text{O-Raum} = \text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{Sed}} * (\text{V}_{\text{Sed}}/\text{ZS}_{\text{Sed}}) * (\text{ZV}_{\text{Üb}}/\text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{Üb}})$$

(µl/Probenvolumen)

$$^{14}\text{C-Taurin-Raum} = \text{extrazelluläres Volumen}$$

$$= \text{dpm } ^{14}\text{C}_{\text{Sed}} * (\text{V}_{\text{Sed}}/\text{ZV}_{\text{Sed}}) * (\text{ZV}_{\text{Üb}}/\text{dpm } ^{14}\text{C}_{\text{Üb}})$$

(µl/Probenvolumen)

$$\text{Internes Volumen} = ^3\text{H}_2\text{O-Raum} - ^{14}\text{C-Taurin-Raum}$$

(µl/Probenvolumen)

dpm : Radiaktive Zerfälle pro Minute
 V_{Sed} : Volumen des aufgearbeiteten Sediments (750 + 30 µl)
 ZS_{Sed} : Zählvolumen des Sediments (650 µl)
 $\text{ZV}_{\text{Üb}}$: Zählvolumen des Überstandes (20 µl)

Bezogen auf das eingesetzte Trockengewicht betrug das Cytoplasmavolumen ca. 2 µl/mg und der Taurinraum im Pellet ca. 3 µl/mg.

10. Bestimmung des zellinternen pH-Wertes

Der zellinterne pH kann aus der Verteilung einer schwachen Säure A über die Membran folgendermaßen berechnet werden (Rottenberg 1979):

$$1) \text{pH}_{\text{in}} = \text{pH}_{\text{out}} + \text{Log}[(\text{A}^{-}_{\text{in}}/\text{A}^{-}_{\text{out}})]$$

Wenn der zellexterne pH > $\text{pK}_{\text{Ac}} + 1$ kann der Anteil der neutralen Säure, A, vernachlässigt und der zellinterne pH nach Formel 1 aus der Gesamtverteilung der Säure über die Membran berechnet werden. Bei niedrigeren zellexternen pH-Werten muß für den Anteil der neutralen Säure korrigiert werden und wird der zellinternen pH folgendermaßen berechnet (Rottenberg 1979):

$$2) \text{pH}_{\text{in}} = \text{Log}[(\text{A}^{-} + \text{A}_{\text{in}}/\text{A}^{-} + \text{A}_{\text{out}}) * (10^{\text{pK}_{\text{a}}} + 10^{\text{pH}_{\text{out}}}) - 10^{\text{pK}_{\text{a}}}]$$

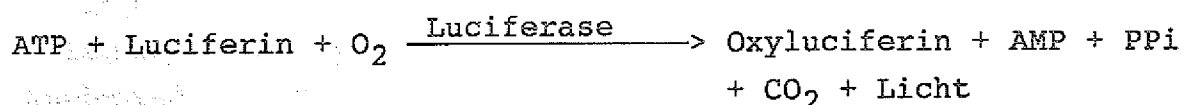
Zur Bestimmung des zellinternen pH-Wertes in kontinuierlichen Fermentationen wurde Benzoat ($\text{pK}_{\text{a}} = 4.2$) als schwache Säure eingesetzt. 300 µl Zellsuspension aus der Fermentation (2 – 3 mg Trockengewicht/ml) wurden 2 min bei 30 °C mit 0.3 µCi [U- ^{14}C]-Benzoat inkubiert. 3 mal je 100 µl Probe wurden aus den Ansatz entnommen, in Silikonölröhrchen pipettiert und zentrifugiert

(1 min, 12500 x g). Zur Kontrolle auf unspezifische Benzoatbindung wurden in einen Parallelansatz CCCP-entkoppelte Zellen (3 min, 100µM CCCP, Ruhrmann und Krämer 1992) eingesetzt. Die Überstände und Sedimente wurden für die Bestimmung der zellinternen und zellexternen Radioaktivität auf vergleichbare Weise wie bei der Cytoplasmabestimmung aufgearbeitet und gezählt. Außerdem wurde eine Bestimmung des zellinternen und zellexternen Volumens im Sediment durchgeführt. Die extrazelluläre Benzoatmenge pro µl konnte aus die Zählung der ^{14}C -Radioaktivität des Überstandes berechnet werden. Die intrazelluläre Benzoatmenge wurde aus der gezählten ^{14}C -Radioaktivität im Sediment und das Cytoplasmavolumen berechnet. Dabei mußte der Anteil der aus dem Überstand bei der Zentrifugation ins Pellet mitgerissenen extrazellulären ^{14}C -Benzoatmenge mit Hilfe der Taurinraumbestimmung ermittelt und dem Radioaktivität des Pellets abgezogen werden. Aus den so erhaltenen zellinternen und zellexternen Benzoatmengen wurde mittels der oben angegeben Formel 2 ($\text{pH}_{\text{out}} = 5$; $\text{pK}_a \text{ Benzoat} = 4.2$) der zellinterne pH-Wert berechnet.

11. Bestimmung der intrazellulären Adeninnucleotide

Die Bestimmung der Adeninnucleotide erfolgte mit dem Luciferin/Luciferase Testsystem (Schimz et al. 1981, Spielman et al. 1981), wobei folgenden Reaktionen abliefen:

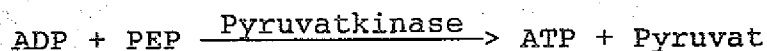
1) ATP-Bestimmung



Das Integral der Lichtemission über die Zeit ist in den ersten Sekunden linear abhängig von der ATP-Konzentration bis 10^{-9} M.

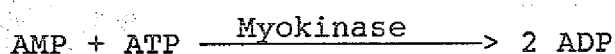
2) ADP-Bestimmung

Das ADP wurde vor der Analyse enzymatisch in ATP überführt:



3) AMP-Bestimmung

Das AMP wurde zunächst enzymatisch in ADP und dann in ATP umgesetzt:



Extraktion und Probenvorbereitung (nach Schimz et al. 1981)

Um einen schnellen Aufschluß der Zellen zu gewährleisten, wurden 3 ml eiskalte 35 %-ige (v/v) Perchlorsäure in einer vorgewogenen 10 ml Plastikspritze vorgegeben und dazu ca. 3 ml Kultur über ein Septum direkt aus den Fermenter aufgezogen. Zur Ermittlung des genauen Perchlorsäurevolumens bzw. Probenvolumens wurde jeweils die Gewichts Differenz bestimmt. Die Probe wurde nach 5 min im Eisbad abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 5000 x g) und mit 9 ml eiskalter 2 M KHCO₃-Lösung neutralisiert. Nach 5 min im Eisbad wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 x g) abgetrennt und der Überstand bis zur Nucleotidbestimmung bei - 25 °C aufbewahrt. Um den zellinternen Nucleotidgehalt zu bestimmen wurde sowohl von der Gesamtkultur als auch vom Kulturfiltrat (10 min, 4 °C, 6000 x g) ein Extrakt hergestellt.

Die Reaktionsansätze (RA) für die Nucleotidbestimmung waren wie folgt :

	ATP	ATP+IS*	ADP	ADP+IS	AMP	AMP+IS
RA enthält in µl:						
Extrakt	500	500	500	500	500	500
Puffer	500	490	490	480	480	470
PEP-Reagenz	100	100	100	100	100	100
Interner Standard(IS)	0	10	0	10	0	10
Pyruvatkinase	0	0	10	10	10	10
Myokinase	0	0	0	0	10	10
Inkubation bei						
Raumtemperatur (min)	0	0	15	15	45	45

* IS = interner Standard

Puffer: Tris/H₂SO₄ 50 mM; pH = 7.4
MgSO₄ 3.5 mM
K₂SO₄ 2.5 mM
EDTA 0.6 mM

PEP-Reagenz: 40 mg K⁺-Phosphoenolpyruvat in 6 ml einer
MgSO₄ 0.5 M
KCl 1.8 M Lösung

Pyruvatkinase 2000 U/ml
Myokinase 1800 U/ml.

Beide Enzyme wurden durch Zentrifugation aus der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung präzipitiert und in Puffer aufgenommen.

Interner Standard ATP, ADP und AMP (frisch) Konzentrationen im Bereich der Probenkonzentration; Üblicherweise jeweils 0.1 und 0.05 mM.

Luciferin/Luciferase 50 mg lyophilisiertes Rohextrakt (FLE50) wurden in 5 ml Aqua dest. aufgenommen und die unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 x g) abgetrennt.

Die ATP-Bestimmung für 100 µl des Reaktionsansatzes wurde durch Zugabe von 250 µl der Luciferin/Luciferase-Lösung und 2 ml des Puffers (s.o.) gestartet. Die Lichtemission wurde mit einem Biolumineszenzmeßgerät (Bioluminescence Analyzer XP2000, Skan AG, Basel) während der ersten 20 s nach Start gemessen, integriert und in "counts" angegeben. Die Berechnung der Nukleotidkonzentrationen erfolgte anhand der internen Standards, wobei berücksichtigt wurde, daß in den Ansätzen zur Bestimmung von ADP bzw. AMP die Summe aller 2 bzw. 3 Nucleotide bestimmt wurde:

$$\text{nmol AXP/ml Kultur} = X_o * V_f * \text{IS}(\text{nmol AXP/ml RA}) / (X_{is} - X_1)$$

X_o = counts ATP bzw. counts(ADP-ATP) bzw.(AMP-ADP)

V_f = Verdünnungsfaktor aus Extraktion und Reaktionsansatz

IS = Konzentration der internen Standards im Reaktionsansatz

X_{is} = counts AXP+IS

X_1 = Counts AXP

12. Charakterisierung des Bakterien Wachstums

12.1. Bestimmung der Zellgrößenverteilung

Die Zellgrößenverteilung während Batchfermentation wurde mit einem Elzone 280 TC Zellzähler (Orificediameter 24 µm, Meßstrecke 50.4 µl, Particle Datan Chicago) ermittelt. Die Eichung wurde mit Latex standard Partikel (d = 1 und 2 µm) durchgeführt. Die

Proben wurden vor der Messung zu $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in gepuffertes Vollmedium ohne Hefextrakt, Glukose oder Ethanol verdünnt. Dieses Medium wurde auch als Elektrolyt verwendet.

12.2. Bestimmung der spezifische Dichte.

Um das Wachstum von *Zymomonas mobilis* in Batchfermentationen bei Ethanolkonzentrationen ≥ 80 g/l zu charakterisieren, wurde die spezifische Dichte der Zellen während der Fermentation ermittelt. Dazu wurden Dichtezentrifugationen in einem Perkollidichtegradienten (Pharmacia) durchgeführt (Kubitschek et al. 1983, Cheng 1983, Woldringh et al. 1981). Das Zentrifugationsmedium war anaerobes Vollmedium pH 6.0 ohne Glukose, aufgenommen in 71 % (v/v) Perkoll. Zu entsprechenden Zeiten während der Batchfermentationen wurden 500 μ l Kulturproben (0.3 - 0.4 mg Trockengewicht/ml) mit Zentrifugationsmedium vermischt und durch Ultrazentrifugation (Winkelrotor, 20 min, 5 °C, 45000 x g) isopyknisch konzentriert. Der Gradient bildete sich während der Zentrifugation. Zur Eichung des Gradienten wurde in einem Parallelansatz das Zentrifugationsmedium mit 500 μ l einer Markerbeadsuspension (Pharmacia, $d = 1.019 - 1.139$ g/ml) vermischt. Die Dichtezentrifugationen erfolgten sowohl in Zentrifugationsmedium ohne als auch mit Ethanol. Es zeigte sich jedoch, daß die anhand der Eichung ermittelte Dichte hierdurch nicht beeinflußt wurde.

12.3. Bestimmung der makromolekularen Zusammensetzung und des Phosphatgehalts von *Zymomonas mobilis*

Die quantitative Bestimmung von Protein, RNA, DNA, des gesamten Kohlenhydrates, Fettsäuren sowie die Ermittlung des Trockengewichtes und des organisch gebundenen Phosphatgehalts in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* erfolgte mit lyophilisierter Biomasse. Dazu wurden zu entsprechenden Zeiten während der Batchfermentation 200 ml Kultur entnommen, auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 6000 x g) geerntet. Das Sediment wurde zweimal mit eiskalter $MgCl_2$ -Lösung (1mM) gewaschen, resuspendiert, eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde für die Trockengewichtsbestimmung ausgewogen und bis zur quantitativen Bestimmung der Makromoleküle bei -25 °C aufbewahrt.

Der Proteingehalt wurde bestimmt wie beschrieben in § 8.2 und der Fettsäuregehalt wie beschrieben in § 13.5. Für die quantitative Bestimmung von RNA und DNA wurden die Nukleinsäuren mit Säure extrahiert (Herbert et al. 1971), danach erfolgte die Bestimmung von RNA nach der Orcinolmethode (Herbert et al. 1971) und die von DNA nach der Diphenylaminmethode (Burton 1956). Aus ca. 20 mg lyophilisierter Zellen wurden zunächst die säurelöslichen Monomeren mit eiskalter HClO_4 -Lösung (0.25 M; 5 ml, 30 min) extrahiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 x g) aus dem Extrakt sedimentiert und die Nukleinsäuren wurden aus dem Sediment mit HClO_4 -Lösung (0.5 M; 4 ml; 15 min) bei 70 °C extrahiert. Diese 70 °C-Extrakte wurden vereinigt und bis zur Analyse bei - 25 °C aufbewahrt.

Die Bestimmung von RNA mit der Orcinolmethode beruht auf der Umwandlung der in RNA enthaltenen, purinegebundenen Ribose zu Furfural durch die Behandlung mit Säure (Herbert et al. 1971). Hierzu wurde 0.5 ml Extrakt mit 1.5 ml Orcinolreagenz versetzt und 20 min gekocht. Nach Abkühlung im Wasserbad wurde der Ansatz mit 5.5 ml Butanol fixiert und die Extinktion bei 672 nm gegen ein Reagenzleerwert mit 0.5 M HClO_4 gemessen. Die RNA-Konzentration der Proben wurde aus einer Eichgerade mit 0 - 0.6 mg/ml RNA aus Hefe ermittelt. Das Orcinolreagenz wurde vor Gebrauch frisch angesetzt:

Orcinolreagenz	4 Teile	FeCl_3	3.3 mM
		HCl	7.2 M
	1 Teil	Orcinollösung	1 % (w/v)

Für die Bestimmung von DNA nach der Methode von Burton (1956) wurden 2 ml Extrakt mit 4 ml Diphenylaminreagenz gemischt, 16 - 20 Stunden bei 30 °C inkubiert und die Extinktion bei 600 nm gegen ein Reagenzleerwert mit 0.5 M HClO_4 gemessen. Der DNA-Gehalt der Probe wurde aus einer Eichgerade mit 5 - 100 µg/ml Kalbsthymus DNA ermittelt. Das Diphenylaminreagenz (1.5 g Diphenylamin + 1.5 ml konz. H_2SO_4 in 100 ml Eisessig) wurde vor Gebrauch mit 1.6 mg Acetaldehyd pro 20 ml Reagenz versetzt.

Die Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate erfolgte im Anthrontest (Herbert et al. 1971). Hierbei werden Kohlenhydrate durch Behandlung mit heißer Säure hydrolysiert und zu Furfuralderivaten

umgewandelt, die mit Anthron eine grüne Färbung bilden. Hierzu wurde 1 ml einer Zellsuspension (1mg/ml) im Eisbad mit 5 ml eiskaltem Anthronreagenz versetzt, 10 min gekocht, im Eisbad gekühlt und die Extinktion bei 625 nm gegen ein Reagenzleerwert mit Aqua bidest. gemessen. Der Kohlenhydratgehalt der Probe wurde aus einer Eichgerade mit 0.01 - 0.1 mg/ml Glukose ermittelt.

Zur Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes wurde die Biomasse vollständig mit Säure oxidiert und das freigesetzte Phosphat photometrisch bestimmt (Herbert et al. 1971, Bartlett 1959). Hierzu wurden 5 mg lyophilisierten Zellen mit 1 ml 70 % HClO_4 versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, 16 Stunden bei 56 °C, nochmals mit einem ml HClO_4 versetzt und dann bei 150 °C im Heizblock verascht bis die Lösung völlig klar war. Die klare Lösung wurde auf 10 ml aufgefüllt und der Phosphatgehalt wie in § 13.4 beschrieben bestimmt.

13. Analyse der Lipide

13.1. Lipidextraktion

Die Lipidextraktion der Zellen wurde nach der von Schulenberg-Schell et al. (1989) modifizierten Methode von Bligh und Dyer (1959) durchgeführt. Zweihundert mg lyophilisierte Zellen wurden mit zweimal 47 ml Methanol/Chloroform/Wasser (2:1:0.8) unter Rühren bei Raumtemperatur extrahiert und die Rückstände anschließend durch Zentrifugation (10 min, 5000 g) abgetrennt. Durch Zugabe von 25 ml Chloroform und 25 ml Aqua bidest. und anschließender Zentrifugation (10 min, 5000 g) wurde eine Phasentrennung erhalten. Die Unterphase wurde abgetrennt und in einem Rundbodenkolben am Rotationsverdampfer (Büchi) bei 30 °C eingengt. Der Lipidextrakt wurde in ein vorgewogenes Röhrchen überführt, am Rotationsverdampfer eingetrocknet und ausgewogen. Danach wurde der Lipidextrakt in Chloroform/Methanol (2:1) resuspendiert (2 mg/ml) und sofort für die weiteren Analysen portioniert. Die Lipidextraktion wurde für jede Zellprobe in zwei Parallelansätzen durchgeführt.

13.2. Bestimmung der Hopanoide THBH, THBH-Ether und THBH-Glykosid mittels HPLC

Zur besseren Trennung und Detektion von Tetrahydroxybacteriohopan (THBH), THBH-Ether und THBH-Glykosid wurden die Seitenketten dieser Hopanoide acetyliert (Schulenberg-Schell et al. 1989). Hierzu wurde 1 ml Lipidextrakt unter Argon getrocknet, mit 1 ml einer frischen Mischung aus Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Pyridin (1:1) versetzt und 12 - 15 Stunden bei 33 °C inkubiert. Das Reagenz wurde anschließend mit Argon abgeblasen. Die acetylierten Lipide wurden in 1 ml Methanol/Acetonitril aufgenommen und sofort analysiert. Die Trennung erfolgte mit einem HPLC-System der Firma ERMA (Tokyo) und die Detektion mit einem UV-Detector von Soma Optics (Tokyo) bei 206 nm.

Analysebedingungen für THBH, THBH-Ether und THBH-Glykosid (Schulenberg-Schell et al. 1989)

Säule	7-µm C18 reversed-phase FIRMA (250 x 4 mm I.D.)	
Säulentemperatur	Raumtemperatur	
Eluent	Mischung von Laufmittel A und B; 2 ml/min	
Laufmittel A	Methanol/aqua dest. (95:5)	
Laufmittel B	Methanol/Acetonitril (80:20)	
Gradient	0 - 5 min 95 % A und 5 % B 5 - 45 min linear zu 5 % A und 95 % B	
Retentionszeiten	THBH-Ether	ca. 14 min
	THBH-Glykosid	ca. 16.2 min
	THBH	ca. 24 min
Probenvolumen	200 - 400 µl	

Die Mengen in mg an THBH, THBH-Ether und THBH-Glykosid in den Proben wurden aus Teilung der Peakflächen durch folgende Eichfaktoren (Schulenberg-Schell et al. 1989) erhalten:

THBH	466	Fläche/mg
THBH-Ether	1841	
THBH-Glykosid	1459	

Die Derivatisierung und HPLC-Analysen wurden für jeden Lipidextrakt in zwei Parallelansätzen durchgeführt. Die Doppelbestimmungen eines Derivatisierungsansatzes wichen in der Regel nicht mehr als 1 - 2 % voneinander ab.

13.3. Bestimmung der Hopanoide Hopen und Diplopterol mit GC

Hopen und Diplopterol wurden mit Hilfe eines Gaschromatographen bestimmt. Um eine Zersetzung von Diplopterol zu Hopen bei der Analyse zu verhindern, wurde vor Trennung eine Silylierung der tertiären OH-Gruppe des Diplopterols durchgeführt (Schulenberg et al. 1989). Als Silylierungsreagenz wurde N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) und als Katalysator Trimethylsilylchlorid (TMSCl) und getrocknetes Pyridin verwendet. Vor der Derivatisierung wurden zu 100 oder 250 µl Lipidextrakt 5 µg n-Triacontan (in Hexan) als interner Standard gegeben und die Lösungsmittel mit Argon abgeblasen. Die Lipide wurden in 50 µl BSTFA/TMSCl (99/1) und 50 µl Pyridin resuspendiert und 18-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200-400 µl Hexan erfolgte die Analyse der Proben mit einem Gaschromatographen (Hewlett Packard 5890 mit Flammenionisationsdetektor, Automatic Sampler 7673 A, Integrator 3392 A und Kaltaufgabesystem 502 von Gerstel). Die Mengen in mg an Hopen und Diplopterol in den Proben wurden durch Vergleich der Peakflächen mit der Peakfläche des internen Standards n-Triacontan erhalten. Die Empfindlichkeit des Detektors war für Hopen relativ zu n-Triacontan 1.34 x kleiner und für Diplopterol 1.17 x kleiner (Schulenberg-Schell et al. 1989). Die Derivatisierung und GC-Analysen wurden für jeden Lipidextrakt in zwei Parallelansätzen durchgeführt.

Analysebedingungen für Hopen und Diplopterol

Kapillarsäule	25 m Fused Silica OV-1 CB
Säulentemperatur	Temperaturprogramm 180-300 °C
Temperaturgradient	4 °C/min, nach 1 min
Injektortemperatur	60 - 220 °C
Detektortemperatur	320 °C
Trägergas	Helium (30 ml/min)
Probenvolumen	1 µl

Retentionszeiten	Triacontan	25.1 min (int. Standard)
	Hopen	29.0 min
	Diplopterol	33.8 min

13.4. Bestimmung von Phospholipiden

Zur Bestimmung des Phospholipidgehaltes in den Lipidextrakten wurden die Lipidproben mit Säure oxidiert und das freigesetzte Phosphat photometrisch bestimmt (Bartlett 1959, modifiziert).

50 oder 100 µl Lipidextrakt in säuregewaschenen Röhrchen wurden unter Argon eingetrocknet, mit 0.5 ml 70 %iger Perchlorsäure versetzt und 90 min im Heizblock bei 150 °C verascht. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurden 2.4 ml Ammoniummolybdatlösung (4.4 g/l) und 100 µl ANSA-Reagenz (s.u.) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben 20 min im Wasserbad gekocht, 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und abzentrifugiert (15 min, 5000 x g). Die Extinktion des Überstandes wurde bei 750 nm gegen Wasser gemessen. Eine Eichkurve wurde mit 10 bis 200 nmol L-α-Phosphatidylcholin-di-heptadecanyl (PC) erstellt. Aus dem molaren Phospholipidgehalt und einem mittleren Phospholipidgewicht von 730 g/mol, berechnet auf der Basis der Phospholipidzusammensetzung in *Zymomonas mobilis* (Carey und Ingram 1983, Tornabene et al. 1982), wurde der Phospholipidgehalt im Lipidextrakt berechnet.

Für die Herstellung des ANSA-Reagenz wurden je 30 g Natriumpyrosulfit, 6 g Natriumsulfit und 0.5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure (ANSA) trocken im Mörser zerrieben, in ca. 150 ml Aqua bidest. aufgelöst und drei Stunden stehen gelassen. Nach Zugabe von Aqua bidest. ad 250 ml wurde das Reagenz über Nacht im Dunkeln gelagert. Am nächsten Tag wurde die Lösung über säuregewaschene Glaswolle filtriert und das fertige Reagenz in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Das Reagenz war bis zu zwei Monaten haltbar.

13.5. Fettsäurenbestimmung

Für die Fettsäurenbestimmung wurde eine saure Methanolyse (Kates 1982) zur Umesterung der Fettsäurenreste durchgeführt. Anschließend erfolgte eine gaschromatographische Analyse der Fettsäurenmethylester.

Für die saure Methanolyse wurden 5 - 10 mg lyophilisierte Zellen oder 1 mg trockener Lipidextrakt mit 5 ml frisch gemischter 2 M HCl in Methanol versetzt. Als interner Standard wurde 25 µg (di-17:0)-Phosphatidylcholin zugegeben. Der Ansatz wurde 18 Stunden bei 85 °C inkubiert. Nach Abkühlen wurden die Fettsäuremethylester dreimal mit je 5 ml Hexan extrahiert. Die Hexanextrakte wurden bei 30 °C unter Argon getrocknet und in 1.5 ml Hexan aufgenommen. Die Analyse der Fettsäuremethylester erfolgte mit einem Gaschromatographen (Hewlett Packard 5890 mit Flammenionisationsdetektor, Automatic Sampler 7673 A, Integrator 3392 A und Kaltaufgabesystem 502 von Gerstel). Identifizierung der Fettsäurenmethylester erfolgte durch Vergleich mit einer Standard-Fettsäurenmethylestermischung der Fa. Chromatographie Service (Eschweiler).

Trennbedingungen für Fettsäuremethylester

Kapillarsäule	25 m Fused Silica OV-1 CB
Säulentemperatur	140-200 °C; Temperaturprogramm
Temperaturgradient	4 °C/min; nach 1 min
Injektortemperatur	60 - 220 °C
Detektortemperatur	250 °C
Trärgas	Helium, 30 ml/min
Probenvolumen	1 µl
Retentionszeiten	14:0 8.7 min
	16:1 12.5 min
	16:0 13.1 min
	17:0 15.3 min (int. Standard)
	18:1 17.1 min
	18:0 17.7 min

14. Isolierung der Phospholipide aus *Zymomonas mobilis*

Zur Isolierung der Phospholipide aus *Zymomonas mobilis* wurde der Lipidextrakt mittels Dünnschichtchromatografie aufgetrennt. Anschließend wurden die Phospholipidbanden extrahiert.

Vor Gebrauch wurden Kieselgel 60 Platten (20 x 20; 0.5 mm Schichtdicke ohne Fluoreszenzindikator, Merck AG Darmstadt) in einer mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) gesättigten Kammer vorgespült, an der Luft getrocknet und 2 Stunden bei 105 °C erhitzt (Kates 1982). Der Lipidextrakt (10 mg/Platte) wurde unter Argonbegasung über die Breite der Platte aufgetragen. Als Laufmittelsystem wurde $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAC}$ (60:35:8) benutzt (Kates 1982, modifiziert). Die Phospholipide wurden durch Anfärben am Plattenrand mit Molybden/Molybdenoxid-Lösung (2 % Molybden(VI)oxid + 0.1 % Molybden in 35 % H_2SO_4 , Dittmar und Lester 1964) oder Berberinchlorid (50 mg Berberinchlorid in 95 % v/v Ethanol, Detektion im UV-Licht bei 254 nm, Rohmer et al. 1984) sichtbar gemacht und durch Vergleich ihrer RF-Werte mit denen von käuflichen Referenzsubstanzen identifiziert. Es ergaben sich folgende RF-Werte:

Phospholipid	R.F.-Wert
Phosphatidylcholine	0.08
Phosphatidylserin	0.28
Phosphatidylethanolamin	0.63
Phosphatidylglycerin	0.77
Cardiolipin	0.86

Die Banden des Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin wurden abgekratzt und vereinigt. Die Bande des Phosphatidylserin wurde verworfen, da Phosphatidylserin sich im benutzten Laufmittelsystem schlecht von den Hopanoiden (RF-Werte 0.13-0.47) trennte. Die neutralen Phospholipide wurden dreimal mit je 40 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Ether}$ (1:1:1) und die sauren Phospholipide dreimal mit je 40 ml $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (2:1:0.8) aus dem Kieselgel eluiert und die Extrakte wurden über eine D4-Glassfritte (Schott, Mainz) vom Kieselgel getrennt. Die Extrakte wurden vereinigt, nach Zugabe eines Volumenanteils Toluol am Rotationsverdampfer eingetrocknet und aufgenommen in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). Zur Phasentrennung wurde der Extrakt mit einem halben Volumenanteil Aqua bidest. gemischt

und abzentrifugiert (5000 x g, 10 min). Die Unterphase wurde abgetrennt und am Rotationsverdampfer eingengt. Zur Charakterisierung des Extraktes wurden der Phospholipidgehalt, die Fettsäurezusammensetzung und der Hopanoidgehalt bestimmt.

15. Charakterisierung der lateralen Lipidpackung mit Monoschichtmethoden

Die laterale Lipidpackung in Monoschichten aus *Zymomonas mobilis*-Phospholipiden, -Gesamtlipiden oder deren Mischungen in der Luft-Wasser Phasengrenze wurde mittels einer rechnergesteuerten, thermostatisierten Filmwaage (Albrecht 1983) charakterisiert (Abb. 2, Gaines 1966, Pethica et al. 1976, Hayashi et al. 1972, Dhathathreyan und Möbius 1988, Millar und Yavin 1988). Aqua bidest. oder Lösungen von Ethanol in Aqua bidest. wurden als Flüssigphase in der Filmwaage benutzt. Zum Spreiten der Lipide auf die Flüssigkeitsoberfläche wurde eine 100 µl Hamilton Spritze mit Teflonschlauch am Ende der Nadel verwendet. Die Phospholipide wurden aus einer Chloroformlösung (0.5 mg/ml) auf die Flüssigkeitsoberfläche gespreitet. Da Hopanoide nicht in reinem

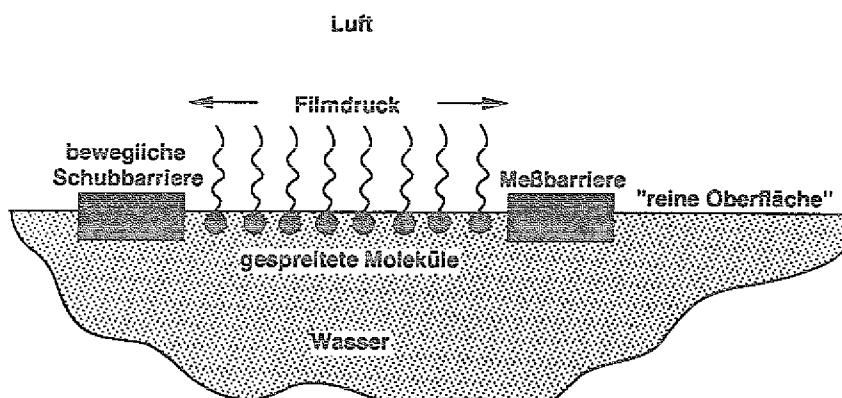


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Filmwaage.

Mit der beweglichen Barriere wird die für Lipide zur Verfügung stehende Oberfläche zunehmend reduziert und damit die Lipidkonzentration in der Phasengrenze erhöht. Gleichzeitig werden, z.B. mit Wilhelmiplättchen, die Oberflächenspannung der lipidbedeckten Oberfläche und der reinen Wasseroberfläche gemessen. Aus der Differenz der beiden wird der Filmdruck berechnet. Wird die Komprimierung der Lipide bei konstanter Temperatur durchgeführt, ist die resultierende Kurve der Oberflächenspannung als Funktion der molekularen Fläche eine "Isotherme".

Chloroform löslich sind, wurden die Gesamtlipiden aus einer Chloroform/Methanol-(9:1)-Lösung (0.5 mg/ml) auf die Flüssigkeitsoberfläche gespreitet. Alle Messungen wurden mit frisch gespreiteten Monoschichten durchgeführt und die Komprimierung der Monoschicht wurde erst gestartet, nachdem das Chloroform verflogen war und ein Temperaturequilibrium vorlag. Die Filme wurden mit einem Barrierevorschub von $4.2 \text{ \AA}^2$ pro Molekül und Minute komprimiert. Bei dieser Vorschubgeschwindigkeit waren die Meßergebnisse unabhängig von der Kompressionsrate.

III. Ergebnisse

1. Fermentationskinetik von *Zymomonas mobilis* in kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen

Anknüpfend an Literaturdaten (Charley et al. 1983, Lawford et al. 1984, Posten 1987) wurde in der vorliegenden Arbeit die Fermentationskinetik von *Zymomonas mobilis* bei kontinuierlicher Bildung hoher Ethanolkonzentrationen in zweistufigen Fermentationen untersucht.

1.1. Einfluß von verteilter Zufütterung der Glukose auf Fermentationsparameter und Nebenproduktbildung.

Die Modellierungen von Posten (1987) hatten gezeigt, daß bei optimaler Auslegung der zweistufigen Anlage die gesamte Glukose, die zu Ethanol umgesetzt werden soll, dem Medium der ersten Stufe zugegeben werden kann. Für die Bildung von 100 g/l Ethanol müssen daher für die erste Stufe Medien mit 20 % (w/v) Glukose eingesetzt werden. Bislang liegen jedoch keine experimentellen Daten zur Fermentationskinetik oder Substratinhibierung für kontinuierliche Fermentationen mit *Zymomonas mobilis* bei 20 % (w/v) Glukose im Medium vor. Es wurde daher untersucht, ob Substratinhibierung die Produktivität der zweistufigen Fermentation von 100 g/l Ethanol mit *Zymomonas mobilis* beeinflußt und eine über beide Stufen verteilte Zufütterung der Glukose notwendig macht.

Zunächst wurden einstufige Fermentationen mit 15 %, 17 % oder 20 % (w/v) Glukose durchgeführt. Die Durchflußraten wurden so gewählt, daß ca. 50 g/l, also die halbe Ethanol-Endkonzentration der zweistufigen Fermentationen, gebildet werden konnte. Nach Posten (1987) entspricht das der optimalen Auslegung einer zweistufigen Anlage. Die Biomassekonzentration und der Ethanolgehalt als Funktion der Durchflußrate bei 15 % oder 17 % (w/v) Glukose waren nur geringfügig verschieden (Abb. 3). Bei 20 % (w/v) Glukose im Medium dagegen war die Fermentation mit einer μ_{max} von 0.149 (1/h) deutlich langsamer. Die kinetischen Daten und Ausbeuten für Durchflußraten mit maximaler Biomassekonzentration sind in Tab. 1 dargestellt. Bei gleicher Ethanolkonzentration im Fermenter nahmen die spezifische Glukoseverbrauchsrate und

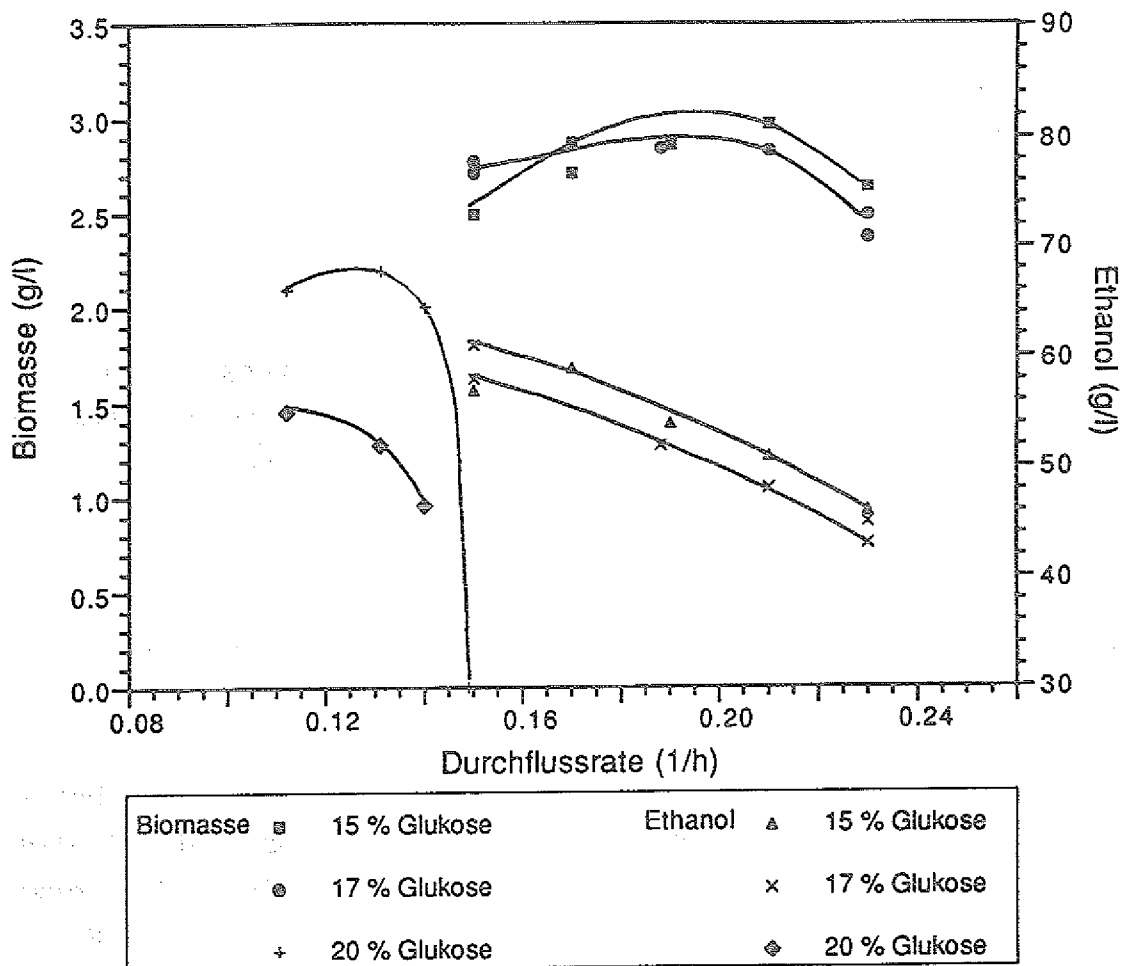


Abb. 3: Steady-State Biomasse- und Ethanolkonzentrationen für *Zymomonas mobilis* in kontinuierlichen Fermentationen mit 15, 17 oder 20 % (w/v) Glukose im Medium. Der Bereich der Durchflußraten wurde so gewählt, daß ca. 50 g/l Ethanol gebildet werden konnte.

Ethanolbildungsraten mit zunehmender Glukosekonzentration im Medium geringfügig ab. Bei 17 % (w/v) Glukose waren die Ethanolkonzentration und volumetrische Produktivität 5 % niedriger als bei 15 % (w/v) Glukose. Bei 20 % (w/v) Glukose war die Wachstumsrate um 31 % und die Biomasseausbeute um 30 % geringer. Folglich waren die volumetrische Ethanol- und Biomasseproduktivität um 33 % bzw. 47 % niedriger. Hohe Glukosekonzentrationen im Medium führten somit zu niedrigeren Wachstumsraten und geringeren Produktivitäten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden zweistufige Fermentationen mit den in Tab. 1 gezeigten Durchflußraten für die erste Stufe durchgeführt. Um eine Ethanol-Endkonzentration von 100 g/l erreichen zu können, wurde in der zweiten Stufe eine 50 %-ige Glukoselösung zudosiert, so daß über erste und zweite Stufe ver-

Tab. 1: Vergleich der kinetischen Parameter für *Zymomonas mobilis* in kontinuierlichen Fermentationen mit 15 %, 17 % oder 20 % (w/v) Glukose im Medium. Die Durchflußraten mit maximaler Biomassekonzentration und vergleichbaren Ethanolkonzentration wurden dargestellt.

Glukose im Substrat (%)	15	17	20
Durchflußrate (l/h)	0.19	0.188	0.13
Ethanol (g/l)	54	52	53
spez. Glukose-verbrauchsrate (g/g*h)	7.6	7.2	7.0
spez. Ethanol-bildungsrate (g/g*h)	3.6	3.4	3.2
Ethanolausbeute (%)	93	93	90
Biomasseausbeute (g/g)	0.025	0.026	0.018
Vol. Biomasse-produktivität (g/l*h)	0.545	0.536	0.288
Vol. Ethanol-produktivität (g/l*h)	10.3	9.8	6.9

teilt, insgesamt 205-208 g Glukose/l umgesetzt werden konnten. Diese Zudosierung bewirkte unterschiedliche Verdünnungen in den Effluenten der ersten Stufe mit 15 %, 17 % oder 20 % (w/v) Glukose im Medium. Deswegen waren in der zweiten Stufe die Biomassekonzentration und folglich die volumetrische Ethanolproduktivität für die Fermentation mit 17 % (w/v) Glukose im Medium der ersten Stufe höher als mit 15 % (w/v) Glukose (Tab. 2).

Die Fermentation mit 20 % (w/v) Glukose im Medium der ersten Stufe hatte auch in der zweiten Stufe eine geringere volumetrische Ethanolproduktivität als mit 15 % oder 17 % (w/v). Dies war die Folge der, trotz einer geringen Verdünnung, immer noch niedrigeren Biomassekonzentration und der geringeren spezifischen Ethanolbildungsrate. Für die zwei Stufen zusammen führte eine über beide Stufen verteilte Zufütterung der Glukose somit zu einer mindestens 25 % höheren gesamt-volumetrischen Ethanolproduktivität. Die Verdünnung von Ethanol und Biomasse im Zufluß zur zweiten Stufe durch die Zugabe der 50-%igen Glukoselösung wurde von der höheren Biomassekonzentration, der höheren spezifischen Aktivität sowie der höheren volumetrischen Produktivität der ersten Stufe mehr als ausgeglichen. Für die Bildung von 100 g/l

Tab. 2: Vergleich der kinetischen Parameter für *Zymomonas mobilis* in den zweiten Stufen von kontinuierlichen, zweistufigen Fermentationen bei über beide Stufen variierteter Verteilung der Glukose. Die gesamt-volumetrische Ethanolproduktivität ist ebenfalls angegeben. Die Fermentationsparameter der ersten Stufen entsprechen den Daten in Tab. 1 und Abb. 2.

Glukose im Medium der 1. Stufe (%)	15	17	20
Verdünnung durch Glukose-Zudosierung (-)	1.2	1.12	1.03
Durchflußrate (l/h)	0.053	0.058	0.050
Ethanol (g/l)	101	99	98
Spez. Ethanolbildungsrate (g/g*h)	1.12	1.11	1.03
Ethanolausbeute (%)	98	95	101
Biomasseausbeute (g/g)	0.0028	0.0021	0.0012
Vol. Ethanolproduktivität (g/l*h)	3.0	3.1	2.3
Gesamt-vol. Ethanolproduktivität (g/l*h)	4.3	4.5	3.6

Ethanol sind Glukosekonzentrationen von 15 oder 17 % (w/v) im Medium der ersten Stufe optimal, da dies die höchsten Konzentrationen sind, die in der ersten Stufe keine oder geringe Substratinhibierung bewirken, so daß die Verdünnung von Biomasse und Ethanol im Zufluß zur zweiten Stufe minimal ist.

Die Biomasseausbeuten in der zweiten Stufe waren eine Größenordnung kleiner als die der ersten Stufe. Dies entspricht der Funktion der zweiten Stufe, vom Wachstum entkoppelt, hohe Ethanolkonzentrationen zu bilden. Interessant hierbei ist, daß trotz der hohen Ethanolkonzentration, bei der *Z. mobilis* normalerweise nicht mehr wachsen kann, die Biosynthese in der zweiten Stufe nicht vollständig inhibiert wird.

Bei den zweistufigen Fermentationen wurde auch die Nebenproduktbildung untersucht. Acetat, Acetoin, D-Laktat, Glycerin und Dihydroxyaceton konnten als Nebenprodukte des Glukosestoffwechsels

Tab. 3: Vergleich der Nebenproduktbildung von *Zymomonas mobilis* in kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen bei über beide Stufen variierter Verteilung der Glukose. Insgesamt wurde über beide Stufen verteilt 205-208 g/l Glukose umgesetzt. Die Fermentationsparameter entsprechen den Daten in Tab. 1, Tab. 2 und Abb. 3.

Glukose % (w/v) im Medium der 1. Stufe	15		17		20	
Stufe	1	2	1	2	1	2
Nebenprodukte (g/l)						
Acetat	0.24	0.43	0.25	0.46	0.28	0.45
Acetoin	0.85	0.73	0.76	0.95	0.82	0.97
D-Laktat	0.31	0.30	1.02	1.62	1.96	2.42
Glycerin	0.10		0.07	0.48	0.10	0.64
Dihydroxy-aceton	0.06	}0.79	0.07	0.26	0.09	0.49
Anteil in C-Bilanz (%)	1.60	0.9	2.2	1.7	3.0	2.1

in allen Fermentationen nachgewiesen werden (Tab. 3). Außerdem wurde Acetaldehyd gebildet, der jedoch wegen seiner hohen Flüchtigkeit nicht quantitativ erfaßt werden konnte. In der ersten Stufe mit 15 % Glukose im Medium waren die Nebenproduktausbeuten vergleichbar mit Literaturdaten für Batchfermentationen (Amin et al., 1983) und machten insgesamt 1.6 % der umgesetzten Glukose aus. Alle nachgewiesenen Nebenprodukte wurden auch in der zweiten Stufe gebildet, wobei die Ausbeute an Glycerin und Dihydroxyaceton höher, die Gesamtausbeute jedoch geringer war. Da die Nebenproduktbildung zum Teil auf einen Verbrauch von Redoxequivalenten beim Wachstum zurückzuführen ist, führt eine Entkopplung der Ethanolbildung vom Wachstum -wie in der zweiten Stufe- zu einer Abnahme der Nebenproduktausbeute (Amin et al. 1983).

Bei zunehmender Glukosekonzentration im Medium der ersten Stufe nahm die D-Laktatbildung stark zu (Tab. 3). Der Grund hierfür ist noch ungeklärt. Bei anderen Ethanol produzierenden Bakterien konnte eine Zunahme der Laktatbildung bei steigenden Glukosekonzentrationen mit einer Erhöhung der Laktatdehydrogenaseaktivität

erklärt werden (Germain et al. 1986, Schmid 1987). In *Zymomonas mobilis* wurde die Laktatdehydrogenase bislang nicht charakterisiert.

Die beobachtete Abhängigkeit der Nebenproduktbildung von der Glukosekonzentration der ersten Stufe zeigt, daß eine über beide Stufen verteilte Zufütterung der Glukose nicht nur zu höheren volumetrischen Produktivitäten, sondern auch zu geringerer Nebenproduktbildung führt. In Anbetracht der relativ hohen Substratkosten, ist eine Glukosekonzentration von 15 % (w/v) im Medium der ersten Stufe zu bevorzugen, da bei dieser Konzentration die Nebenproduktbildung um 60 % geringer ist als bei 17 % (w/v) Glukose.

1.2. pH Optimum der ersten Stufe

Wie Lawford et al. (1988) zeigen konnten, ist die Biomasseausbeute von *Zymomonas mobilis* vom pH-Wert der Kultur abhängig und hat ein Optimum bei pH 6. Die vorher beschriebenen Untersuchungen zur Fermentationskinetik von *Zymomonas mobilis* in zweistufigen Fermentationen waren jedoch bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt worden. Es wurde daher untersucht, ob eine Änderung des pH-Werts der ersten Stufe zu einer Steigerung der Biomassekonzentration und der volumetrischen Ethanolproduktivität führen kann. Bei pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 und 6.5 wurden kontinuierliche Fermentationen bei einer Durchflußrate von 0.19 (l/h) mit 15 % (w/v) Glukose im Medium durchgeführt. Abbildung 4A zeigt, daß die Biomasseausbeute von pH 4.5 bis pH 6.0 tatsächlich um 16 % zunahm, während gleichzeitig die spezifische Glukoseverbrauchsrate abnahm. Bei diesen Fermentationen war das Substrat im Überschuß anwesend, so daß die Durchflußrate der maximalen Wachstumsrate bei der im steady State erreichten Ethanolkonzentration entspricht. Der Einfluß des pH auf die steady State Konzentrationen für Ethanol und Biomasse ist in Abbildung 4B dargestellt. Zwischen pH 5.0 und pH 5.5 waren die Ethanol- und Biomassekonzentrationen maximal. Bei höheren pH-Werten nahmen beide ab und bei einem pH-Wert von 6.5 trat Ausspülung auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Erhöhung des pH-Wertes der ersten Stufe auf 6 nicht wünschenswert, während pH 5 bis 5.5 zu maximalen Ethanol- und Biomassekonzentrationen und volumetrischen Produktivitäten führt.

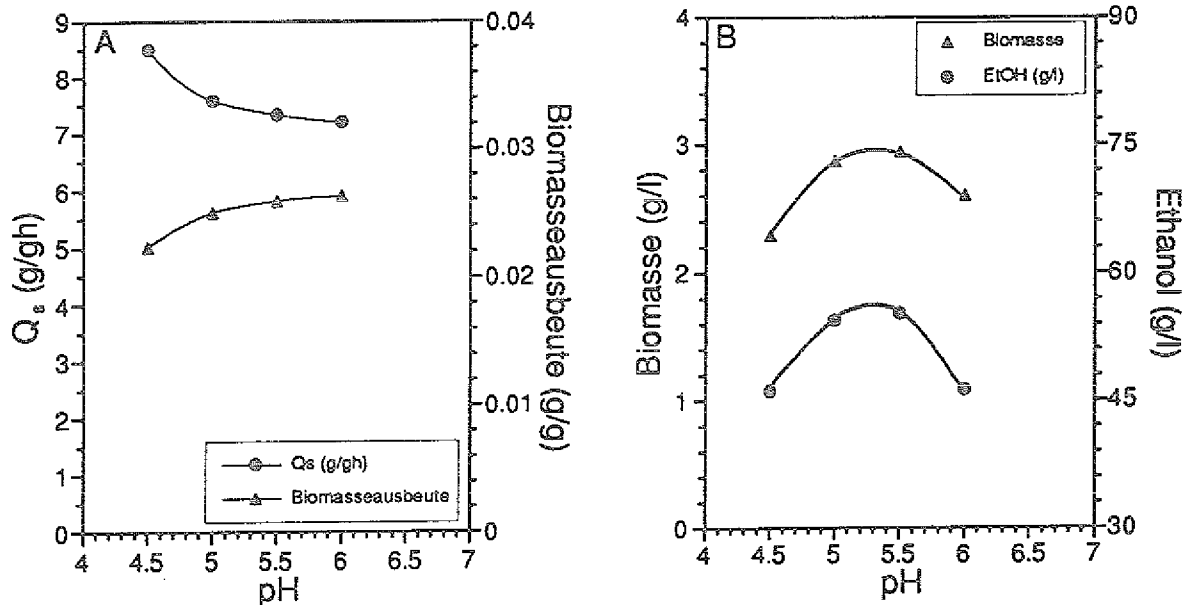


Abb. 4: Fermentationskinetik von *Zymomonas mobilis* als Funktion des pH-Wertes. A: Biomasseausbeute und spezifische Glukoseverbrauchsrate. B: Ethanol- und Biomassekonzentration.

Die Daten wurden in kontinuierlichen Fermentationen bei pH 4.5 bis 6.5 mit einer Durchflußrate von 0.19 (1/h) und 15 % (w/v) Glukose im Medium ermittelt.

1.3 Die maximal erreichbare Ethanolkonzentration in zweistufigen Fermentationen.

Neben dem Einfluß von Kulturbedingungen auf die Fermentationskinetik in zweistufigen Fermentationen ist die maximal in der zweiten Stufe erreichbare Ethanolkonzentration von Interesse. Dazu wurde bei einer zweistufigen Fermentation mit 15 % Glukose im Medium der ersten Stufe die Zudosierung der Glukose in der zweiten Stufe erhöht, so daß insgesamt 250 g/l Glukose zu Ethanol umgesetzt werden konnten. Die Verweilzeit der zweiten Stufe wurde von 19 auf 50 Stunden erhöht. Die Ethanolkonzentration erreichte dabei jedoch nur 104 g/l, wobei 38 g/l Glukose nicht umgesetzt wurden. Es ist anzunehmen, daß die 1.4-fache Verdünnung von Biomasse und Ethanol in der zweiten Stufe durch Zudosierung der Glukose für die geringe Steigerung der Ethanolkonzentration mitverantwortlich war. Daher wurde die Zudosierung reduziert und außerdem die Verweilzeit sowie die Ethanolkonzentration der er

Tab. 4: Kinetische Daten der zweiten Stufe bei variabler Verweilzeit und gleicher Verdünnung im Zufluß durch Zudosierung der Glukose.

Durchflußrate (1/h)	0.049	0.020
Ethanol (g/l)	101	107
Verdünnung durch Zudosierung (-)	1.26	1.27
Restglukose (g/l)	14	5
Spez. Ethanolbildungsrate (g/g*h)	1.16	0.47
Vol. Ethanolproduktivität (g/l*h)	2.83	1.18
Gesamt-vol. Ethanolproduktivität (g/l*h)	4.1	1.9

Das Substrat im Medium der ersten Stufe enthielt 15 % (w/v) Glukose. Bei der Durchflußrate 0.049 1/h entsprach die Kinetik der ersten Stufe den Ergebnissen die in § 1.1 beschrieben sind. Bei der Durchflußrate 0.020 1/h betrug die Durchflußrate der ersten Stufe 0.15 1/h und die Ethanolkonzentration 61 g/l.

sten Stufe erhöht. Maximal wurden so im steady State 107 g/l Ethanol erreicht. Tab. 4 zeigt die kinetischen Daten der zweiten Stufe. Die Verdoppelung der Verweilzeit und die geringe Zunahme der Ethanolkonzentration bewirkten eine mehr als 50 %-ige Abnahme der spezifischen Ethanolbildungsrate. Zur Fermentationskinetik bei hohen Ethanolkonzentrationen stehen aus der Literatur kaum Daten zur Verfügung. Die meisten Modellierungen basieren auf den Ergebnissen für ZM4 von Lee und Rogers (1983) aus kontinuierlichen Fermentationen bis 82 g/l Ethanol. Auf Grund der maximal erreichten Ethanolkonzentrationen in Batchfermentationen extrapolierten diese Autoren die spezifischen Glukoseverbrauchsrate linear auf Null bei 127 g/l Ethanol. Die Einflüsse von Ethanolkonzentration und Verweilzeit auf die spezifische Ethanolbildungskapazität bzw. Glukoseverbrauchsrate bei hohen Ethanolkonzentrationen wurden hier einzeln untersucht, um damit abzuschätzen, ob und wie noch höhere Ethanolkonzentrationen in der zweiten Stufe erreicht werden können.

Im Bereich 80 bis 132 g/l Ethanol wurden die spezifischen Anfangsraten für den Glukoseverbrauch in Abhängigkeit von der

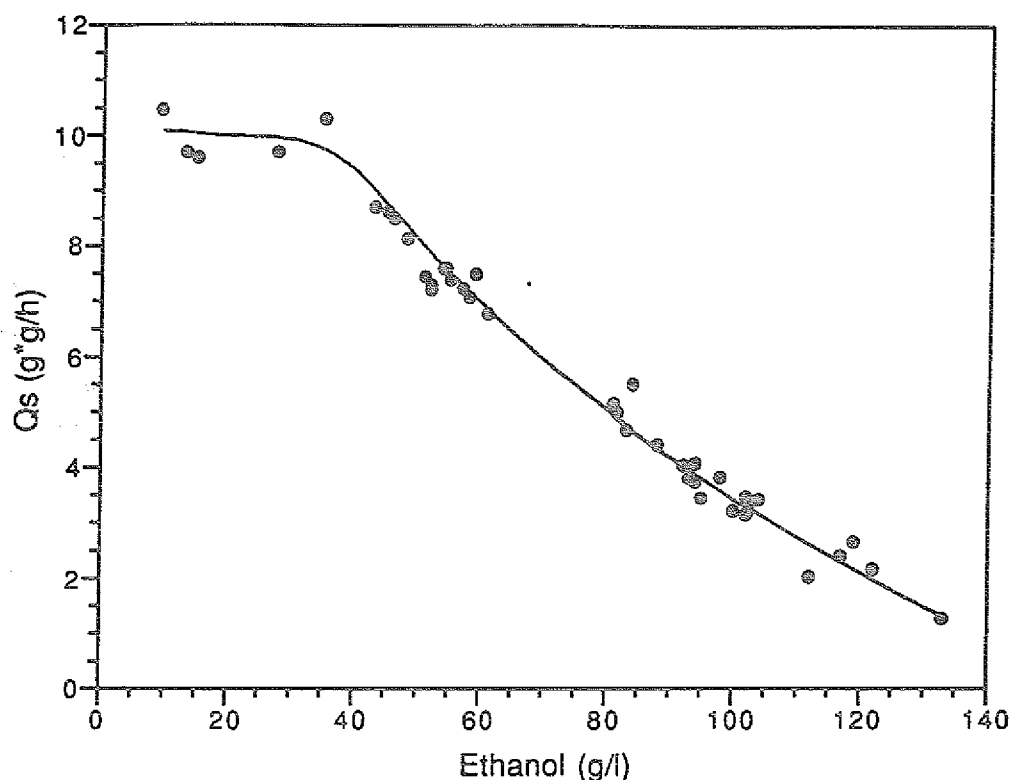


Abb. 5: Spezifische Glukoseverbrauchsrate von *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration im Medium.

Die Raten bis einschließlich 60 g/l Ethanol wurden in kontinuierlichen, nicht-glukoselimitierten Fermentationen gemessen. Ab 80 g/l Ethanol wurden die Raten aus der Abnahme der Glukosekonzentration oder aus der CO_2 -Bildung während einer Stunde in anaeroben Medien mit entsprechenden Ethanolkonzentrationen ermittelt.

Ethanolkonzentration ermittelt. Hierzu wurde die Abnahme der Glukosekonzentration oder die Bildung von CO_2 über eine Stunde in anaeroben Medien mit entsprechenden Ethanolkonzentrationen gemessen. Ein Vergleich dieser Raten mit den in kontinuierlichen, nicht-glukoselimitierten Fermentationen mit Ethanolkonzentrationen bis zu 60 g/l Ethanol ermittelten Raten zeigte, daß ab 35 g/l Ethanol die spezifische Glukoseverbrauchsrate fast linear mit steigender Ethanolkonzentration abnahm (Abb. 5). Ein entsprechender Schwellenwert für die Inhibierung des Glukosekatabolismus durch Ethanol wurde auch von Rogers et al. (1983) für ZM1 und ZM4 beschrieben. Zwischen 30 und 90 g/l Ethanol stimmten die Ergebnisse in Abb. 5 sehr gut mit der Korrelation von Posten (1987) für ZM6 überein. Bei 132 g/l Ethanol betrug die Restaktivität noch 12 % ; eine Extrapolation deutet darauf hin, daß der

Glukoseumsatz erst bei Ethanolkonzentrationen > 150 g/l vollständig inhibiert wird. Ferner zeigt Abb. 5, daß der Anfangswert der spezifischen Glukoseverbrauchsrate bzw. Ethanolbildungsrate bei 107 g/l Ethanol nur etwa 12 % niedriger als bei 100 g/l Ethanol war. In der zweiten Stufe der zweistufigen Fermentation war die spezifische Ethanolbildungsrate bei 107 g/l in Vergleich zu 101 g/l Ethanol jedoch um mehr als die Hälfte niedriger (Tab. 4). Dieser Unterschied läßt einen bedeutenden Effekt der Verweilzeit auf die spezifische Ethanolbildungsrate vermuten. Deswegen wurde der Einfluß der Inkubationszeit auf die CO_2 -Bildungsrate in 100, 110 und 120 g/l Ethanol ermittelt (Abb. 6).

Bei Inkubation in Medium mit 100 g/l Ethanol blieb die Glukoseverbrauchsrate etwa 5 Stunden konstant, bevor eine weitere, langsame Desaktivierung erfolgte. Aus dem Aktivitätsverlauf als Funktion der Zeit konnte für 100 g/l Ethanol eine Halbwertszeit

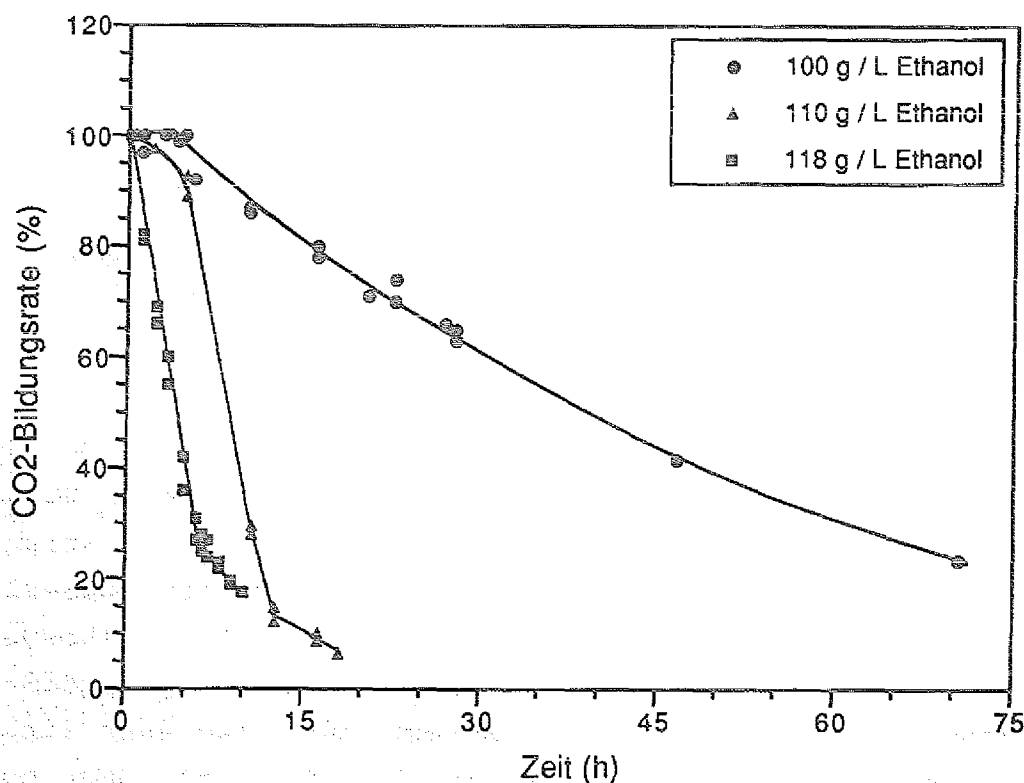


Abb. 6: CO_2 -Bildungsrate von *Zymomonas mobilis* in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 100, 110 oder 120 g/l Ethanol.

Die relativen CO_2 -Bildungsraten beziehen sich auf die Anfangsrate bei der jeweiligen Ethanolkonzentration.

der Desaktivierung von 40 Stunden berechnet werden. Bei 110 g/l Ethanol nahm die CO_2 -Bildungsrate während den ersten 5 Stunden um 10 % ab und war nach 8,5 Stunden halbiert. Bei Inkubation mit 120 g/l Ethanol nahm die CO_2 -Bildungsrate bereits während der ersten Stunde ab und war nach 4 Stunden halbiert. Die Ergebnisse der Abb. 5 und 6 zeigen, daß bei entsprechend hohen Ethanolkonzentrationen die spezifische Ethanolbildungsrate von sowohl der Ethanolkonzentration als auch der Inkubationszeit abhängig ist. Zudem nimmt bei zunehmender Ethanolkonzentration die spezifische CO_2 - bzw. Ethanolbildungsrate immer stärker mit der Inkubationszeit ab. Die gemessene spezifische Ethanolbildungsrate in der zweiten Stufe einer kontinuierlichen zweistufigen Fermentation stellt deswegen einen Mittelwert dar, der sich aus der Altersverteilung der Zellen ergibt.

Da die zweite Stufe als ideal gemischter Rührkessel zu betrachten ist, kann die mittlere spezifische Ethanolbildungsrate $\overline{Q_e}$ wie folgt aus dem Verweilzeitspektrum und die Ethanolbildungsrate als Funktion der Zeit $Q(t)$ berechnet werden (Siehe Anhang 1 für die Herleitung) :

$$\overline{Q_e} = \frac{1}{\tau} * \int_{t=0}^{t=\infty} \exp(-t/\tau) * Q(t) dt \quad (1)$$

τ = mittlere Verweilzeit = Kehrwert der Durchflußrate

Mit den Daten aus Abb. 6 für die CO_2 - bzw. Ethanolbildungsrate als Funktion der Zeit bei 100 g/l und einer Durchflußrate von 0.049 (1/h) wurde mit der Gleichung (1) eine mittlere spezifische Ethanolbildungsrate von 1.30 g/g*h berechnet, was gut mit dem experimentell ermittelten Wert von 1.16 g/g*h übereinstimmt (Tab. 4).

Die maximal erreichbare Ethanolkonzentration der zweiten Stufe kann ebenfalls aus den Daten für die CO_2 - bzw. Ethanolbildungsrate als Funktion der Zeit abgeschätzt werden. Dazu wurde für 100, 110 und 120 g/l Ethanol in der zweiten Stufe (E2) berechnet, welche Differenz (ΔE_2) bei der Ethanolkonzentration zwischen erster und zweiter Stufe maximal überbrückt werden kann

und welche Biomassekonzentration (X) und Ethanolkonzentration (E1) beim Zufluß zur zweiten Stufe daher minimal notwendig sind:

$$E1 = E2 - \Delta E2 \quad (2)$$

$$\Delta E2 = X * \tau * Q_e(EtOH, \tau) \quad (3)$$

$\Delta E2$ nimmt nach Gleichung (3) mit der Verweilzeit τ zu, aber die Zunahme wird durch die gleichzeitige Abnahme der mittleren spezifischen Aktivität abgeschwächt. $\Delta E2$ wird maximal bei unendlicher Verweilzeit und beträgt:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \Delta E2 = \lim_{\tau \rightarrow \infty} (X * \tau * Q_e(EtOH, \tau)) \quad (4)$$

$$= \lim_{\tau \rightarrow \infty} (X * \tau * \frac{1}{\tau} * \int_{t=0}^{t=\infty} \exp(-t/\tau) * Q(t) dt) \quad (5)$$

$$= \lim_{\tau \rightarrow \infty} (X * \int_{t=0}^{t=\infty} \exp(-t/\tau) * Q(t) dt) \quad (6)$$

$$= X * \int_{t=0}^{t=\infty} Q(t) dt \quad (7)$$

Gleichung (7) sagt aus, daß bei gegebener Ethanolkonzentration in der zweiten Stufe die maximale der Differenz in Ethanolkonzentration zwischen erster und zweiter Stufe pro Gramm Biomasse den Flächen unter den Kurven $Q_e(t)$ -Zeit (Abb. 6) entspricht. Da $Q(t)$ auf Null zugeht, ist $\Delta E2$ begrenzt. Die Grenzwerte der spezifischen Ethanolbildung wurden nach Gleichung (7), anhand der experimentell bestimmten CO_2 - bzw. Ethanolbildungsraten, als Funktion der Zeit (Abb. 6) für jede Ethanolkonzentration berechnet (Tab. 5). Mit diesen Grenzwerten der spezifischen Ethanolbildung wurde die minimal notwendige Ethanolkonzentration beim Zufluß zur zweiten Stufe als Funktion der Biomassekonzentration nach Gleichung (3) berechnet. Die Ergebnisse für 100, 110 und 120 g/l Ethanol in der zweiten Stufe sind als Geraden in Abb. 7 dargestellt. Die schraffierte Fläche in Abb. 7 umfaßt den

Tab. 5: Grenzwerte der spezifischen Ethanolbildung als Funktion der Ethanolkonzentration.

Ethanol (g/l)	$\Delta E2/X$ (g/g)
100	75
110	14.08
120	7.07

Die Grenzwerte wurden nach Gleichung (7) anhand der experimentell bestimmten Abhängigkeit der CO_2 - bzw. Ethanolbildungsrate von der Inkubationszeit (Abb. 6) berechnet.

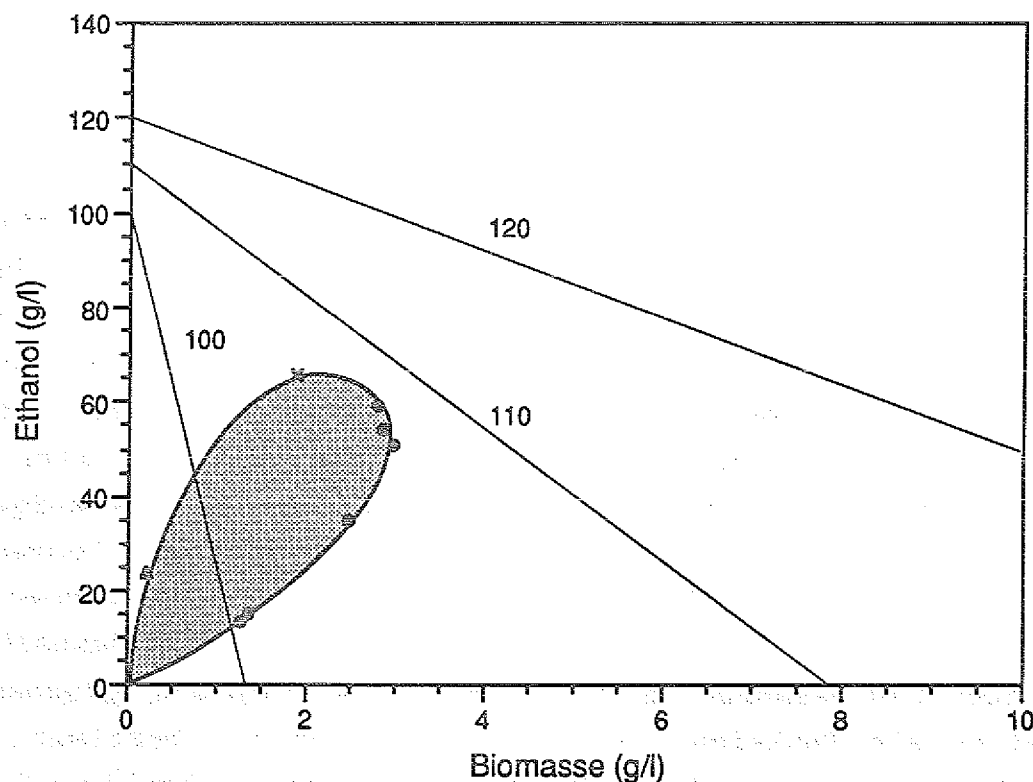


Abb. 7: Minimal erforderliche Ethanolkonzentration beim Zufluß zur zweiten Stufe als Funktion der Biomassekonzentration und Ethanolkonzentration in der zweiten Stufe.

Die minimal notwendige Ethanolkonzentration wurde mit den Grenzwerten der spezifischen Ethanolbildung aus Tab. 5 als Funktion der Biomassekonzentration nach Gleichung (2) berechnet. Die schraffierte Fläche umfaßt den Bereich der erreichbaren Kombinationen von Biomasse- und Ethanolgehalt der ersten Stufe. (• eigene Daten, x Schmidt 1985, ▲ Jöbses et al. 1985)

Bereich der erreichbaren Kombinationen von Biomasse- und Ethanolgehalt der ersten Stufe. Die Überlappung zwischen dieser schraffierten Fläche und der Geraden für 100 g/l Ethanol zeigt, daß die Bildung von 100 g/l Ethanol schon bei Biomassekonzentrationen ab etwa 0.8 g/l, oder Ethanolkonzentrationen ab 12 g/l im Zufluß zur zweiten Stufe möglich ist. Die Gerade für 110 g/l Ethanol in der zweiten Stufe jedoch berührt die schraffierte Fläche bereits nicht mehr, so daß die minimal notwendigen Anforderungen an Biomasse- und Ethanolkonzentration im Zufluß zur zweiten Stufe nicht erfüllt werden können. Die maximal erreichbare Ethanolkonzentration in der zweiten Stufe wird somit von der Halbwertszeit der spezifischen Ethanolbildungsaktivität auf einen Wert unter 110 g/l begrenzt. Der experimentell bestimmten Wert von 107 g/l ist mit diesem Ergebnis in guter Übereinstimmung.

1.4. Einfluß von Ethanol auf die zellinterne Glukosekonzentration

Trotz Kaskadierung wurden auch in zweistufigen Fermentationen die spezifische und folglich die volumetrische Ethanolbildungsrate durch Produktinhibierung reduziert. Es ist bislang unbekannt, ob diese Abnahme durch Inhibierung des zellinternen Abbaus von Glukose oder durch Inhibierung des Glukosetransportes bedingt ist. Da Glukose sehr schnell mittels erleichterter Diffusion (Dimarco und Romano 1985) von *Zymomonas mobilis* aufgenommen wird, war es nicht möglich, die Transportrate auf konventionelle Weise über die Akkumulation von radioaktiv markierter Glukose zu ermitteln (Fuhrmann et al. 1989). Es wurde deshalb bei konstanter Glukoseaußenkonzentration die zellinterne Glukosekonzentration als Funktion der Ethanolkonzentration bestimmt. Dazu wurde in kontinuierlichen Fermentationen die Ethanolkonzentration von 10 bis 50 g/l Ethanol variiert, und die Glukosekonzentration bei ca. 75 g/l Glukose eingestellt. Aus der kontinuierlichen Fermentation bei 48 g/l Ethanol wurden außerdem Proben entnommen, die vor Messung der zellinternen Glukosekonzentration 15 Minuten anaerob bei Ethanolkonzentrationen zwischen 65 und 90 g/l inkubiert wurden. Die Ergebnisse für externe und zellinterne Glukosekonzentrationen sowie die spezifischen Glukoseverbrauchsrate sind in Abb. 8 dargestellt. Bei den höchsten spezifischen

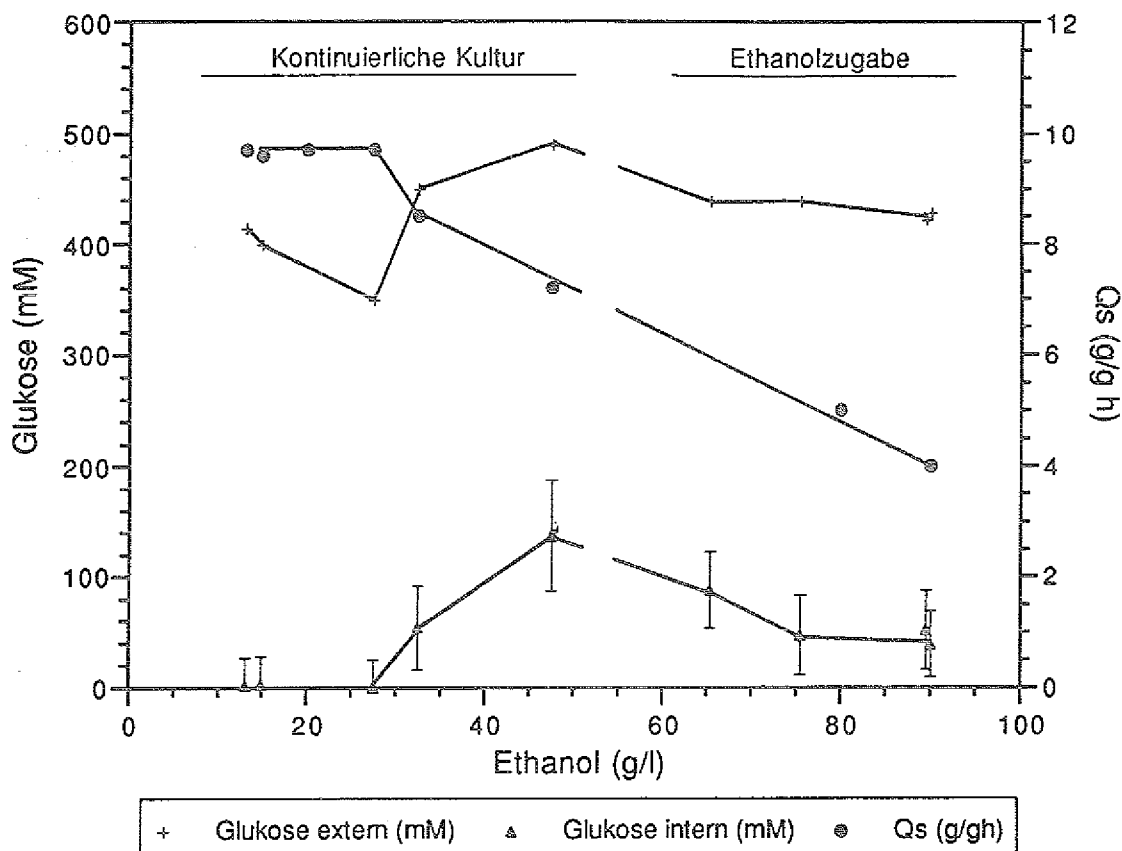


Abb. 8: Die zellinterne Glukosekonzentration und spezifische Glukoseverbrauchsrate von *Zymomonas mobilis* als Funktion der Ethanolkonzentration.

Die Daten bis einschließlich 48 g/l Ethanol wurden an Proben aus kontinuierlichen Fermentationen ermittelt. Für die Daten bei 65 bis 90 g/l Ethanol wurden Proben aus der kontinuierlichen Fermentation bei 48 g/l Ethanol entnommen und vor den Messungen 15 min anaerob, mit zugegebenem Ethanol, inkubiert.

Glukoseverbrauchsrate bis 30 g/l Ethanol war die zellinterne Glukose kaum nachweisbar und der Gradient der Glukose über der Membran sehr groß. Die zellinterne Glukosekonzentration stieg zwischen 30 und 50 g/l Ethanol bei gleichzeitig absinkender spezifischer Glukoseverbrauchsrate an, so daß der Glukosegradient (Außen/Innen) abnahm. Zwischen 65 - 90 g/l Ethanol nahm die zellinterne Glukosekonzentration leicht ab und der Glukosegradient über der Membran stieg von 5.5 bis 10.5 an.

Bei geringen Ethanolkonzentrationen wird der maximale katabole Flux in *Zymomonas mobilis* bei Abbau von Glukose wahrscheinlich vom ersten Enzym des Entner-Doudoroff-Weges, der Glukokinase, bestimmt (Belaich et al. 1968, Algar und Scopes 1985). Der Km-Wert der Glukokinase für Glukose beträgt 0.25 - 0.4 mM (Doelle 1982, Dimarco und Romano 1985). Bei den zellinternen Glukosekonzentrationen, die bei Ethanolkonzentrationen über 30 g/l gemes-

sen wurden, ist die Glukokinaseaktivität nicht mehr von der Glukosekonzentration abhängig. Der Anstieg der zellinternen Glukosekonzentration bei zunehmender Ethanolkonzentration im Medium zeigt deshalb, daß die gleichzeitige Abnahme der spezifischen Glukoseverbrauchsrate nicht durch Inhibierung des Carriers sondern durch Inhibierung des zellinternen Stoffwechsels verursacht wurde.

2. Einfluß hoher Ethanolkonzentrationen auf die Physiologie von *Zymomonas mobilis*

Die zweistufige Ethanolfermentation ist nicht nur wegen der kontinuierlichen Bildung hoher Ethanolkonzentrationen, sondern auch wegen der Möglichkeit, Langzeiteffekte hoher Ethanolkonzentrationen auf die Physiologie von *Zymomonas mobilis* untersuchen zu können, von Interesse. Bei Zellen aus der zweiten Stufe mit 100 g/l Ethanol wurden Energy Charge, pH-Gradienten, Enzymaktivitäten, katabole Kapazität und Lebensfähigkeit ermittelt und mit den Werten von exponentiell wachsenden Zellen der ersten Stufe verglichen. Ferner wurde in Batchfermentationen der Übergang von der ersten zur zweiten Stufe durch Ethanolzugabe simuliert, um Kurzzeiteffekte der hohen Ethanolkonzentrationen auf die Physiologie von *Zymomonas mobilis* erfassen zu können. Dabei waren vor allem die Änderungen der Wachstums- und Biosynthesevorgänge von Interesse, da die Biomasseausbeuten der zweiten Stufe gezeigt hatten, daß die Biosynthese nach Übergang der Zellen von der ersten zur zweiten Stufe nicht sofort vollständig von den hohen Ethanolkonzentrationen inhibiert wird.

2.1. Einfluß hoher Ethanolkonzentrationen auf zellinternen pH und Energy charge

Ein wichtiger Faktor der Zellphysiologie ist das Niveau des zellinternen pH-Wertes und dieser wird im allgemeinen von der Zelle stark reguliert (Booth 1985). Während Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* wurde jedoch beobachtet, daß der zellinterne pH bei steigenden Ethanolkonzentrationen im Medium parallel mit der spezifischen Ethanolbildungsrate abnahm (Osman et al. 1987). Es wurde daher untersucht, wie der zellinterne pH von hohen Ethanolkonzentrationen in der ersten und zweiten Stufe beeinflusst wird. Dazu wurden bei einem pH-Wert von 5.0 im Kulturmedium die zellinternen pH-Werte in beiden Stufen gemessen. Der Vergleich dieser zellinternen pH-Werte mit den bei Ethanolkonzentrationen bis zu 33 g/l ermittelten, zeigte, daß pH-Gradient und zellinterner pH-Wert bereits in der ersten Stufe bei 53 g/l Ethanol reduziert waren (Tab. 6). In der zweiten Stufe nahm der zellinterne pH weiter ab und der pH-Gradient betrug nur noch 0.1. Bei Ethanolkonzentrationen über 33 g/l wird also die Fähigkeit von *Zymomonas mobilis* zur pH-Homöostasis zunehmend re-

Tab. 6: Zellinterner pH-Wert in *Zymomonas mobilis* als Funktion der Ethanolkonzentration sowie des pH-Wertes im Kulturmedium.

pH-Wert Kulturmedium	Ethanol (g/l)	pH-Wert zellintern
5.0	15	6.0
5.0	20	6.0
5.0	33	6.1
5.0	54	5.6
5.0	101	5.1
5.5	53	5.9
5.5	101	5.6

Die zellinternen pH-Werte bei Ethanolkonzentrationen bis 33 g/l wurden in kontinuierlichen turbidostatischen Fermentationen (Abb. 8) ermittelt. Die zellinternen pH-Werte bei 54 und 101 g/l Ethanol wurden in der ersten bzw. der zweiten Stufe von kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen ermittelt.

duziert. Eine Steigerung des pH-Wertes des Kulturmediums auf 5.5 führte in beiden Stufen zu einer Erhöhung des zellinternen pH-Wertes (Tab. 6). Die spezifischen Ethanolbildungsraten nahmen jedoch bei pH 5.5 oder 6.0 nicht zu. Entgegen der Vermutung von Osman et al. (1987) ist die Abnahme des zellinternen pH-Wertes nicht die Ursache für die Abnahme der spezifischen Ethanolbildungsrate.

Steigende Ethanolkonzentrationen erhöhen den passiven Influx von Protonen und entkoppeln so den pH-Gradienten über der Membran (Leao und Van Uden 1984, Enequist et al. 1981, Cartwright et al. 1986). Das Aufrechterhalten des zellinternen pH-Wertes kostet Energie; es wurde daher untersucht, ob die Abnahme des pH-Gradienten von der ersten zur zweiten Stufe auf Energiemangel zurückzuführen ist. Dazu wurden für erste und zweite Stufe die intra- und extrazellulären ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen bestimmt. Die hiermit berechneten Werte des Energy Charge in *Z. mobilis* Zellen der ersten und der zweiten Stufe waren gleich hoch (Tab. 7) und entsprachen den allgemein in Bakterien gefundenen Verhältnissen mit Werten zwischen 0.7 und 0.95 unter optimalen Bedingungen (Karl 1980, Chapman und Atkinson 1977). Der gesamte zellinterne Nukleotidpool in Zellen der zweiten Stufe

Tab. 7: Adeninnukleotidkonzentrationen und Energy Charge in *Zymomonas mobilis* Zellen der ersten und zweiten Stufe von kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen.

	1. Stufe	2. Stufe
<u>zellintern:</u>		
ATP	5.1 mM	4.4 mM
ADP	1.0 mM	0.8 mM
AMP	0.1 mM	0.2 mM
E.C.	0.91	0.89
<u>zelleextern:</u>		
AMP	1.4%	2.7%

Die AMP-Konzentration des Kulturüberstandes ist dargestellt als Prozent des gesamten Adeninnukleotidpools der Kultur.

war zwar im Mittel 12 % kleiner als in Zellen der ersten Stufe; die zellinternen ATP-Konzentrationen in *Z. mobilis* aber waren bei den hohen Ethanolkonzentrationen in beiden Stufen (Tab. 7) nicht geringer als der Wert von 3.5-4 mM, ermittelt bei geringen Ethanolkonzentrationen (Belaich und Lazdunski 1972, Ruhrmann und Krämer 1992). Ferner war die AMP-Konzentration im Überstand in beiden Stufen gering, so daß das Niveau des Energy Charge wahrscheinlich nicht auf Kosten des zellinternen Pools aufrechterhalten wurde (Chapman und Atkinson 1977). Die Abnahmen des pH-Gradienten und des zellinternen pH-Wertes in *Z. mobilis* Zellen der ersten und der zweiten Stufe sind somit nicht auf Energiemangel zurückzuführen.

In Abwesenheit von Atmung wird der pH-Gradient über die Membran von Mikroorganismen mittels ATP-Hydrolyse durch eine membrangebundene H^+ -ATPase aufgebaut (Padan und Schuldiner 1987, Ingraham 1987, Boyer 1987). Eine Inhibierung der ATPase durch Ethanol könnte die Abnahme des pH-Gradienten bei hochbleibender Energy Charge erklären. Obwohl eine ATP-verbrauchende bzw. entkoppelnde Rolle einer membrangebundenen ATPase für pH-Homeostasis in *Zymomonas mobilis* bereits mehrfach diskutiert wurde, ist das Vorkommen der H^+ -ATPase in *Zymomonas mobilis* bislang nicht beschrieben worden (Lazdunski und Belaich 1972, Pankova et al. 1988, Kalenieks et al. 1988, Jones und Doelle 1991). Deshalb wurden das

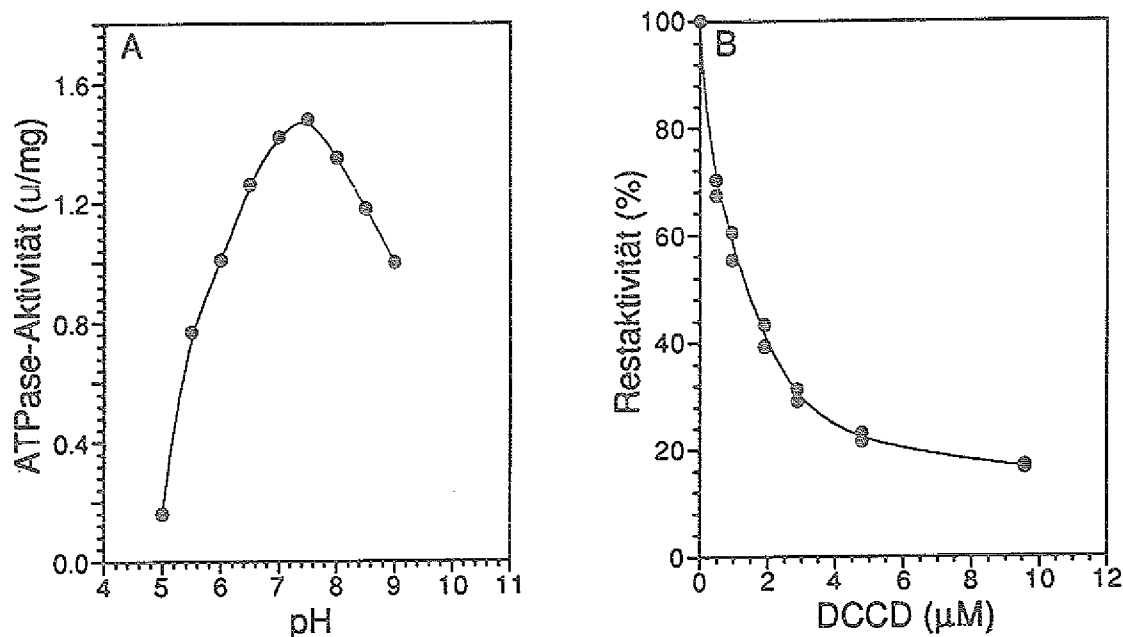


Abb. 9: Membrangebundene ATPase Aktivität in *Zymomonas mobilis*.
A: ATPase Aktivität als Funktion des pH-Wertes; B: Inhibierung durch DCCD.

Bei der Bestimmung des pH-Optimums wurden folgende Puffer verwendet: pH 5 Acetat; pH 5,5-6,5 MES; pH 7-8 HEPES; pH 8,5-9 Glycylglycin. Die Mg-ATP-Konzentration betrug 1 mM. Die Inhibierung durch DCCD wurde bei pH 7.5 mit 1mM Mg-ATP als Substrat bestimmt.

pH-Optimum, die kinetischen Parameter und die Inhibitorspezifität ermittelt, bevor die Inhibierung der ATPase durch Ethanol gemessen werden konnte. Da die beobachtete Aktivität möglicherweise die Summe der Aktivitäten von mehreren Enzymen darstellte, wurde die Inhibitoreffektivität des Dicyclohexylcarbodiimids (DCCD), einem spezifischen Inhibitor für H^+ -translozierende ATPasen (Boyer 1987, Goffau und Dufour 1988), untersucht. Es zeigte sich, daß 85 % der beobachteten ATPase-Aktivität von 10 μ M DCCD inhibiert wurde und deshalb einer H^+ -ATPase zugeschrieben werden kann (Abb. 9 B). Vanadat, das ebenfalls ein starker Inhibitor für eine Reihe von ATPasen ist, war kein spezifischer Inhibitor der ATPase-Aktivität in *Zymomonas mobilis* und konnte mit einer Konzentration von 100 μ M die ATPase Aktivität nur um 15 % reduzieren. Eine geringe Empfindlichkeit für Vanadat wurde auch für z.B. die H^+ -ATPase der Vakuole und der Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet (Goffau und Dufour 1988). Die Aktivität der ATPase als Funktion des pH-Wertes zeigte ein

scharfes Optimum bei pH 7.5 (Abb. 9 A). Der Km-Wert der ATPase für ATP betrug im pH-Optimum 0.35 mM und nahm bei Verringerung des pH-Wertes auf 5.0 ca. 10-fach zu. Dabei nahm die maximale Aktivität um die Hälfte ab. Für Membranpräparationen von Zellen aus beiden Stufen wurden die gleichen Ergebnisse erhalten. Die Inhibierung durch Ethanol konnte bis 60 g/l Ethanol als einfache, nicht-kompetitive Inhibierung mit einem Ki-Wert von 1.6 M beschrieben werden. Dieser Wert war vergleichbar mit dem Ki für Ethanol der Plasmamembran ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Zwischen 60 und 120 g/l Ethanol wurde die ATPase Aktivität bei ATP-Konzentrationen von 1 bis 4 mM ebenfalls nicht-kompetitiv inhibiert mit einem Ki-Wert von 1.6 M. Bei ATP-Konzentrationen $\leq$ 1 mM war die Inhibierung jedoch weniger stark und konnte keinem Mechanismus zugewiesen werden.

Um die Bedeutung der pH- und Ethanoleffekte für die ATPase-Aktivität in *Zymomonas mobilis* Zellen der ersten und zweiten Stufe zu erfassen, wurden Aktivitätsbestimmungen bei pH-Werten und Ethanolkonzentrationen, die den intrazellulären Bedingungen der Zellen in erster und zweiter Stufe entsprechen, durchgeführt.

Tab. 8: *In vitro* ATPase-Aktivität der Membranfraktion von *Zymomonas mobilis* bei pH-Werten und Ethanolkonzentrationen die den intrazellulären Bedingungen der Zellen in erster und zweiter Stufe entsprechen. Die ATP-Konzentration im Enzymtest betrug 4 mM.

pH	Ethanol (g/l)	ATPase-Aktivität (%)
7.5	0	100
5.5	55	45
5.0	103	28

Abnehmender pH und zunehmende Ethanolkonzentration bewirkten zusammen eine deutliche Aktivitätsabnahme der ATPase (Tab. 8), die verständlich macht, daß bei steigender Ethanolkonzentration der pH-Gradient abnimmt, während die Energy Charge konstant bleibt.

2.2. Katabole Kapazität und Lebensfähigkeit von Zellen der zweiten Stufe

Der Einfluß der langen Verweilzeit bei 100 g/l Ethanol auf Enzymaktivitäten in *Zymomonas mobilis* wurde aus dem Vergleich von Enzymaktivitäten in Zellen der ersten und der zweiten Stufe von kontinuierlichen, zweistufigen Fermentationen ermittelt. Eine Verweilzeit von 19 Stunden bei einer Ethanolkonzentration von 100 g/l bewirkte bei einigen katabolen Enzymen und der membran-gebundenen ATPase eine Aktivitätsabnahme von ca. 30 % relativ zu den Aktivitäten der exponentiell wachsenden Zellen der ersten Stufe (Tab. 9). Die spezifische Ethanolbildungsrate der Zellen aus der zweiten Stufe war bei Glukosesättigung mit einem Wert von 1.16 g/g*h um 32 % niedriger als die Anfangsrate von 1.7 g/g*h bei 100 g/l Ethanol (Abb. 5). Das Ausmaß dieser Desaktivierung kann durch die beobachtete Abnahme der Enzymaktivitäten in Zellen der zweiten Stufe erklärt werden. Die anabole PEP-Carboxylase unterschied sich von den katabolen Enzymen durch einen viel größeren Aktivitätsverlust. Das ist in Einklang mit der größeren Empfindlichkeit von anabolen Enzymen bezüglich Denaturierung durch Ethanol, die *in vitro* für die Enzyme PEP-carboxylase, Malatdehydrogenase und Pyruvatdehydrogenase gezeigt

Tab. 9: Enzymaktivitäten von *Zymomonas mobilis* in der ersten und zweiten Stufe von zweistufigen Fermentationen.

	1. Stufe U/mg	2. Stufe U/mg	Aktivitätsverlust 2. Stufe (%)
Glukokinase	1.14	0.81	29
Glukose-6-phosphat- dehydrogenase	1.54	1.22	21
3-Phosphoglycerat- kinase	4.62	3.15	32
Pyruvat- Decarboxylase	6.80	4.66	31
ATPase	0.30	0.22	28
PEP-Carboxylase	0.11	0.03	67

Die Aktivitäten der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase wurden in Rohextrakten und die Aktivitäten der anderen Enzymen in mit Chloroform permeabilisierten Zellen gemessen.

wurde (Bringer-Meyer und Sahn 1989, Bringer-Meyer, persönliche Mitteilung 1991).

Die katabole Kapazität von *Z. mobilis* Zellen aus der ersten und der zweiten Stufe, d.h. die spezifische Ethanolbildungsrate in Medium ohne Ethanol, wurde gemessen, um die Reversibilität der Inhibierung der Ethanolbildung durch Ethanol zu erfassen. Dazu wurden die Proben vor Bestimmung der CO₂-Bildungsrate zweimal in anaerobem Medium ohne Glukose gewaschen.

Tab. 10: Spezifische Ethanolbildungsraten und katabole Kapazitäten von *Zymomonas mobilis* Zellen der zweistufigen Fermentation.

Stufe	spezifische Ethanolbildungsrate (g/g*h)	katabole Kapazität (g/g*h)
1	3.6	4.1
2.	1.1	1.9

Die katabole Kapazität ist die spezifische Ethanolbildungsrate in Medium ohne Ethanol; diese wurde über die CO₂-Bildungsrate ermittelt.

Die Zellen der ersten Stufe wiesen mit 4.1 g/g*h die katabole Kapazität auf (Tab. 10), die aufgrund der Glukokinaseaktivität der Zellen erwartet werden konnte (Belaich et al. 1968, Algar und Scopes 1985). Für die Zellen der zweiten Stufe wurde maximal ca. 70 % dieses Wertes, 2.8 g/g*h, erwartet, da aus den Enzymaktivitäten und der spezifischen Ethanolbildungsrate in der zweiten Stufe bereits eine ca. 30 %-ige Desaktivierung hervorging. Die katabole Kapazität von *Zymomonas mobilis* Zellen der zweiten Stufe war jedoch um ein Drittel niedriger. Die Inhibierung der Ethanolbildung durch Ethanol war somit nicht sofort vollständig reversibel.

Aus den Daten für die Biomasseausbeute in der ersten und zweiten Stufe ging hervor, daß das Wachstum wesentlich stärker von Ethanol inhibiert wurde als die Ethanolbildung. Die Lebensfähigkeit von *Zymomonas mobilis* in erster und zweiter Stufe wurde bestimmt, um die Reversibilität der Wachstumsinhibierung durch

Ethanol zu erfassen. Die Lebensfähigkeit wurde aus der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl ermittelt und betrug 77 ± 11 % in der ersten Stufe und 60 ± 5 % in der zweiten Stufe. Die Lebensfähigkeit der ersten Stufe war niedriger als für exponentiell wachsende Zellen erwartet werden konnte. Es wurde jedoch auch von Bringer et al. (1984) und Jöbses et al. (1985) berichtet, daß die Kolonie-Ausbeute von *Zymomonas mobilis* nach Ausplattierung deutlich weniger als 100 % beträgt. Die Lebensfähigkeit der zweiten Stufe zeigt, daß *Zymomonas mobilis* Zellen erst nach längeren Inkubationszeiten bei 100 g/l Ethanol ihre Teilungsfähigkeit irreversibel verlieren und die Inhibierung des Wachstums durch Ethanol zum größten Teil reversibel ist.

2.3. Kurzzeiteffekte hoher Ethanolkonzentrationen auf das Wachstum von *Zymomonas mobilis*

Kurzzeiteffekte hoher Ethanolkonzentrationen auf die Wachstumsrate von *Zymomonas mobilis* wurden in Batchfermentationen erfaßt, wobei die Zugabe von Ethanol (60 - 120 g/l) den Übergang von der ersten zur zweiten Stufe simulierte. Das Medium der Batchfermentationen war anaerob, mit MES auf pH 6.0 gepuffert und enthielt 2 % Glukose und 50 g/l Ethanol. Die Ansätze wurden mit *Zymomonas mobilis* Zellen der ersten Stufe schwach beimpft (OD_{550} ca. 0.8), so daß während beider Versuchsabschnitte die Ethanolkonzentration nur wenig zunahm. Nachdem sich wieder exponentielles Wachstum eingestellt hatte, wurde durch Zugabe von Ethanol die Ethanolkonzentration in einem Schritt auf 60, 70, 80, 90, 100, 115 oder 120 g/l erhöht und die Zunahme der OD verfolgt. Bei 60 und 70 g/l Ethanol stieg die OD weiterhin exponentiell an und es wurden Wachstumsraten von 0.18 bzw. 0.12 1/h ermittelt. Bei 80, 90 und 100 g/l Ethanol nahm die OD in 5 Stunden noch um ca. 55 bis 80 % zu, aber die Wachstumsrate ging langsam gegen Null und es ließ sich keine exponentielle Phase mehr beobachten (Abb. 10). Bei Ethanolkonzentrationen über 110 g/l nahm die OD nicht mehr zu. Die nur langsame Abnahme der Wachstumsrate nach einem schrittweisen Anstieg der Ethanolkonzentration auf 80 bis 100 g/l bot die Möglichkeit über einen Zeitraum von einigen Stunden zu untersuchen, auf welche Weise die hohen Ethanolkonzentrationen das Wachstum von *Zymomonas mobilis* beeinflussen. Als erstes wurde geprüft, ob Energielimitierung primär für die vollständige

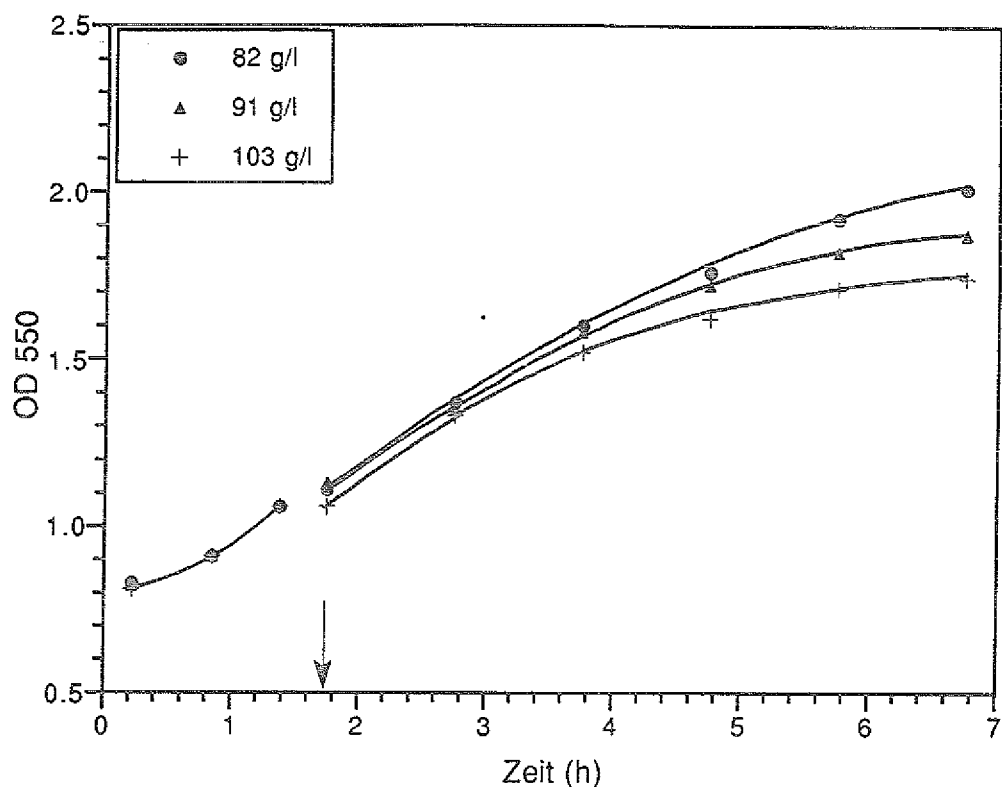


Abb. 10: Wachstum von *Zymomonas mobilis* in Batchfermentationen bei 50 g/l Ethanol und nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 82, 91 oder 103 g/l. Der Zeitpunkt der Ethanolzugabe ist mit dem Pfeil markiert.

Inhibierung des exponentiellen Wachstums durch Ethanol verantwortlich ist. Dazu wurden die CO_2 -Bildungsraten bzw. Glukoseverbrauchsrate während der Batchfermentationen ermittelt. Gemäß der Abhängigkeit der spezifischen Glukoseverbrauchsrate von der Ethanolkonzentration (Abb 5) wurde nach schrittweiser Erhöhung der Ethanolkonzentration eine sofortige Abnahme der CO_2 -Bildungsrate der Zellen gemessen. Die volumetrische Glukoseverbrauchsrate der Kultur blieb nach den anfänglichen Abnahmen mindestens 5 Stunden konstant (Abb. 11). Die langsame Abnahme der OD-Zuwachsrates in diesem Zeitraum konnte daher nicht mit einer Abnahme der katabolen Aktivität erklärt werden. Ob dennoch ein Energiemangel entstand, wurde anhand Änderungen im Adeninnukleotid-Pool und Energy Charge ermittelt. Dazu wurden intra- und extrazelluläre ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen bei 50 g/l Ethanol und nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 85 g/l oder 100 g/l bestimmt. Wie in der ersten Stufe der kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen hatte die Energy Charge bei 50 g/l

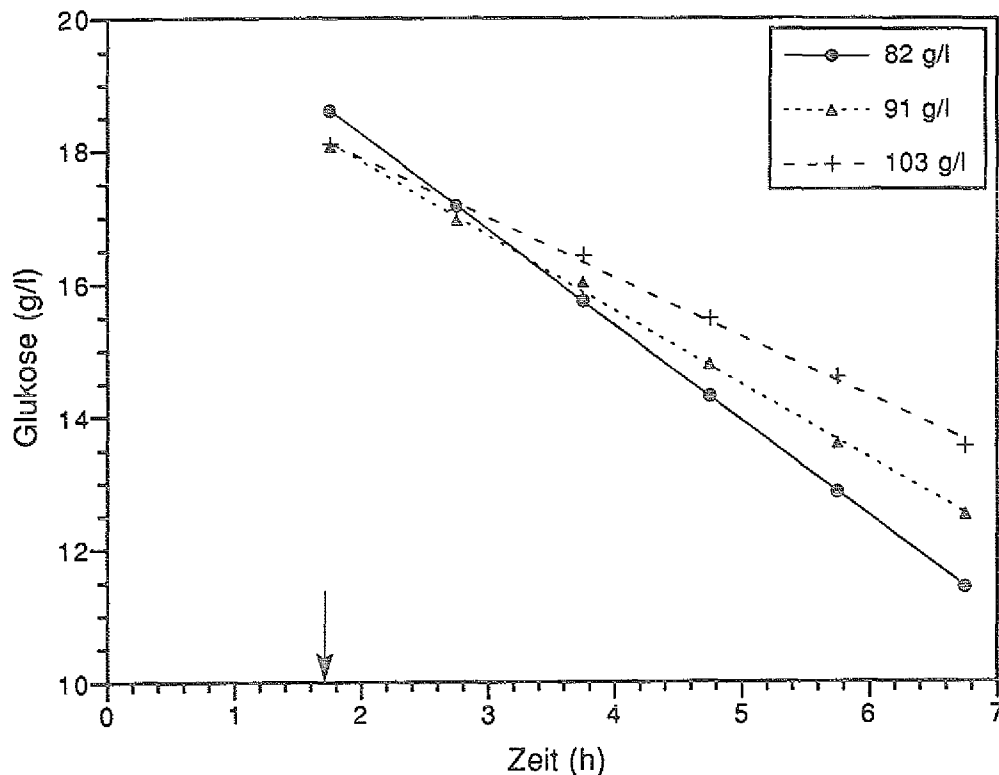


Abb. 11: Abnahme der Glukosekonzentration in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* bei 50 g/l Ethanol und nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 82, 91 und 103 g/l. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Ethanolzugabe.

Ethanol einen Wert von 0.9. Nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 85 g/l blieb dieser Wert 4 h konstant, während der Gesamt-Adeninnukleotid-Pool in dieser Zeit parallel zur OD zunahm (Abb. 12). Die extrazelluläre AMP-Konzentration blieb dabei niedrig. Die hohe Energy Charge der Zellen und die gleichzeitige Zunahme des Adeninnukleotid-Pools zeigten, daß die langsame Abnahme der OD-Zuwachsrates bei 85 g/l nicht auf Energiemangel zurückzuführen war. Bei Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 100 g/l waren die Ergebnisse ähnlich.

Zum Vergleich wurden Energy Charge und Adeninnucleotidpool auch nach Zugabe von Ethanol zu 118 g/l, wobei die OD nicht mehr zunahm, ermittelt. Im Gegensatz zu den Versuchen bei 85 und 100 g/l Ethanol blieb der Adeninnukleotid-Pool nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 118 g/l konstant (Abb. 13). Die zellinterne ATP-Konzentration nahm dabei in 4.5 Stunden um mehr als

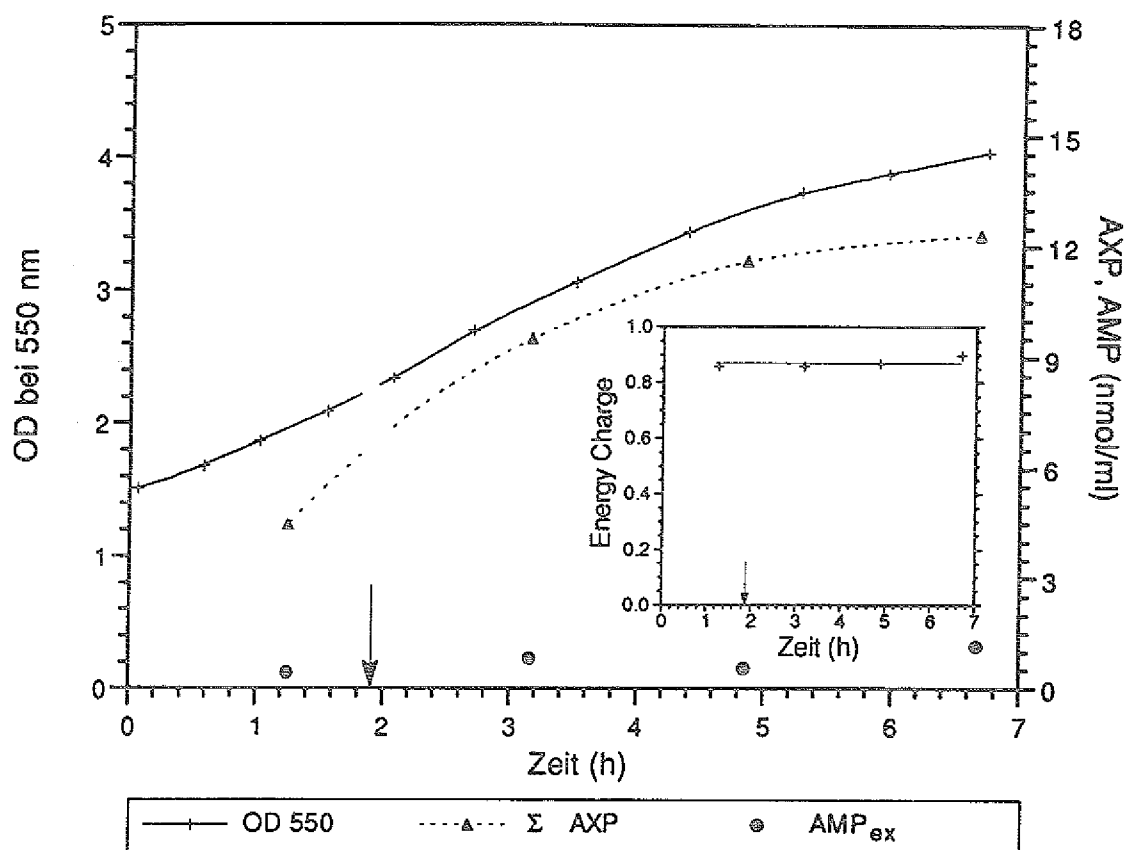


Abb. 12: Wachstum, Energy Charge und Adeninnucleotid-Pool in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* bei 50 g/l Ethanol und nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 85 g/l Ethanol. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Ethanolzugabe.

die Hälfte ab. Die Energy Charge wurde auf 0.7 verringert. Die extrazelluläre AMP-Konzentration stieg gleichzeitig an und bildete nach 4 Stunden die größte Adeninnucleotid-Fraktion der Kultur. Energiemangel war hier offensichtlich. Außer AMP wurden bei 118 g/l Ethanol jedoch auch ADP und ATP im Überstand detektiert. Nach 4 Stunden befand sich die Hälfte des ADP-Pools im Überstand. Der Verlust von nicht nur AMP sondern auch von ADP und ATP deutet auf eine erhöhte Permeabilität oder Lyse der Zellen bei 120 g/l Ethanol hin. Der Metabolitverlust nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 118 g/l führt sehr wahrscheinlich zur sofortigen Wachstumsinhibierung und zur schnellen Desaktivierung der Ethanolbildungsaktivität bei 110 und 120 g/l Ethanol (Abb. 6).

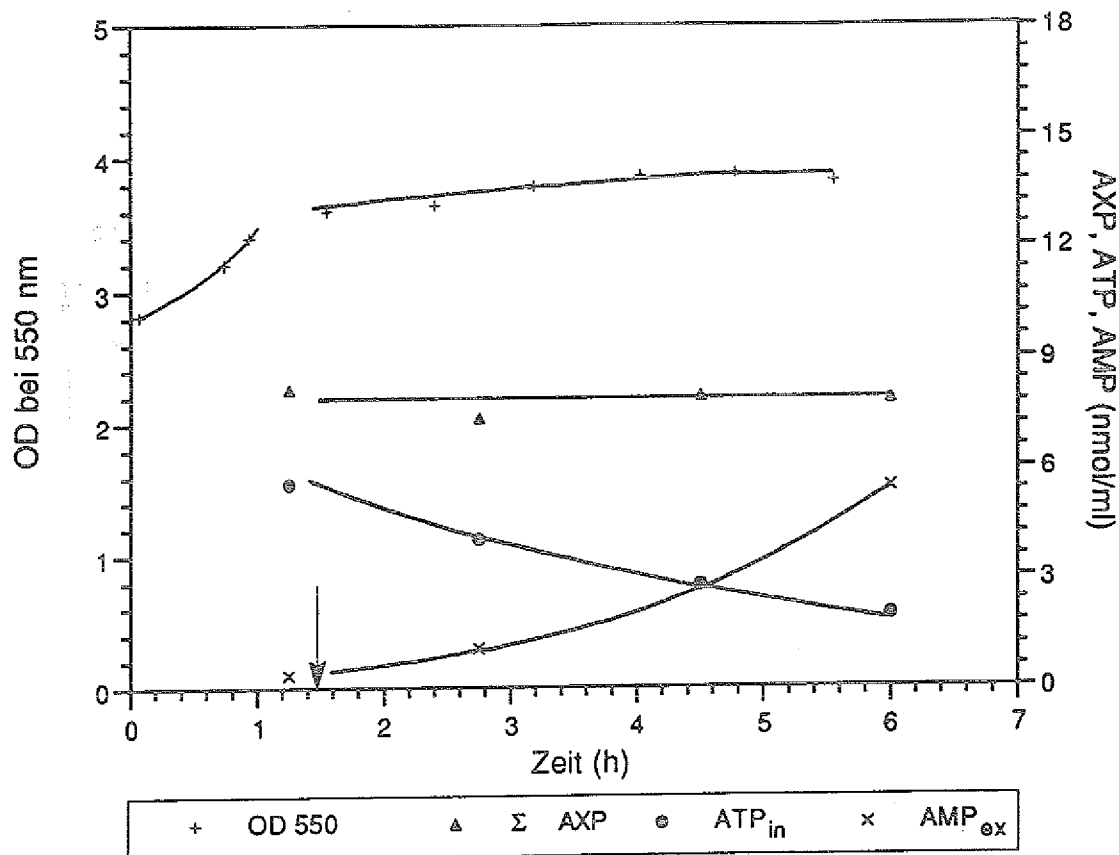


Abb. 13: Wachstum, Energy Charge und Adeninnucleotid-Pool in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* bei 50 g/l Ethanol und nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 118 g/l Ethanol. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Ethanolzugabe.

Da die langsame Abnahme der Wachstumsrate bei 80 bis 100 g/l Ethanol nicht mit akutem oder langsam zunehmendem Energiemangel zusammenhing, wurde im weiteren die Art des nicht-exponentiellen Wachstums charakterisiert, um aus Unterschieden zum normalen Wachstum auf Inhibierungen im Anabolismus schließen zu können.

2.4 Charakterisierung des Wachstums von *Zymomonas mobilis* bei 80 - 100 g/l Ethanol

Das Wachstum von *Zymomonas mobilis* in Batchfermentationen bei 80 - 100 g/l Ethanol wurde nun anhand von Änderungen in Zellzahl, Zellgröße und spezifischer Zelldichte charakterisiert. Bei den Zellzählungen stellte sich heraus, daß die Zellzahl von *Zymomonas mobilis* in der Kultur konstant blieb, während die optische

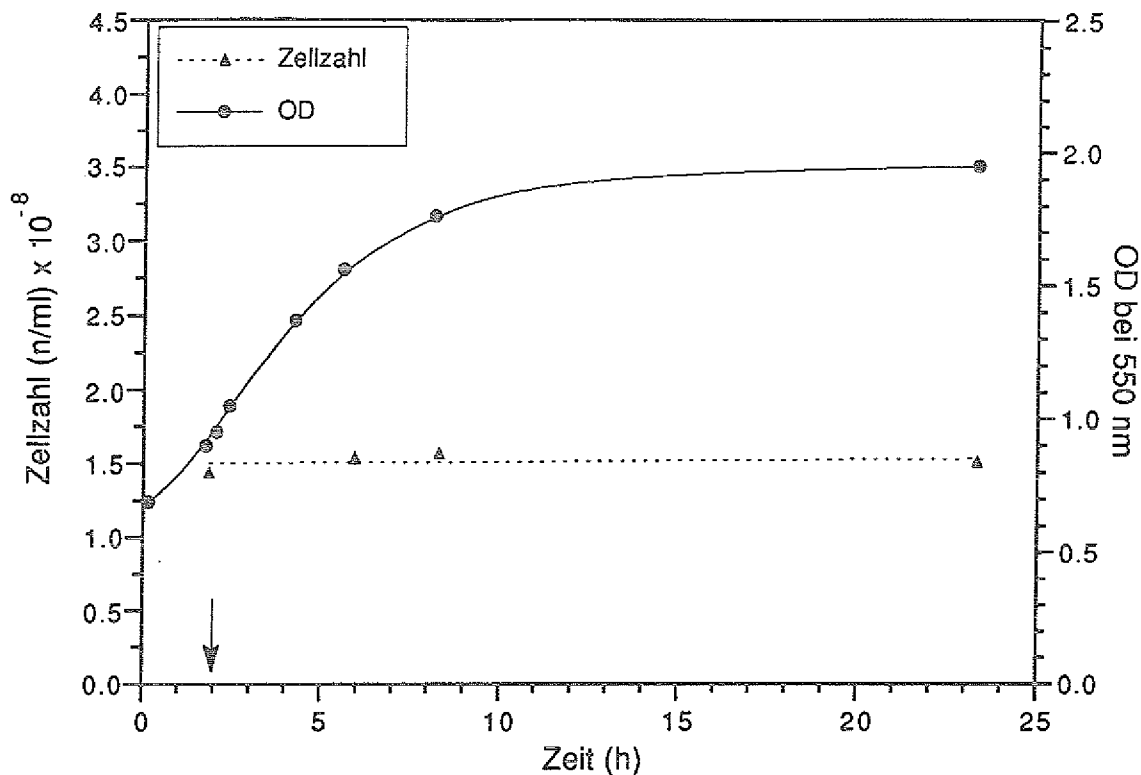


Abb. 14: Zellzahl und Zunahme der optischen Dichte von *Zymomonas mobilis* in Batchfermentationen bei 50 g/l Ethanol und nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 90 g/l. Der Zeitpunkt der Ethanolzugabe ist mit dem Pfeil markiert.

Dichte innerhalb von 21 Stunden nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 90 g/l um den Faktor zwei zunahm (Abb. 14). Bei 80 und 100 g/l führte die OD-Zunahme ebenfalls nicht zu einer Zunahme der Zellzahl. Es wurde daher erwartet, daß die OD-Zunahme durch einer Zunahme der Zellgröße bedingt war. Zellgrößenverteilungen, die während Batchfermentationen bei 90 g/l Ethanol gemessen wurden, zeigten jedoch daß dies nur teilweise zutraf. Während die OD in 4.5 Stunden nach Ethanolzugabe um den Faktor 1.66 anstieg, nahm die mittlere Zellgröße in drei parallelen Ansätzen nur um den Faktor 1.14 zu (Abb. 15).

Außer Zellzahl und Zellgröße ist auch die Differenz der Brechungsindizes von Zellen und Lösungsmittel mit der OD einer Kultur korreliert (Hiemenz 1977). Der Brechungsindex einer Zelle ist abhängig vom Gehalt der nichtwässrigen Zellbestandteile (Quesnel 1971) und stellt ein Maß für die spezifische Dichte dar. Änderungen der spezifischen Dichte der *Zymomonas mobilis*

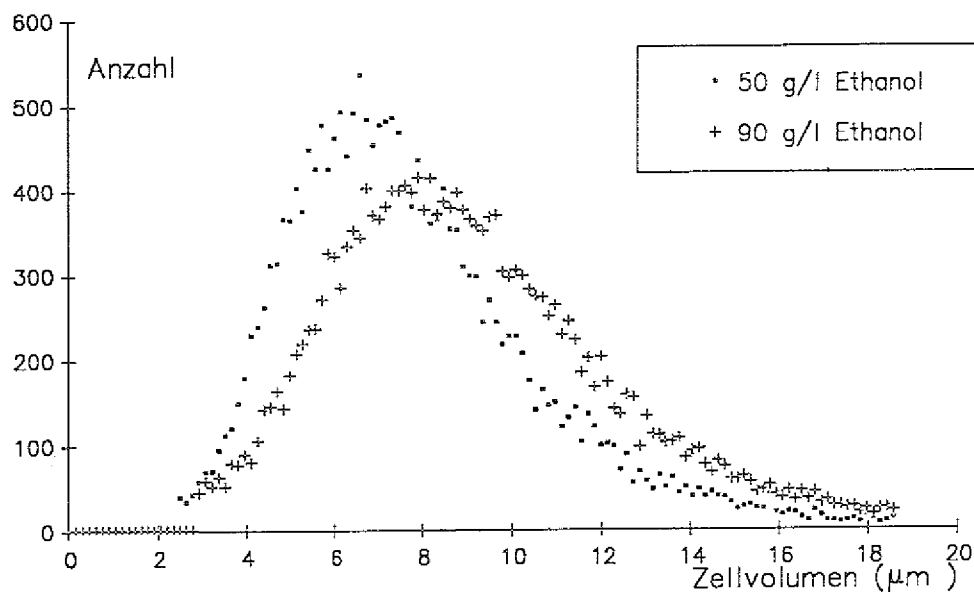


Abb. 15: Zellgrößenverteilungen von *Zymomonas mobilis* Zellen in Batchfermentationen bei 50 g/l Ethanol und 5h nach Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 90 g/l.

Tab. 11: Spezifische Dichte von *Zymomonas mobilis* Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bei 50 - 60 g/l Ethanol und nach Wachstum bei 90 - 100 g/l Ethanol. Die spezifische Dichte wurde mittels Dichtezentrifugation bestimmt.

Dichte (g/ml) bei 50-60 g/l Ethanol	Nach Ethanolzugabe bis 90 - 100 g/l	
	OD-Zunahmefaktor	Dichte (g/ml)
1.100	1.0	1.100
1.099	1.41	1.112
1.100	1.71	1.127

Zellen in den Batchfermentationen bei 80 bis 100 g/l Ethanol wurden mittels Dichtezentrifugation bestimmt. Es zeigte sich, daß nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 g/l auf 90 bis 100 g/l die Zunahme der OD mit einer Zunahme der spezifischen

Dichte der Zellen einherging (Tab. 11). Die Dichtezunahme von 1.100 auf 1.127 g/ml kann bei einem gleichzeitigen Zellvergrößerungsfaktor von 1.14 und einem Wassergehalt der Zelle von 75 % - 80 % eine Trockengewichtszunahme pro Zelle von ca. 50 bis 60 % erklären. Die Zunahme der spezifischen Zelldichte und die geringe Zellvergrößerung zeigten, daß die OD-Zunahme bei 80 bis 100 g/l Ethanol tatsächlich ein Wachstum in Form von Biomassezunahme repräsentiert. Die Zellzahlbestimmungen zeigten jedoch eine Inhibierung der Zellteilung durch Ethanolkonzentrationen ab 80 g/l Ethanol womit eine Inhibierung im Anabolismus identifiziert wurde, der sofort nach Ethanolzugabe auftritt.

Da auch für andere anabole Vorgänge eine sofortige Inhibierung auftreten könnte, wurden im weiteren bei 80 bis 100 g/l Ethanol die Biosyntheseraten der Makromoleküle ermittelt.

2.5 Charakterisierung der Biosynthese von *Zymomonas mobilis* bei 80 bis 100 g/l Ethanol

Die Biosynthese von *Zymomonas mobilis* bei 80 bis 100 g/l Ethanol wurde für die wichtigsten Makromoleküle charakterisiert. Dazu wurden in den Batchfermentationen nach Erhöhung der Ethanolkonzentration das Trockengewicht, sowie der Gehalt an Protein, RNA, DNA, Kohlenhydraten und Fettsäuren parallel zur OD-Zunahme gemessen.

Nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 85 g/l betrug die Trockengewichtszunahme nur etwa 63 % der OD-Zunahme (Abb. 16). Dieses wurde auch in anderen Versuchen beobachtet. Die Proteinkonzentration stieg parallel zum Trockengewicht an, so daß der Proteingehalt des Trockengewichtes in diese Wachstumsphase von 58 % auf 66 % zunahm. Zugabe von 50 bis 150 μ M CCCP bewirkte eine dosisabhängige Verringerung der OD- und Proteinzunahmen, was demonstriert, daß die Proton Motive Force normalerweise nach Erhöhung der Ethanolkonzentration noch vorhanden ist (Ruhrmann und Krämer 1992). Wenn die Batchfermentationen in Minimalmedium statt in Vollmedium durchgeführt wurden, konnte nach Erhöhung der Ethanolkonzentration ebenfalls eine OD- und Proteinkonzentrationszunahme gemessen werden. Diese Zunahme zeigt, daß nicht

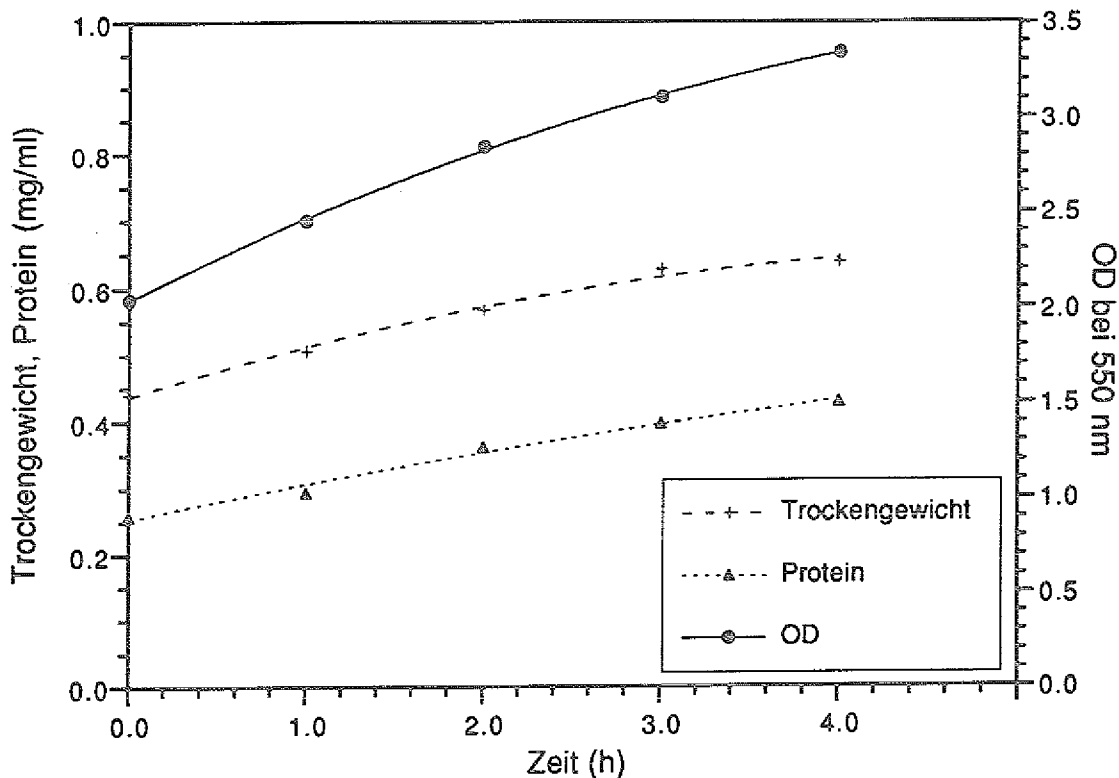


Abb. 16: Zunahme von optischer Dichte, Trockengewicht und Protein in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 85 g/l.

nur Proteinbiosynthese sondern auch Aminosäurebiosynthese bei Ethanolkonzentrationen über 80 g/l noch stattfinden kann. Parallel zur Proteinzunahme wurden während der Batchfermentationen die Aktivitäten der Glukokinase und der Pyruvatdecarboxylase in mit Chloroform permeabilisierten Zellen gemessen. Die Aktivitäten dieser Enzyme (U/ml Kultur) nahmen nach Erhöhung der Ethanolkonzentration jedoch nicht mit dem Proteingehalt der Kultur zu. Das Konstantbleiben dieser Enzymaktivitäten war in Einklang mit den konstanten volumetrischen Glukoseverbrauchsrate in vergleichbaren Batchfermentationen (Abb. 11).

Im Gegensatz zum Proteingehalt, nahm die RNA-Konzentration in der Kultur nur wenig zu, hauptsächlich während der ersten Stunde nach Erhöhung der Ethanolkonzentration (Abb. 17). Insgesamt nahm der RNA-Gehalt bezogen auf das Trockengewicht ab. Im allgemeinen ist der Gesamt-RNA-Gehalt einer Zelle von der Wachstumsrate abhängig. Das Ausbleiben weiterer Netto-Neusynthese könnte daher, statt mit einem direkten Einfluß von Ethanol auf die RNA-Biosyn-

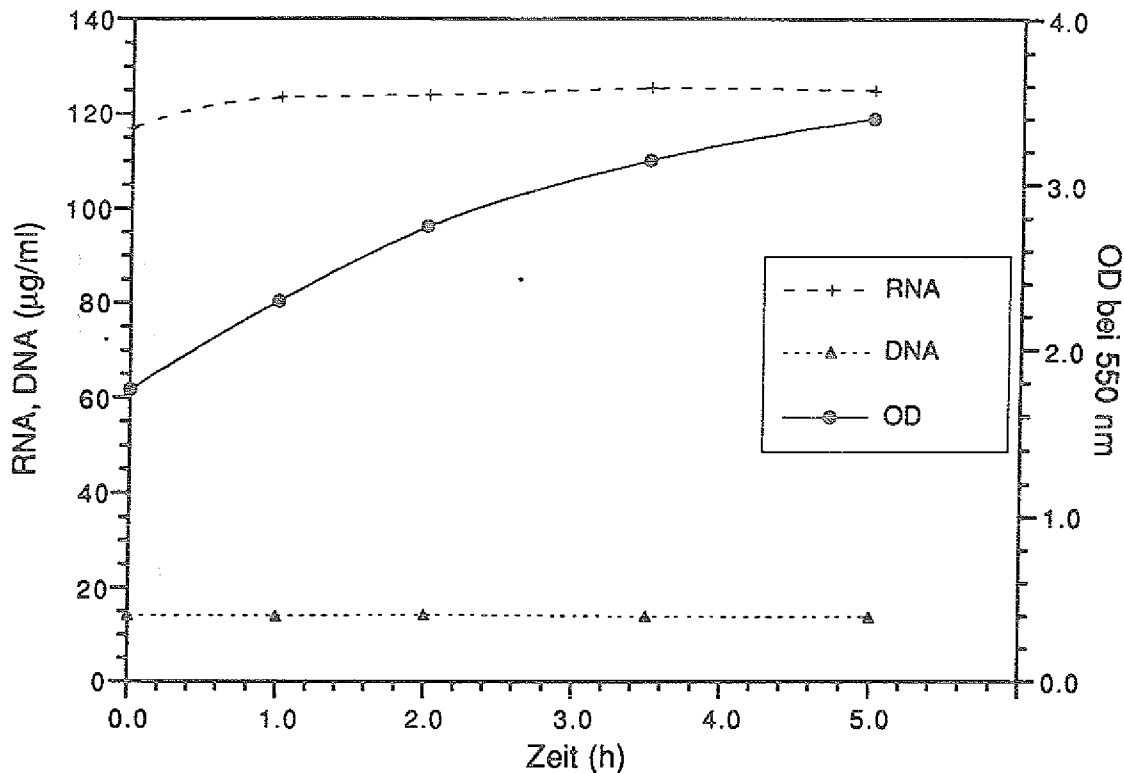


Abb. 17: Zunahme der optischen Dichte, sowie RNA- und DNA- Konzentrationen in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 90 g/l.

these auch mit dem "Shiftdown" der Wachstumsrate zusammenhängen. Die Neusynthese von Protein zeigte, daß mRNA-Synthese weiterhin stattfand. Im Einklang hiermit konnten die OD- und Proteinzunahme nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 80 bis 100 g/l durch Zugabe von 100 µg/ml Rifampicin, ein Inhibitor der RNA-Biosynthese, vollständig inhibiert werden. Die mRNA macht zwar nur einen kleinen Anteil der Gesamt-RNA aus, aber die Biosynthese von mRNA weist darauf hin, daß die RNA-Biosynthese nicht vollständig inhibiert ist.

Die DNA-Konzentration nahm nach Erhöhung der Ethanolkonzentration nicht mehr zu (Abb. 17). Neben Zellteilung ist die DNA-Replikation somit ein zweiter anaboler Vorgang, der sofort und vollständig von Ethanol ab 80 g/l inhibiert wird.

Zum Zeitpunkt der Ethanolzugabe korrelierte die Menge organisch gebundenen Phosphats in exponentiell wachsenden Zellen sehr gut

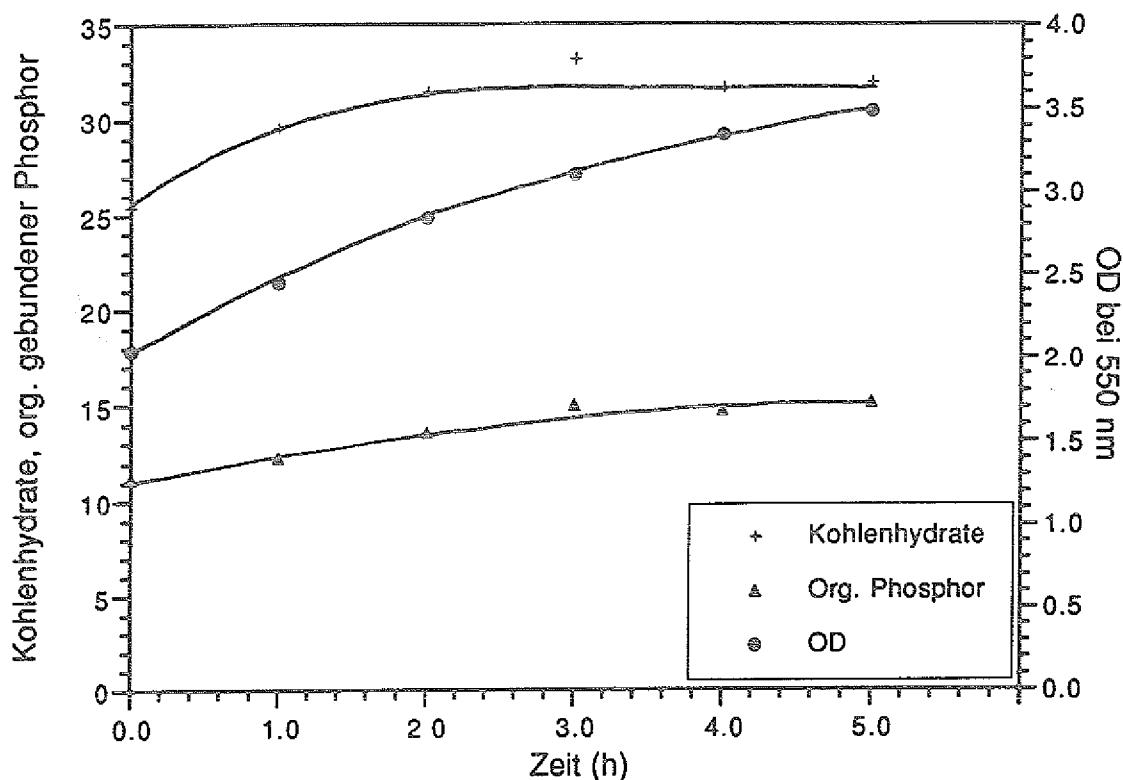


Abb. 18: Zunahme der optischen Dichte, sowie organisch gebundenen Phosphor- und Kohlenhydratgehalt in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 85 g/l.

mit dem Gehalt der Hauptphosphatträger in der Zelle : RNA, DNA und Phospholipide. Nach der Ethanolzugabe nahm der Phosphatgehalt weiter zu (Abb. 18). Die Zunahme war größer als aus der RNA-Zunahme errechnet werden konnte, was auf die Biosynthese einer phosphathaltigen Komponente hinweist.

Die Biosynthese der Gesamtkohlenhydrate trug nur in den ersten zwei Stunden zu der Biomassezunahme bei (Abb. 18). Der Kohlenhydratgehalt nahm während der Kurzfermentation von 5.8 auf 5.0 % des Trockengewichtes ab.

Als Maß für die Phospholipid- und Lipopolysaccharidbiosynthese wurde der Fettsäuregehalt parallel zur OD-Zunahme gemessen. Es stellte sich heraus, daß der Fettsäuregehalt nach Erhöhung der Ethanolkonzentration nicht mehr zunahm (Abb. 19). Die Fettsäurebiosynthese bzw. die Phospholipid- und Lipopolysaccharidbiosyn-

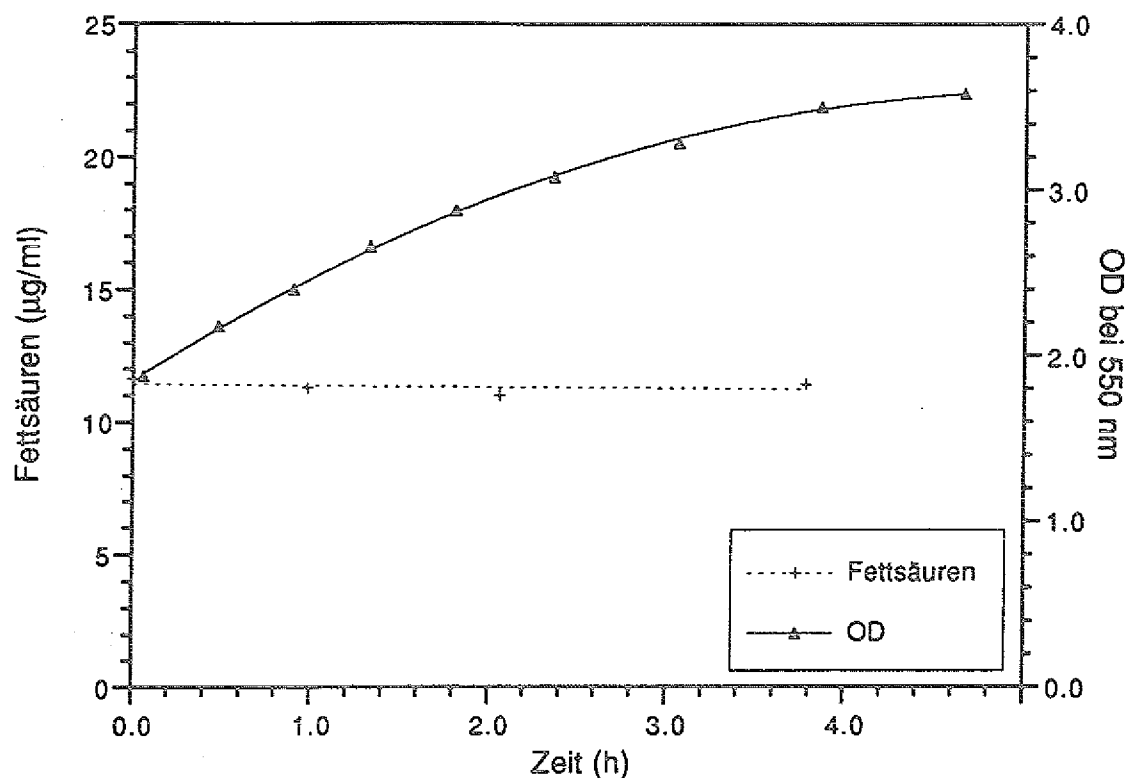


Abb. 19: Wachstum und Fettsäuregehalt in Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* nach Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 auf 88 g/l.

these ist somit ein dritter anaboler Vorgang, der nach Erhöhung der Ethanolkonzentration sofort und vollständig inhibiert wird. Diese Inhibierung erklärt zudem, warum die Biomassezunahme nach Ethanolzugabe kaum noch zu Zellvergrößerung führte.

3. Untersuchungen zur Bedeutung der Hopanoide in *Zymomonas mobilis*

Für die ausgeprägte Ethanoltoleranz von *Zymomonas mobilis* sind wahrscheinlich die in der Membran vorhandenen Hopanoide mitverantwortlich (Bringer et al. 1985, Schmidt et al. 1986). Im weiteren wurde nun der Einfluß der Kulturbedingungen auf Gehalt und Zusammensetzung der Hopanoide, sowie deren physikochemisches Verhalten bei Monoschichtuntersuchungen untersucht, um die Funktion der Hopanoiden genauer beschreiben zu können.

3.1. Einfluß der Wachstumsbedingungen auf Hopanoidgehalt und -Zusammensetzung.

Bringer et al. (1985) beschrieben eine Veränderung des Hopanoidgehaltes in *Zymomonas mobilis* mit variierender Ethanolkonzentration. Bei Erhöhung der Ethanolkonzentration von 5 g/l auf 63 g/l in kontinuierlicher, anaerober Kultur stieg der Hopanoidgehalt um das 8-fache an. Schmidt (1988) beschrieb eine analoge Korrelation zwischen Hopanoidgehalt und Inkubationstemperatur. Sie zeigte außerdem, daß der Hopanoidgehalt bei Batchfermentationen von der Wachstumsphase abhängig war. Der Einfluß der Wachstumsbedingungen auf die Hopanoidzusammensetzung konnte von diesen Autoren nicht bestimmt werden, da die komplexen C35-Hopanoide THBH, THBH-Ether und THBH-Glykosid vor der Analyse zu 29-(2-Acetoxyethyl)-Hopan derivatisiert wurden. Nachdem von Schulenberg et al. (1989) eine Methode zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Hopanoide THBH-Ether, THBH-Glykosid, THBH, Diplopterol und Hopan entwickelt worden war, wurde nun der Einfluß von Ethanolkonzentration und Wachstumsrate auf die Zusammensetzung der Hopanoidfraktion in *Z. mobilis* bestimmt.

Zymomonas mobilis wurde in kontinuierlicher Kultur gezüchtet, um definierte und reproduzierbare Wachstumsbedingungen zu erhalten. Die Ethanolkonzentrationen wurden durch die Zuckerkonzentrationen bzw. Durchflußraten von 5 bis 60 g/l und die Wachstumsraten von 0.08 bis 0.40 1/h variiert. Die Fermentationen waren bis auf die höchsten, mit Ausnahme bei den höchsten Verdünnungsraten bei 10, 35 und 55 g/l Ethanol Glukose-limitiert.

Die Ether- und Glycosidderivate des THBH stellten mit 41 % bzw. 49 % der Gesamthopanoide die Hauptkomponenten der Hopanoidfrak-

Tab. 12 Einfluß der Ethanolkonzentration und Wachstumsrate auf die Hopanoidzusammensetzung in *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in kontinuierlicher Kultur

Ethanol D (g/l) (h ⁻¹)		Ether	Glycosid	Tetrol	Diplopterol	Hopen
		(mg/g Lipidextrakt) ^{a)}				
4.9	0.08	210 ± 10	160 ± 50	9 ± 4	10 ± 1	1 ± 0
4.8	0.30	180 ± 0	220 ± 40	21 ± 5	12 ± 2	1 ± 0
10.1	0.08	210 ± 10	220 ± 20	11 ± 4	11 ± 0	2 ± 0
9.8	0.25	130 ± 10	250 ± 50	7 ± 3	16 ± 0	1 ± 0
9.8	0.40 ^{b)}	180 ± 10	270 ± 50	20 ± 8	14 ± 2	1 ± 0
35	0.15	160 ± 20	220 ± 30	28 ± 2	11 ± 1	4 ± 0
34	0.32 ^{b)}	150 ± 10	260 ± 20	33 ± 9	14 ± 1	4 ± 0
60	0.08	150 ± 10	220 ± 10	40 ± 7	15 ± 1	7 ± 0
55	0.19 ^{b)}	160 ± 10	140 ± 10	52 ± 15	15 ± 3	6 ± 1

a) n = 8

b) $\mu = \mu_{\max}$

tion dar (Tab. 12). THBH, Diplopterol und Hopen trugen nur etwa 6, 3, bzw. 1% zum Hopanoidgehalt bei. Der Ethanolgehalt der Kultur hatte nur einen geringen Einfluß auf die Hopanoidzusammensetzung. Der Hopengehalt nahm um den Faktor 7 zu, blieb jedoch gemessen am Gesamthopanoidgehalt gering. Diese Beobachtung stimmt mit der von Bringer et al. (1985) beschriebenen Zunahme des Hopens bei steigender Ethanolkonzentration überein. Der THBH-gehalt stieg ebenfalls an, während das Etherderivat des THBH bei Zunahme der Ethanolkonzentration von 10 auf 35 g/l leicht abnahm.

Die Gesamt-Hopanoid- und Phospholipidgehalte der Lipidextrakte von *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 zeigt Tab. 13. Der Hopanoidgehalt betrug immer etwa 430 mg/g Lipidextrakt. Dieser Wert stimmte gut mit dem von Schmidt (1988) ermittelten Hopanoidgehalt für stationäre Zellen einer Batchfermentation überein. Die von Bringer et al. (1985) und Schmidt (1988) beschriebene Korrelation zwischen Ethanolkonzentration und Hopanoidgehalt konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Tab. 13 Einfluß der Ethanolkonzentration und Wachstumsrate auf die Zusammensetzung der extrahierten Lipiden in *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in kontinuierlicher Kultur.

Ethanol (g/l)	D (h ⁻¹)	Hopanoide (mg/g) ^{a)}	Phospholipide (μ mol/g) ^{b)}	Σ Lipide (mg/g)	Hopanoide/ Phospholipide (mol/mol)
4.9	0.08	390 $\pm$ 70	830 $\pm$ 10	990 $\pm$ 80	0.67
4.8	0.30	430 $\pm$ 50	690 $\pm$ 5	930 $\pm$ 60	0.93
10.1	0.08	450 $\pm$ 30	840 $\pm$ 10	1060 $\pm$ 40	0.78
9.8	0.25	400 $\pm$ 60	810 $\pm$ 5	990 $\pm$ 70	0.72
9.8	0.40 ^{c)}	490 $\pm$ 70	690 $\pm$ 10	990 $\pm$ 80	1.03
35	0.15	420 $\pm$ 50	880 $\pm$ 10	1070 $\pm$ 60	0.70
34	0.32 ^{d)}	460 $\pm$ 40	660 $\pm$ 10	940 $\pm$ 50	1.05
60	0.08	430 $\pm$ 30	840 $\pm$ 20	1040 $\pm$ 50	0.77
55	0.19 ^{d)}	370 $\pm$ 40	840 $\pm$ 10	960 $\pm$ 50	0.68

a) n = 8; b) n = 4;

c) μ is μ max bei 10 g/l Ethanol und 112 g/l Glukose im steady State

d) μ is μ max für die angegebene Ethanolkonzentration.

Die Variation der Wachstumsrate hatte ebenfalls keinen Einfluß auf den Hopanoidgehalt. Der organisch gebundene Phosphatgehalt der Lipide nahm jedoch bei den höchsten Wachstumsraten ab, so daß das molare Verhältnis von Hopanoiden zu Phospholipiden von etwa 0.7 auf 0.9 bis 1.0 anstieg. Die Abnahme des organisch gebundenen Phosphats im Lipidextrakt konnte nicht durch Phosphat-limitierung bedingt sein, da Phosphat in mindestens 9-fachem Überschuss im Medium vorhanden war.

Fermentationen mit einer frischen Stammkultur von ATCC 29191 zeigten, daß die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen für den Hopanoidgehalt in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration von Bringer und Schmidt und dieser Arbeit keine Folge von Spontanmutationen in der Regulation der Hopanoidbiosynthese gewesen sein kann (Bringer, persönliche Mitteilung 1990). Wahrscheinlich sind die Unterschiede methodisch bedingt, denn eine Überprüfung der von Bringer et al. (1985) und Schmidt (1988) angewandten Deriva-

tisierungsmethode (Perjodatspaltung und Acetylierung) hatte gezeigt, daß die Ergebnisse besonders für Zellen, die bei geringer Ethanolkonzentration gewachsen waren, nicht reproduzierbar waren (Hermans et al., 1991). Möglicherweise gehen Hopanoide während der Perjodatspaltung verloren. Ein ähnliches Phänomen wurde auch für 1-Hydroxy-Octadecanyl-Glycerolether beobachtet (Bringer et al. 1985).

Bezogen auf das Zelltrockengewicht enthielten die Zellen etwa 7 % Lipide. Der Hopanoidgehalt und der geschätzte Phospholipidgehalt erreichten zusammen immer ca. 1000 ± 80 mg/g Lipidextrakt, was zeigt, daß Hopanoide und Phospholipide die Hauptkomponenten der Lipide darstellen. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Befund von Tornabene et al. (1982) überein, der zeigte, daß 97 % der extrahierbaren Lipide von *Z. mobilis* aus polaren Lipiden bestehen.

Ferner wurde überprüft, ob Hopanoidgehalt und -zusammensetzung Temperaturabhängig sind. Dazu wurden Fermentationen bei einer Ethanolkonzentration von 10 g/l und Temperaturen von 25 °C bis 37 °C durchgeführt. Bei 37 °C mußte die Durchflußrate bis auf 0.135 (l/h) reduziert werden, um eine Glukoselimitierung zu erreichen. Gleichzeitig wurde eine deutliche Zellverlängerung beobachtet, die für *Zymomonas mobilis* unter ungünstigen Wachstumsbedingungen, wie z.B. erhöhter Temperatur, typisch ist (Skotnicki et al. 1982, Stevnsborg et al. 1986). Die Werte des Hopanoid- und Phospholipidgehalts bei 25 °C und 37 °C waren vergleichbar mit denen bei 30 °C (Tab. 14). Somit ist der Hopanoidgehalt auch von der Fermentationstemperatur in dem Bereich zwischen 25 °C und 37 °C unabhängig. Die Zusammensetzung der Hopanoide bei 25 °C war vergleichbar mit der bei 30 °C. Bei 37 °C jedoch zeigte sich eine Verringerung im Gehalt des Glycosidderivats. Diese Abnahme wurde durch eine Zunahme des THBH teilweise kompensiert.

Bei Untersuchungen zur Fähigkeit, maximale Ethanolkonzentrationen zu bilden, erwies sich *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 von den 11 verschiedenen *Zymomonas mobilis* Stämmen als der beste Ethanolproduzent (Rogers et al. 1984). Deswegen wurden Hopanoidgehalt und -zusammensetzung auch für *Zymomonas mobilis* ATCC 31821

Tab. 14: Einfluß der Temperatur auf die Zusammensetzung der Lipide in *Zymomonas mobilis* ATCC 29191

Ethanol T D (g/l) (°C) (h ⁻¹)	Hopanoide (mg/g) ^{a)}	Phospho- lipide (μmol/g) ^{b)}	Σ Lipide (mg/g)	Hopanoide/ Phospholipide (mol/mol)
9.4 25 0.15	420 ± 20	780 ± 10	990 ± 40	0.78
9.8 30 0.25	400 ± 60	810 ± 5	990 ± 70	0.72
9.6 37 0.135	360 ± 30	830 ± 20	980 ± 50	0.67

a) n = 8; b) n = 4;

Tab. 15: Einfluß der Ethanolkonzentration auf die Hopanoid-zusammensetzung in *Zymomonas mobilis* ATCC 31821

Ethanol D (g/l) (h ⁻¹)	Ether	Glykosid	Tetrol	Diplop- terol	Hopen	Hopanoide Σ
	(mg/g Lipidextrakt) ^{a)}					
9.2 0.25	180 ± 10	190 ± 20	22 ± 4	18 ± 2	0 ± 0	410 ± 40
35.3 0.15	170 ± 20	140 ± 10	68 ± 5	18 ± 2	4 ± 0	400 ± 40
58.5 0.08	200 ± 10	200 ± 10	12 ± 4	5 ± 0	7 ± 2	420 ± 30

a) n = 8

bestimmt. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen von ATCC 29191 (Tab. 15). Der Hopanoidgehalt betrug etwa 410 mg/g Lipidextrakt und war ebenfalls unabhängig von der Ethanolkonzentration zwischen 10 und 60 g/l. Die Ether- und Glykosidderivate des THBH bildeten auch in diesem Stamm die Hauptkomponenten der Hopanoidfraktion, während THBH, Diplopterol und Hopan wiederum in kleineren Mengen vertreten waren.

1.2. Untersuchungen zur lateralen Lipidpackung von Gesamtlipiden und Phospholipiden aus *Zymomonas mobilis*

Nachdem gezeigt worden war, daß Hopanoidgehalt und -zusammensetzung in *Zymomonas mobilis* konstitutiv sind, wurde nun die Funktion der Hopanoide in der Membran von *Zymomonas mobilis* näher untersucht.

Wie aus ersten Untersuchungen hervor ging, haben Hopanoide in Membranen eine fluiditätsmodulierende Funktion und bewirken eine dichtere laterale Packung flüssiganaloger Lipide, was zu einer geringeren passiven Permeabilität und einer erhöhten Ethanoltoleranz der Membran führt (Kannenberget al. 1980, 1985, Bissereget al. 1983, Benz et al. 1983, Nagumo et al. 1991). Diese Eigenschaften wurden jedoch bisher nur für THBH und Diplopterol nachgewiesen. In *Z. mobilis* haben diese Substanzen nur den geringen Anteil von etwa 10 % am Gesamthopanoidgehalt. Die Hauptkomponenten der Hopanoidfraktion in *Z. mobilis* sind das Ether- und das Glykosidderivat des THBH; daher wurde in Monoschichtuntersuchungen mit Lipidextrakten aus *Zymomonas mobilis* der Einfluß der Gesamt-Hopanoidfraktion auf die laterale Lipidpackung der untersucht. Der Lipidextrakt wurde aus Zellen einer glukose-limitierten kontinuierlichen Fermentation bei 35 g/l Ethanol hergestellt und enthielt 40% Hopanoide und 60 % Phospholipide. Die Zusammensetzung der Hopanoidfraktion entsprach der in Tab. 12 beschriebenen.

Die Phospholipide wurden mittels präparativer Dünnschicht-Chromatographie aus dem Lipidextrakt isoliert. Eine Mischung zusammengesetzt aus das Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Cardiolipin und Phosphatidylglycerin wurde für die Monoschichtmessungen verwendet. Die Phosphatidylserinbande wurde verworfen,

da diese sich im benutzten Laufmittelsystem nicht von den Hopanoiden trennte. Analysen des organisch gebundenen Phosphats und des Fettsäuregehalts ergaben, daß dieser Extrakt 97 % (w/w) Phospholipide mit einer Fettsäurezusammensetzung von 80 % *cis*-Vaccensäure, 15 % Palmitinsäure und 5 % Myristinsäure enthielt. Der im Vergleich zum Lipidextrakt geringe Gehalt an Myristinsäure war zum Teil darauf zurückzuführen, daß der größte Teil der Myristinsäure im Phosphatidylserin enthalten war (Schulenberg 1987). Der Phospholipidextrakt war noch zu 3 % (w/w) mit dem THBH-Glykosid verunreinigt. THBH-Ether, THBH, Diplopterol und Hopan konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

Zum Einfluß der Temperatur auf die laterale Lipidpackung wurden bei 5 °C, 20 °C, 30 °C und 37 °C Isothermen der Phospholipide und des Lipidextraktes gemessen.

Alle Isothermen waren, unabhängig von der Kompressionsrate, sehr gut reproduzierbar. Die Phospholipidmischung verhielt sich flüssiganalog und durchlief keinen Phasenübergang zwischen 5 und 37 °C (Abb. 20). Der flüssiganaloge Charakter des Phospholipidgemisches zwischen 5 und 37 °C war mit dem hohen *cis*-Vaccensäuregehalt der Phospholipide in Einklang. Der minimale mittlere, molekulare Flächenbedarf nahm bei steigender Temperatur von 45 Å² auf 56 Å² zu. Alle Isothermen zeigten bei 21,5 Dyn/cm einen Knick, was auf eine Phasenseparierung hinweist. Die Kompressibilität des Lipidextraktes war wesentlich geringer als die der Phospholipidmischung (Abb. 21). Die Monoschicht des Lipidextraktes war zwar auch flüssiganalog, aber es lag eine dichtere laterale Packung der Lipide vor. Der Lipidextrakt durchlief ebenfalls keinen Phasenübergang zwischen 5 °C und 37 °C. Die Isothermen bei 30 °C und 37 °C zeigten einen Knick bei 31,5 mN/m, waren jedoch auch oberhalb dieses Filmdruckes reproduzierbar. Der minimale Flächenbedarf des Lipidextraktes nahm bei steigender Temperatur von 39,5 Å² bis 44 Å² zu. In Anwesenheit der Hopanoide wurde die Monoschicht bei Temperaturerhöhung nur halb so stark expandiert und zeigte in allen Fällen eine insgesamt dichtere laterale Lipidpackung.

Der Hopanoidgehalt im Lipidextrakt wurde durch Zusatz von Phospholipiden reduziert, so daß bei 20 °C Isothermen für Hopanoidgehalte von 0 %, 13.3 %, 20 % und 40 % gemessen werden konnten.

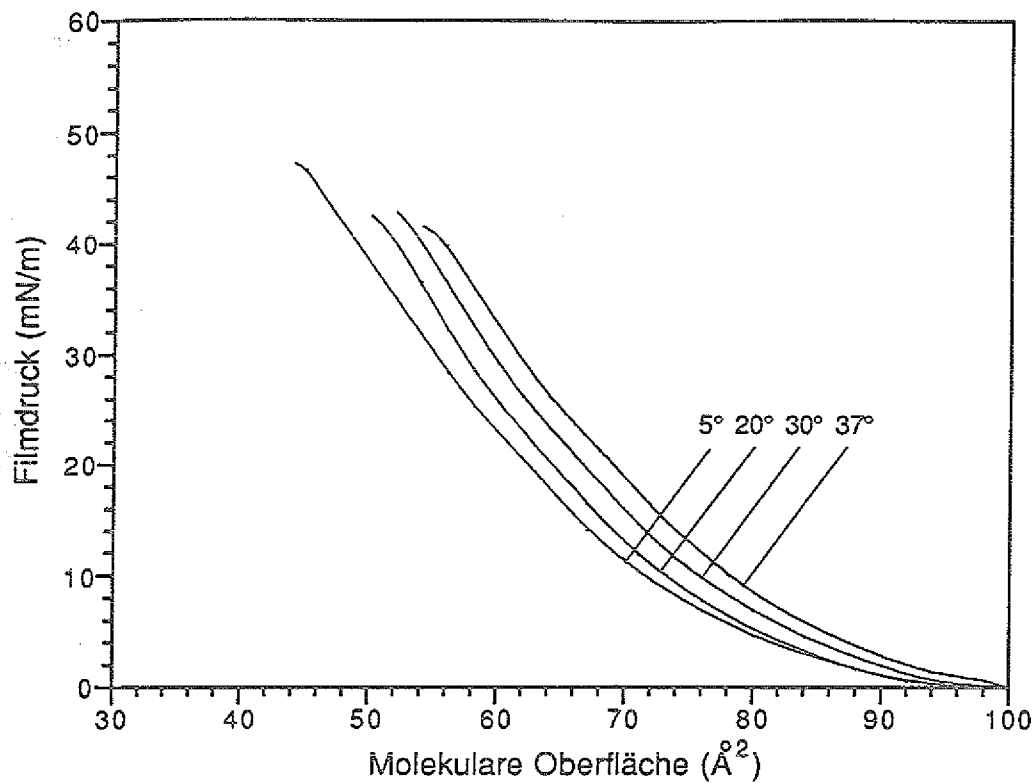


Abb. 20: Isothermen des Phospholipidgemisches bei 5 - 37 °C.

Dargestellt ist der Filmdruck als Funktion der molekularen Lipidfläche in der Phasengrenze.

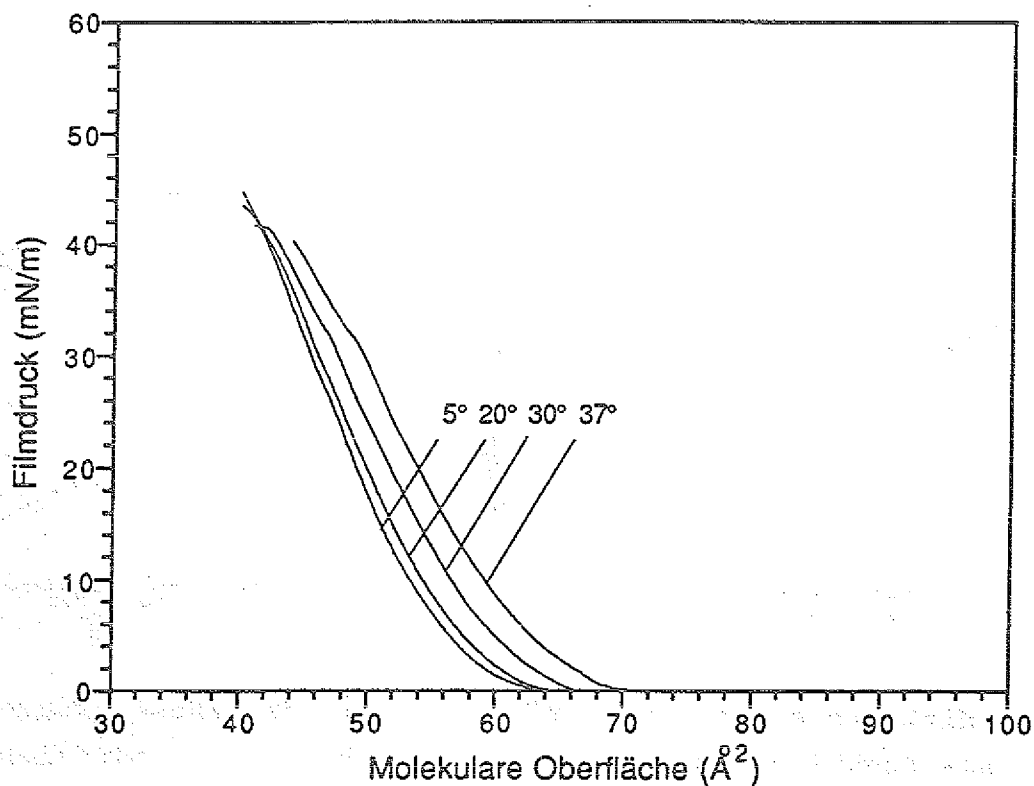


Abb. 21: Isothermen des Lipidextraktes bei 5 - 37 °C.

Dargestellt ist der Filmdruck als Funktion der molekularen Lipidfläche in der Phasengrenze.

ten. In Abb. 22 A-D sind die mittleren molekularen Flächen als Funktion des Hopanoidgehaltes und lateralen Filmdrucks dargestellt. Diesen wurde zum Vergleich die mittlere molekulare Fläche als Funktion des Hopanoidgehaltes bei idealem, rein additivem Mischverhalten gegenübergestellt. Diese rein additive Fläche wurde durch Interpolation zwischen den Meßwerten für 100 % Phospholipide und den Daten von Kannenberg et al. (1985) für die molekulare Fläche des THBH in fest-analoger Packung ermittelt. Dabei wurde angenommen, daß der mittlere molekulare Platzbedarf der Hopanoide in *Zymomonas mobilis* und der Platzbedarf des THBH etwa gleich sind. Abbildung 22 A-D zeigt, daß die mittleren molekularen Flächen, die im Lipidextrakt gemessen wurden, bei lateralen Filmdrucken von 10 , 20, 30 und 40 Dyn/cm 2.8, 1.7, 0.7 bzw. 1.8 Å² geringer waren als berechnet. Unter der Voraussetzung, daß die von Kannenberg ermittelten Flächen für THBH als

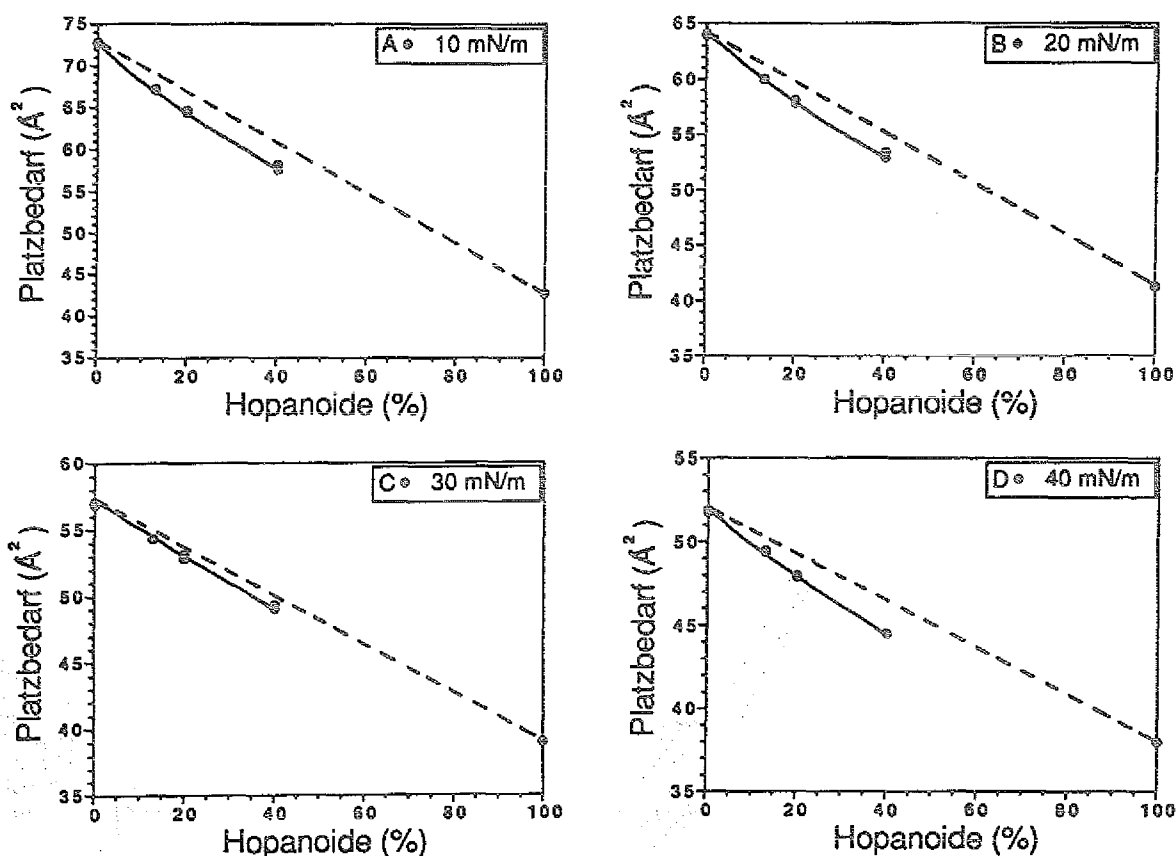


Abb. 22: Mittlere molekulare Lipidflächen in der Phasengrenze als Funktion des Hopanoidgehaltes bei unterschiedlichem Filmdruck.

A: 10 mN/m; B: 20 mN/m; C: 30 mN/m; D: 40 mN/m. Die gestrichelten Geraden repräsentieren die molekularen Lipidflächen in der Phasengrenze bei ideal additivem Verhalten.

minimale Werte für die Hopanoide in *Zymomonas mobilis* übertragbar sind, geht aus diesen Mischversuchen eine Kondensierung der Phospholipide durch die Hopanoide in *Zymomonas mobilis* hervor.

Neben der Temperatur können auch in der wässrigen Phase gelöste Stoffe die laterale Lipidpackung beeinflussen. Da die Hopanoide wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zur Ethanoltoleranz leisten, wurde der Einfluß von zunehmenden Ethanolkonzentrationen in der wässrigen Phase auf die laterale Lipidpackung in der Phasengrenzschicht untersucht. Dazu wurden Isothermen der Phospholipide und des Lipidextraktes bei 5 und 10 % (v/v) Ethanol in der wässrigen Phase gemessen. Um Isothermen mit unterschiedlichen Konzentrationen des oberflächenaktiven Ethanols in der wässrigen Phase vergleichen zu können, wurden in Abb. 23 und 24 die Filmdrucke gegen Wasser dargestellt.

Im Bereich der großen molekularen Lipidflächen in der Phasengrenze war der Filmdruck von der Ethanolkonzentration abhängig. Die Isotherme lieferte hier keine Information zu den Lipid-Lipidwechselwirkungen (Siehe Anhang 2). Erst bei fortschreitender Komprimierung war aus den Isothermen ersichtlich, daß die Monoschichten bei steigenden Ethanolkonzentrationen expandieren und kompressibler werden. Diese Effekte waren für Phospholipide und Lipidextrakt etwa gleich groß. Die laterale Packung der Lipide des Lipidextraktes war jedoch bei jedem Filmdruck dichter als die der Phospholipide und dieser Unterschied war größer als die aufgezeichneten Expansionen.

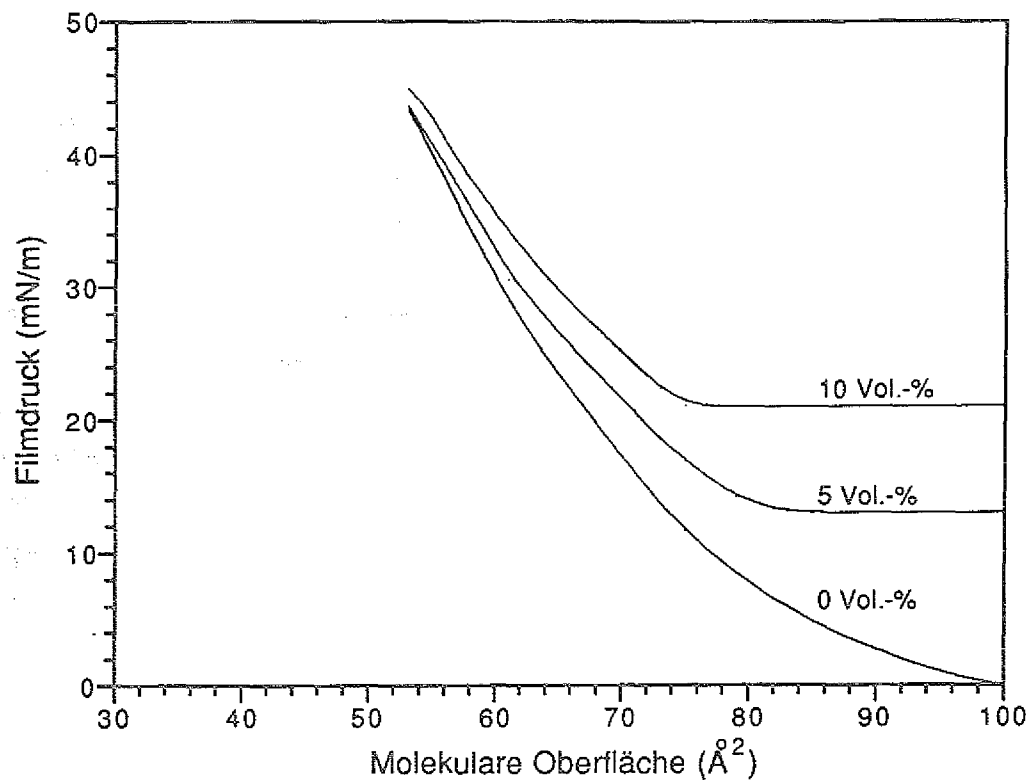


Abb. 23: Isothermen des Phospholipidgemisches bei 20 °C mit 0 %, 5 % oder 10 % (v/v) Ethanol in der Subphase.

Dargestellt ist der Filmdruck relativ zur Wasseroberfläche als Funktion der molekularen Lipidfläche in der Phasengrenze.

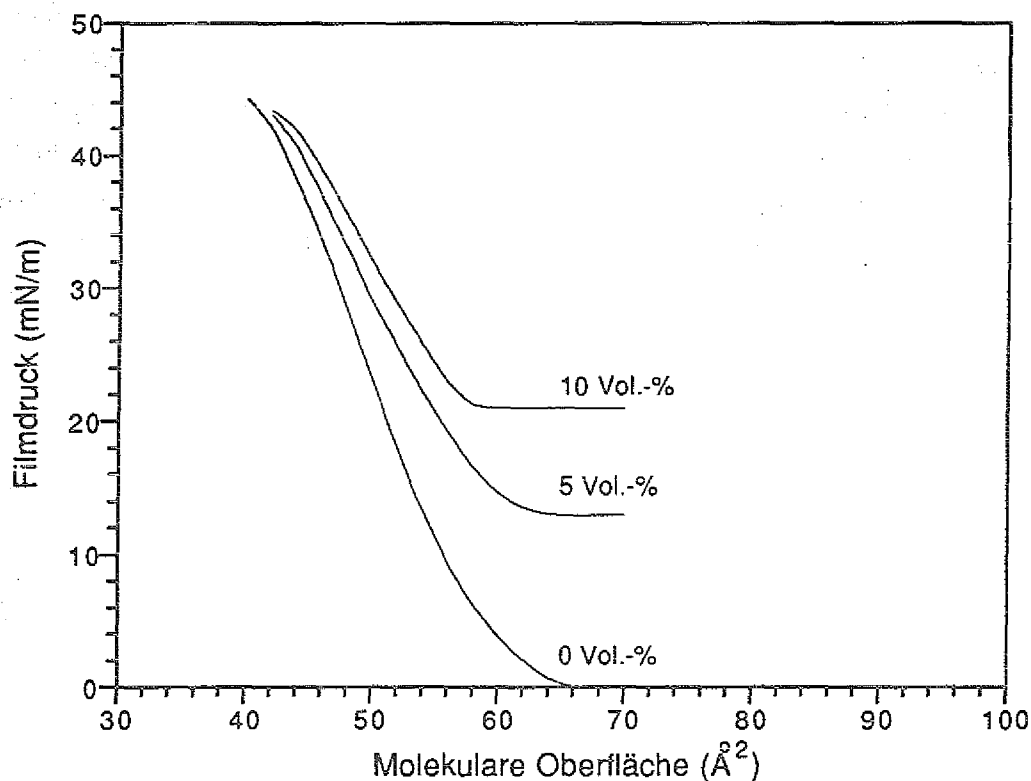


Abb. 24: Isothermen des Lipidextraktes bei 20 °C mit 0 %, 5 % oder 10 % (v/v) Ethanol in der Subphase.

Dargestellt ist der Filmdruck relativ zur Wasseroberfläche als Funktion der molekularen Lipidfläche in der Phasengrenze.

IV. Diskussion

Die Daten dieser Arbeit zur Ethanolbildungskinetik von *Zymomonas mobilis* in zweistufigen Fermentationen zeigen, daß dieses Bakterium auch bei wachstumsinhibierenden Ethanolkonzentrationen mit hoher spezifischer Rate Ethanol bilden kann. Zum Beispiel wurden noch 20 % der maximalen spezifischen Ethanolbildungsrate bei 100 g/l Ethanol in der zweiten Stufe gemessen. Im Vergleich zu verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen weist *Zymomonas mobilis* bei 50 bis 100 g/l Ethanol 5-6 mal höhere spezifische Ethanolbildungsraten auf (Ghose und Tyagi 1979, Toda et al. 1987, Chattaway et al. 1988, Beavan et al. 1989). In zweistufigen Fermentationsverfahren mit *Zymomonas mobilis* ist deshalb die volumetrische Produktivität in beiden Stufen höher als mit *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen, obwohl diese Hefen ihre niedrigere spezifische Ethanolbildungsrate durch eine ca. 4-Fach höhere Biomasseausbeute teilweise ausgleichen können (Ghose und Tyagi 1979, Verduyn et al. 1990). In einem direkten Vergleich zwischen *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* in zweistufigen Fermentationen mit Maisquellwasser (CSL) als Substrat, wurde bei Einsatz von *Zymomonas mobilis* eine um 38% höhere volumetrische Ethanolproduktivität erreicht als mit *Saccharomyces cerevisiae* (Beavan et al. 1989). *Zymomonas mobilis* konnte zudem 86.9 g/l Ethanol bilden während die Hefe nur 76.6 g/l Ethanol produzierte. Bei der kontinuierlichen Bildung von 100 g/l Ethanol wurden in den zweistufigen Fermentationen mit *Zymomonas mobilis* in dieser Arbeit volumetrische Produktivitäten ermittelt, die bis zu zweimal höher waren als in 3 oder 4-stufigen Verfahren mit suspendierten Hefezellen (Chu et al. 1971, Chattaway et al. 1988). Die hohe Ethanolbildungsrate von *Zymomonas mobilis* könnte in Verfahren mit Biomasserückführung noch weiter genützt werden (Charley et al. 1983, Lawford et al. 1984, Lawford 1988).

Zur Optimierung der volumetrischen Produktivität in zweistufigen Fermentationen wurden die Effekte der Kulturparameter pH und Glukosekonzentration auf die Wachstums- und Ethanolbildungskinetik von *Zymomonas mobilis* ermittelt. Die volumetrischen Ethanol- und Biomasseproduktivitäten in der ersten Stufe waren bei pH-Werten zwischen 5 und 5.5 maximal. Obwohl die Biomasseausbeute gemäß den Berichten von Lawford et al. (1988) bei pH 6.0 maximal

war, nahmen die volumetrische Produktivitäten bei dieser pH bereits ab. Die Fermentationen von Lawford et al. zeigten bei pH 4.5 bis 6.5 gleiche volumetrische Ethanolproduktivitäten, da sie alle glucoselimitiert und bei einer Durchflußrate durchgeführt wurden. Andere Fermentationsverfahren mit *Zymomonas mobilis* zeigten jedoch ebenfalls eine Optimale Ethanolproduktivität bei pH 5 oder 5.5 (Torres und Baratti 1987, Davison und Scott 1988, Sreekumar und Basappa 1991).

In den Fermentationen dieser Arbeit nahm die spezifische Glukoseverbrauchsrate bei steigendem pH von 8.5 g/g*h bei pH 4.5 auf 7.2 g/g*h bei pH 6.0 ab. Die Abnahme bei pH 5 und 5.5 war teilweise durch zunehmende Ethanolkonzentration bedingt, aber die Ergebnisse bei pH 4.5 und 6.0 konnten direkt verglichen werden. Der höhere Glukoseverbrauch bei pH 4.5 wird dem höheren Maintenance Energieverbrauch zugeschrieben (Lawford 1988, Jones und Doelle 1991). Jones und Doelle postulierten, daß die zusätzliche Energie durch die membrangebundene ATPase zur Aufrechterhaltung des zellinternen pH-Wertes verbraucht wird und daß folglich die Entkoppelung der Ethanolbildung vom Wachstum über den pH-Wert im Kulturmedium regelbar ist. Aus Ergebnissen dieser Arbeit geht jedoch hervor, daß dies nur bedingt der Fall sein kann, da Messungen des zellinternen pH ergaben, daß bei Ethanolkonzentrationen über 33 g/l die Fähigkeit von *Zymomonas mobilis* zur pH-Homöostasis zunehmend reduziert wird. Die membrangebundene H⁺-ATPase Aktivität reichte nicht aus, um den zellinternen pH bei höheren Ethanolkonzentrationen auf einem Wert von 6.0 konstant zu halten. Das bedeutet, daß durch Herabsetzen des pH im Kulturmedium der zweiten Stufe keine größere Entkopplung bzw. spezifische Glukoseverbrauchsrate erreicht werden kann.

Durch Heraufsetzen des pH-wertes im Kulturmedium der zweiten Stufe von 5 auf 5.5 wurde auch der zellinterne pH von 5.1 auf 5.6 angehoben. Obwohl das pH-Optimum aller katabolen Enzyme und der membrangebundenen ATPase in *Zymomonas mobilis* höher oder gleich 6.0 ist (Vikarii 1988), stieg die spezifische Ethanolbildungsrate von *Zymomonas mobilis* in der zweiten Stufe mit pH 5.5 oder 6.0 bei 100 g/l Ethanol nicht an. Daraus geht hervor, daß das Absinken des zellinternen pH-Wertes bei steigenden Ethanolkonzentrationen, entgegen Vermutungen von Osman et al. (1987), nicht die Ursache für die gleichzeitig abnehmenden Fermentationsraten ist. Der üblicherweise bei *Zymomonas mobilis*-Fermenta-

tionen benutzte Kultur-pH-Wert von 5 bis 5.5 führte also auch in zweistufigen Fermentationen zu maximalen spezifischen und volumetrischen Ethanolproduktivitäten.

Eine mindestens 25 % höhere volumetrische Ethanolproduktivität der zweistufigen Fermentation wurde durch Verteilung der Glukose über die beiden Stufen erreicht. Neben der Vermeidung von Substratinhibierung und der geringere Nebenproduktbildung ist die stabilere Leistung der ersten Stufe bei den niedrigeren Glukosekonzentrationen ein drittes Argument für eine Verteilung der Glukose über die beiden Stufen. Kontinuierliche Fermentationen von *Zymomonas mobilis* mit 20 % Glukose im Substrat wurden bisher nur bezüglich ihrer dauerhaften Oszillationen beschrieben (Lee et al. 1979, Ghommidh et al. 1989). Die im Vergleich zu den Literaturdaten hohen Durchflußraten der ersten Stufe ermöglichten stabile Fließgleichgewichte in dieser Arbeit. Dem Fließgleichgewicht gingen jedoch längere Oszillationen voran, wenn große Änderungen der Durchflußraten vorgenommen wurden.

Die Annahme von Posten (1987), daß bei halbem Substratumsatz in der erste Stufe Substratinhibierung keine Rolle mehr spielt, erwies sich in dieser Arbeit bei einer Glukosesubstratkonzentration von 20 % (w/v) somit als falsch. Carey und Ingram (1983) beschrieben, daß sich in Batchfermentationen die Wachstumsinhibierungen durch Ethanol und Glukose gegenseitig verstärkten. In

Tab. 16: Maximale Wachstumsraten von *Zymomonas mobilis* als Funktion der Glukose- und Ethanolkonzentrationen im Kulturmedium.

Glukose (g/l)	Ethanol (g/l)	$\mu_{\max}$ (1/h)
74	13	0.41
112	9.6	0.40
152	9.7	0.24*
35	54	0.19
85	53	0.13

Die maximalen Wachstumsraten wurden aus turbidostatischen Fermentationen dieser Arbeit ermittelt, außer * (van Baalen 1991).

den kontinuierlichen Fermentationen dieser Arbeit wurde das ebenfalls beobachtet (Tab. 16).

Obwohl der Mechanismus der Wachstumsinhibierung durch hohe Glukosekonzentrationen bis jetzt ungeklärt ist (Houssin et al. 1991), wird diese generell mit der geringeren Wasseraktivität des Mediums in Zusammenhang gebracht (Brown 1976, Lin et al. 1991, Park und Baratti 1991, van Baalen 1991). Zunehmende Ethanolkonzentrationen verringern die Wasseraktivität zusätzlich, was die Verstärkung der Wachstumsinhibierungen durch Glukose und Ethanol in der ersten Stufe bewirken könnte (Jones und Greenfield 1986, Lin et al. 1991).

In der kontinuierlichen zweistufigen Fermentation mit *Zymomonas mobilis* konnten maximal 107 g/l Ethanol gebildet werden. Die Messungen der CO₂-Bildungsraten bei 100, 110 und 120 g/l Ethanol über längere Zeiträume zeigten, daß nicht die Inhibierung des Glukoseumsatzes durch Ethanol, sondern die Abnahmen der katabolen Raten als Funktion der Zeit bei diesen hohen Ethanolkonzentrationen maßgeblich für die maximal erreichbaren Ethanolkonzentration waren. Der Einfluß der Inkubationszeit auf die spezifische Ethanolbildungsrate ist auch aus dem Vergleich der maximal erreichbaren Ethanolkonzentrationen verschiedener Fermentationsverfahren ersichtlich. Eine Ethanolkonzentration von 165 g/l konnte in sechs Stunden von einem zellfreiem System mit hohen Konzentrationen der katabolen Enzyme von *Zymomonas mobilis* erreicht werden (Scopes und Griffiths-Smith 1986). In Batchfermentationen mit einer Dauer von 24 Stunden wurden maximal 127 g/l Ethanol gebildet (Rogers et al. 1982). In den kontinuierlichen zweistufigen Fermentationen der vorliegende Arbeit wurde bei einer Verweilzeit von 50 Stunden 107 g/l Ethanol erreicht. Kontinuierliche Verfahren mit auf Träger immobilisierter Biomasse erreichten maximal 70 - 80 g/l Ethanol (Amin und Doelle 1990, Weuster 1991).

Die Abnahme der katabolen Rate als Funktion der Zeit bei hohen Ethanolkonzentrationen ist auch für Hefen bekannt (Namba et al. 1987, Kida et al. 1990, Chen et al. 1990a, 1990b). Beispielsweise nahm bei 100 g/l Ethanol die spezifische Ethanolbildungsrate von *Kluyveromyces fragilis* in ca. 20 Stunden, also doppelt so schnell wie bei *Zymomonas mobilis*, um die Hälfte ab (Chen et al. 1990a).

Die Abnahme der Ethanolbildungsrate als Funktion der Zeit bei 100 g/l Ethanol bewirkte bei einer mittleren Verweilzeit in der zweiten Stufe von ca. 20 Stunden eine Verringerung der mittleren spezifischen Aktivität von 32 %. Diese kann durch die Abnahmen der spezifischen Enzymaktivitäten erklärt werden. In Batchfermentationen mit *Zymomonas mobilis* wurde ebenfalls eine langsame Abnahme der spezifischen Aktivitäten aller glykolytischen Enzyme beobachtet, nachdem mehr als 70 g/l Ethanol akkumuliert war und kein Protein mehr synthetisiert wurde (Osman et al. 1987).

Hinsichtlich der Stabilität kataboler Enzyme gegen Denaturierung durch 100 g/l Ethanol *in vitro* (Millar et al. 1982, Scopes und Griffiths-Smith 1986) könnte diese Aktivitätsabnahme, statt auf Denaturierung durch Ethanol, auch auf eine fehlende Neusynthese aktiver Enzyme beim Protein-Turnover (Enzymneusynthese + proteolytischer Abbau) zurückzuführen sein. Ein Hinweis auf proteolytischen Abbau in *Zymomonas mobilis* während der stationäre Phase einer Fermentation ergaben zweidimensionale gel-elektrophoretische Analysen aller katabolen Enzyme für die Ethanolbildung (An et al. 1991). Nach 72 Stunden Fermentationsdauer waren in der stationären Phase die Banden der Glukokinase, Pyruvatkinase und Alkoholdehydrogenase I nicht mehr nachweisbar.

Bei 120 g/l Ethanol könnte die schnellere Abnahme der Ethanolbildungsrate als Funktion der Zeit auf erhöhte Permeabilität der Zellen zurückzuführen sein. In den Batchfermentationen wurde nach Zugabe von Ethanol zu einer Konzentration von 120 g/l Ethanol der langsame Verlust von ATP, ADP und AMP aus der Zelle in den Kulturüberstand beobachtet. Bei Ethanolkonzentrationen bis 200 g/l wurde kein Verlust von zellulärem Protein in das Medium beobachtet, so daß Lysis als Grund für das Auftreten der Nukleotide im Überstand unwahrscheinlich ist (Osman und Ingram 1985). Der Verlust von Cofaktoren sowie Intermediaten kann daher nach Osman und Ingram (1985) die schnellere Desaktivierung der Ethanolbildungsaktivität bei Ethanolkonzentrationen über 110 g/l bewirken.

Die Messungen der Glukoseverbrauchsrates als Funktion der Ethanolkonzentration deuteten darauf hin, daß der Glukoseumsatz erst bei Ethanolkonzentrationen über 150 g/l vollständig inhibiert wird. Osman und Ingram (1985) beobachteten eine vollständige Inhibierung des Glukoseumsatzes bei 200 g/l Ethanol. Bezüglich der

Ethanoltoleranz des Katabolismus ist *Zymomonas mobilis* somit vergleichbar mit diversen ethanoltoleranten Hefestämmen, wobei Ethanolkonzentrationen von 129 g/l bis 195 g/l die sofortige vollständige Inhibierung der Ethanolbildung bewirken (Toda et al. 1987, Pascual et al. 1988, Chen et al. 1990, Watanabe et al. 1990).

Die Effekte von Ethanol auf die Physiologie von *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* sind jedoch in einigen Hinsichten verschieden. *Saccharomyces cerevisiae* konnte für die ganze Dauer einer Batchfermentation mit 200 g/l Glukose den zellinternen pH nahezu konstant halten, wobei der pH-Gradient sogar zunahm (Dombek und Ingram 1987). Dabei scheint die *in vivo* Aktivierung der Plasmamembran ATPase durch Ethanol, welche die Inhibierung dieser ATPase durch Ethanol ausgleicht, zur pH-Homeostasis beizutragen (Rosa und Sá-Correia 1991, 1992). Der Energy Charge nahm jedoch bei steigenden Ethanolkonzentrationen, bedingt durch die intrazelluläre Akkumulation von AMP, drastisch ab (Dombek und Ingram 1988). Für *Zymomonas mobilis* dagegen wurde sowohl in Batch- als auch in kontinuierlichen Fermentationen beobachtet, daß steigende Ethanolkonzentrationen eine Abnahme des zellinternen pH-Wertes und des pH-Gradienten über die Membran bewirken, während die Energy Charge bis einschließlich 100 g/l Ethanol unverändert hoch bleibt (diese Arbeit, Osman et al. 1987). Dabei wurde bei Erhöhung der Ethanolkonzentration von 18 auf 40 g/l (Jones und Doelle 1991) oder von 53 g/l (1. Stufe) auf 100 g/l Ethanol (2. Stufe) keine Aktivierung der ATPase-Aktivität in *Zymomonas mobilis* beobachtet. *In vitro* inhibierten zunehmende Ethanolkonzentrationen jedoch die ATPase von *Zymomonas mobilis* und zwar etwa gleich stark wie die der Hefe (Cartwright et al. 1987).

Es war bislang unbekannt, ob die Abnahme der spezifischen Ethanolbildungsrate von *Zymomonas mobilis* bei zunehmenden Ethanolkonzentrationen auf eine Inhibierung des zellinternen Abbaus von Glukose oder auf die Inhibierung des Glukosetransportes beruht. Glukose wird in *Zymomonas mobilis* nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion aufgenommen (Dimarco und Romano 1985). Durch Messungen der zellinternen Glukosekonzentration wurde gezeigt, daß bei der Inhibierung der spezifischen Ethanolbildungsrate durch Ethanol der zellinterne Katabolismus mit Glukose gesättigt

ist. Der Glukosetransport ist bei zunehmenden Ethanolkonzentrationen im Medium also nicht limitierend für die Ethanolbildung. Auch bei *Saccharomyces cerevisiae* wird Glukose mittels erleichterter Diffusion aufgenommen. Eine nicht-kompetitive Inhibierung des Zuckertransportes durch Ethanol und andere Alkohole konnte zwar nachgewiesen werden (Dombek und Ingram 1988, Pascual et al. 1988, Leao und van Uden 1982). Sie war aber ebenfalls nicht limitierend für die Ethanolbildungsrate (Dombek und Ingram 1988, Pascual et al. 1988).

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Wachstum von *Zymomonas mobilis* bei Ethanolkonzentrationen über 72 g/l Ethanol vollständig inhibiert wird (Jöbses und Roels 1986, Schmid 1985, Stevnsborg und Lawford 1986). Trotzdem ging aus den Biomassekonzentrationen in den beiden Stufe der zweistufigen Fermentation hervor, daß in der zweiten Stufe bei 100 g/l Ethanol noch eine Biomassezunahme stattfand. Nach stufenweiser Erhöhung der Ethanolkonzentration in exponentiell wachsenden Batchfermentationen auf 80 - 100 g/l Ethanol nahm die Biomasse ebenfalls noch zu (Ghommidh et al. 1989). Außerdem konnte in *Zymomonas mobilis* die Biosynthese von Proteinen bei Ethanolkonzentrationen bis zu 100 g/l nachgewiesen werden (Michel und Starka 1986, An et al. 1991). Offensichtlich geht nach schrittweiser Erhöhung der Ethanolkonzentration auf über 72 g/l eine Übergangsphase, in der noch Biosynthese stattfindet, der vollständigen Inhibierung des Wachstums voraus. Untersuchungen der katabolen und anabolen Raten während dieser Übergangsphase zeigten, daß mindestens drei anabole Funktionen, Zellteilung, DNA- und Fettsäuresynthese nach Ethanolzugabe sofort und vollständig inhibiert wurden. Aus den weiteren Ergebnissen der Batchfermentationen geht hervor, daß die Inhibierung anaboler Vorgänge der primäre Mechanismus für die Wachstumsinhibierung durch Ethanol ist und daß diese Inhibierung nicht durch Permeabilisierung oder Energiemangel bedingt war oder gleichzeitig damit auftrat.

Ethanol und andere Alkohole bewirken prinzipiell eine Fluidisierung der Membran und eine Erhöhung der passiven Permeabilität (Leao und van Uden 1984, Enequist et al. 1981, Cartwright et al. 1986). Inkubation in 2% (v/v) Butanol führte z.B. bei *Clostridium acetobutylicum* zum Verlust der Intermediate Hexosephosphat

und Phosphoenolpyruvat (Hutkins und Kashket 1986). Die Beobachtung eines dosisabhängigen Verlustes von Mg^{2+} -Ionen und Adenosinnukleotiden aus *Zymomonas mobilis* bei Ethanolkonzentrationen zwischen 0 und 100 g/l (Osman und Ingram 1985) war der Anlaß, Kofaktor- und Metabolitverlust als Mechanismus der Fermentations- und Wachstumsinhibierung in *Zymomonas mobilis* zu diskutieren (Ingram 1986, Osman et al. 1987, Buchholz et al. 1987, Amin und Doelle 1990, Veeramallu und Agrawal 1990). Die Ethanolzugabe bis 100 g/l induzierte in den Batchfermentationen dieser Arbeit jedoch keinen Verlust von Adenosinphosphaten; der zellinterne Pool der Adenosinphosphaten nahm sogar noch zu. Die katabolen Raten bei 80, 90 und 100 g/l wurden zwar durch die Ethanolzugabe herabgesetzt, aber blieben danach während mindestens fünf Stunden konstant. Kofaktor- und Metabolitverlust dagegen hätten die katabolen Raten zunehmend verringert.

Eine Erhöhung der passiven Permeabilität kann jedoch vor Metabolitverlust zu Herabsetzung der Proton Motive Force führen. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zum Beispiel wurde bei steigenden Ethanolkonzentrationen eine Zunahme des passiven Proton Influx beobachtet (Leao und Van Uden 1984). Die dosisabhängige Inhibierung der OD-Zunahme durch CCCP in Batchfermentationen bei 90 g/l Ethanol zeigte aber, daß die OD-Zunahme von *Zymomonas mobilis* in der Übergangsphase von der Proton Motive Force abhängig ist (Ruhrmann und Krämer 1992). Das Niveau der Proton Motive Force ist daher zumindest einige Stunden nach Ethanolzugabe noch für den Transport ausreichend, was eine Entkopplung durch erhöhte Permeabilität als Auslöser für die sofortigen anabolen Inhibierungen unwahrscheinlich macht.

Die Erhöhung der Ethanolkonzentration auf 80 - 100 g/l bewirkte in den Batchfermentationen auch keinen akuten Energiemangel. Obwohl die spezifische Glukoseverbrauchsrate sofort nach Ethanolzugabe abnahm, war an dem weiteren Anstieg der OD ersichtlich, daß noch ATP zur Biosynthese vorhanden war. In Einklang mit dem Fehlen von Reservestoffen in *Zymomonas mobilis* (Swings und De Ley 1977) konnte über Kohlenhydrat- und Phosphatanalysen ausgeschlossen werden, daß ein Verbrauch von Reserveenergie in der Übergangsphase den Energiemangel ausglich.

Die in der Literatur beschriebene Zunahme des Maintenance Energieverbrauchs bei steigender Ethanolkonzentration wurde aus

Gleichgewichtszuständen kontinuierlicher Fermentationen ermittelt (Fiescho und Humpfrey 1983, Beyeler et al. 1984, Jöbses et al. 1987). In den Batchfermentationen wurde jedoch durch die Zugabe von Ethanol das Gleichgewicht gestört und eine Übergangsphase induziert. Möglicherweise nahm der Maintenance Energieverbrauch nach schrittweiser Erhöhung der Ethanolkonzentration erst allmählich zu. Der Energiemangel würde sich dann äußern in der langsamen Abnahme der Wachstumsrate. Die Zunahme des Adeninnukleotidpools während der Übergangsphase zeigte jedoch, daß kein Energiemangel entstand. Bei einer Batchfermentation mit 85 g/l Ethanol, wurde in 4.5 Stunden nach Ethanolzugabe eine Zunahme des Adenosinnukleotid-Pools von mehr als 80 % beobachtet. Bei Bestimmungen der Zellgrößenverteilung hatte sich zudem gezeigt, daß die Zellgröße während dieser Zeit nur um 14 % zunahm, was wahrscheinlich auf die Inhibierung der Lipidbiosynthese zurückzuführen ist. Diese große Zunahme des AXP-Pools bei gleichzeitig nur geringer Zunahme des Zellvolumens läßt auf eine Erhöhung der ATP-Konzentration im Zellinnern schließen. Bei sehr geringen Ethanolkonzentrationen wurde ebenfalls beobachtet, daß der ATP-Pool in *Zymomonas mobilis* absteigt, wenn der ATP-Verbrauch für die Biosynthese abgenommen hatte (Lazdunski und Belaich 1972). Eine solche Zunahme zeigt, daß die Abnahme der OD-Zuwachsrates nicht durch Energiemangel bedingt ist (Houssin et al. 1991).

Die biochemische Basis der Inhibierung von Zellteilung, DNA- und Fettsäurebiosynthese durch Ethanol wurde noch nicht weiter untersucht. Eine Inhibierung der Zellteilung in *Zymomonas mobilis* wird jedoch auch bei anderen, nicht-optimalen Kulturbedingungen beobachtet. Erhöhte Temperatur (Stevnsborg et al. 1986, Jöbses et al. 1985), erhöhte Salzkonzentration (Fein et al. 1984, Rogers et al. 1980, Stevnsborg et al. 1986, Park und Baratti 1991) und hohe Konzentrationen von Ethanol + Glukose (Lee, 1979) inhibieren die Zellteilung und führen zu Filamentbildung. Ethanol induzierte in *E. coli* K12 eine Filamentbildung, die auf vollständiger, jedoch reversibler Inhibierung der Zellteilung beruhte (Fried und Novick 1973). Die relativ hohe Lebensfähigkeit der Zellen in der zweiten Stufe zeigte, daß die Inhibierung der Zellteilung durch Ethanol auch in *Zymomonas mobilis* lange Zeit reversibel ist.

In den Batchfermentationen konnte keine Filamentbildung beobach-

tet werden, da die OD nur um einen Faktor zwei zunahm. Es trat aber auch keine Zellvergrößerung auf, was wahrscheinlich durch die gleichzeitige Inhibierung der Fettsäurebiosynthese bzw. Phospholipid- und Lipopolysaccharidbiosynthese bedingt war. Markierungsexperimente haben ergeben, daß auch in *Zymomonas mobilis* die Fettsäurebiosynthese von der Vorstufe Acetyl-CoA ausgeht (Sutter 1991). In *Zymomonas mobilis* wird Acetyl-CoA durch den Pyruvat- Dehydrogenase-Komplex gebildet (Bringer-Meyer 1992, persönliche Mitteilung) und ist indirekt auch Vorstufe für die Aminosäuren der Aspartat- und Glutamatfamilie. Da die Batchfermentation in Minimalmedium zeigte, daß die Aminosäurebiosynthese bei 90 g/l Ethanol noch erfolgte, ist es unwahrscheinlich, daß die vollständige Inhibierung der Fettsäurebiosynthese auf einen Mangel der Vorstufe Acetyl-CoA beruht.

Für die ausgeprägte Ethanoltoleranz von *Zymomonas mobilis* sind wahrscheinlich die in der Membran vorhandenen Hopanoide mitverantwortlich (Bringer et al. 1985, Schmidt et al. 1986). *Zymomonas mobilis* weist mit 30 mg Hopanoiden pro g Trockengewicht den höchsten Hopanoidgehalt auf, der bislang in Prokaryonten nachgewiesen wurde. Der Hopanoidgehalt in *Bacillus acidocaldarius* war maximal nur halb so hoch (Poralla et al. 1984). Untersuchungen über das Vorkommen von Hopanoiden in Prokaryonten ergaben, daß etwa 50 % der untersuchten Stämme Hopanoide synthetisierten und bis zu 5 mg Hopanoide/g Trockengewicht einbauten (Rohmer et al. 1984).

Das molare Verhältnis von Hopanoiden zu Phospholipiden in *Zymomonas mobilis* lag bei einem breiten Spektrum von Ethanolkonzentrationen, Wachstumsraten und Temperaturen zwischen 0.7 und 1.05. Das zeigt, daß Hopanoide in *Zymomonas mobilis* konstitutiv gebildet werden und mit einem großen Anteil an der Membranstruktur beteiligt sind. Der Beitrag von Hopanoiden an der Ethanoltoleranz von *Zymomonas mobilis* wurde bei Zellen mit einem, durch den Inhibitor Azasqualen bedingten, herabgesetzten Hopanoidgehalt gezeigt. Der geringere Hopanoidgehalt führte zu einer Verstärkung der Wachstumsinhibierung durch Ethanol (Horbach et al. 1991). Viele Mikroorganismen reagieren auf Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes oder der Ethanolkonzentration, indem sie unter anderem durch Variation des Hopanoid- oder Sterolgehaltes

ein optimales Fluiditätsniveau in der Membran einstellen (Anderson et al. 1981, Poralla et al. 1984, Hunter und Rose 1972, Michaelis und Michaelis 1983). Steigende Ethanolkonzentrationen induzieren in *Zymomonas mobilis* jedoch weder im Hopanoidgehalt und -Zusammensetzung (dieser Arbeit) noch in der Fettsäure- und Phospholipidzusammensetzung signifikante Änderungen (Carey und Ingram 1983). Wegen den hohen Ethanolbildungsraten und -ausbeuten von *Zymomonas mobilis* ist es wahrscheinlich, daß die konstitutive Lipidzusammensetzung eine Anpassung an Wachstum in Medien mit Ethanol ist (Carey und Ingram 1983).

Für die Hopanoidderivate THBH und Diplopterol sowie das Bacteriohopan-32-monol waren bereits ein festanalogenes Verhalten sowie kondensierende und stabilisierende Eigenschaften beschrieben worden (Kannenberg et al. 1980, 1985, Nagumo et al. 1991). Die fluiditätsmodulierende Wirkung der Hopanoide aus *Zymomonas mobilis*, im besonderen der Ether- und Glykosidderivate, wurde in Monoschichtuntersuchungen an Gesamtlipiden (= Hopanoiden + Phospholipiden) und Phospholipiden nachgewiesen. Die geringere Kompressibilität und dichtere laterale Packung der Gesamtlipide zeigten, daß die Hopanoide die globale Fluidität der Lipide reduzierten und eine stärkere Strukturierung in der Monoschicht bewirkten. Vergleichbar mit der Wirkung des Cholesterols (Kannenberg 1983) war die Expansion der Monoschicht des Lipidextraktes bei steigender Temperatur nur halb so groß wie die der Monoschicht der Phospholipide. Unter der Voraussetzung, daß die mittlere molekulare Fläche der *Zymomonas mobilis* Hopanoidfraktion nicht kleiner ist als die des THBH, ging aus den Isothermen der Mischungen von Gesamtlipiden und Phospholipiden außerdem eine Kondensierung der Phospholipide durch die Hopanoide hervor. Analog zu der Wirkung des Cholesterols beruht dieser Effekt wahrscheinlich auf der Einlagerung der rigiden planaren Fünfringstruktur in die hydrophobe Membranregion (Kannenberg 1983). Zudem ist es denkbar, daß die polaren Seitenketten des THBH sowie der Ether- und Glykosidderivate an der Wasserstoffbrückenbildung über die Membranoberfläche teilnehmen und so die Membran stabilisieren (Hauser et al. 1981, Boggs 1987).

Bei den Monoschichtmessungen mit zunehmenden Ethanolkonzentrationen in der wäßrigen Phase zeigte sich, daß die Monoschichten

des Phospholipidgemisches und die des Lipidextraktes etwa gleichermaßen expandiert wurden. Eine eher geringe Wirksamkeit der Hopanoide gegen die fluidisierende Wirkung des Ethanol wurde auch von Rauh (1987) beschrieben. Die Expandierung könnte auf eine zunehmende elektrostatische Abstoßung der polaren Lipidköpfe oder auf eine Störung der Wasserstoffbrückenbildung zurückzuführen sein (Ingram und Buttke 1984, Hoek und Tarashi 1988). Die laterale Packung der Lipide des Lipidextraktes blieb jedoch immer insgesamt dichter als die der Phospholipide. Dieser Unterschied war größer als das Ausmaß der Expansionen durch Ethanol. Eine dichtere laterale Packung der Lipide führt generell zur Reduzierung von Verteilungskoeffizienten und Permeabilitäten für lipophile und amphiphile Molekülen (De Young und Dill 1988). Möglicherweise ist die Ethanoltoleranz der Membran nicht nur dadurch bedingt, daß expandierenden Effekten entgegen gewirkt wird, sondern auch dadurch, daß die Lipidpackung durch Einlagerung von 40 % Hopanoiden dichter und stabiler ist (Nagumo 1991). Der hohe konstitutive Hopanoidgehalt von *Zymomonas mobilis* könnte so für einen breiten Bereich von Ethanolkonzentrationen permeabilisierenden Effekten entgegenwirken.

Die spezifische Funktion der Zuckerreste in den Seitenketten der Ether- und Glycosidderivate konnte in dieser Arbeit noch nicht geklärt werden. Dazu ist eine Aufreinigung dieser Derivate notwendig, sodaß die Membraneigenschaften der Reinsubstanzen in Monoschicht- und Liposomenversuchen ermittelt und mit denen der einfachen Hopanoide und Cholesterol verglichen werden können.

Zymomonas mobilis ist für seine ausgeprägte Ethanoltoleranz bekannt. In der vorliegende Arbeit wurde gezeigt, daß sogar bei 100 g/l Ethanol die Membranstabilität, die Aktivitäten kataboler Enzymen, die Lebensfähigkeit, eine hohe Energie Charge und zellinterne ATP-Konzentration lange Zeit erhalten bleiben. Sie ermöglichten, vom Wachstum entkoppelt, die kontinuierliche Bildung von 100 g/l Ethanol in zweistufigen Fermentationen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ethanol auf den Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis* untersucht.

1. Kontinuierliche zweistufige Fermentationen zeigten, daß *Zymomonas mobilis* bei 100 g/l Ethanol, vom Wachstum entkoppelt, mit noch 20 % der maximalen spezifischen Rate Ethanol bildet. Die volumetrische Ethanolproduktivität der zweistufigen Fermentation war maximal zwischen pH 5 und 5.5. Durch eine Verteilung der Glukose über beide Stufen wurde Substratinhibierung in der ersten Stufe vermieden und die Nebenproduktbildung um die Hälfte reduziert. Die volumetrischen Ethanolproduktivität wurde dabei von 3.6 g/l*h auf 4.5 g/l*h um 25 % erhöht.

2. Die Messung der Ethanolbildungsrate als Funktion der Zeit ergab, daß bei 100 g/l Ethanol die katabole Aktivität in 40 Stunden um die Hälfte abnahm. Durch diese Desaktivierung war die mittlere spezifische Aktivität in der zweiten Stufe ca. 30 % niedriger als der Anfangswert. Bei 110 g/l und 120 g/l Ethanol halbierte sich die Ethanolbildungsrate bereits nach 8 bzw. 4 Stunden. Es konnte berechnet werden, daß diese Desaktivierung die maximal erreichbare Ethanolkonzentration in zweistufigen Fermentationen auf ca. 110 g/l begrenzte. In Einklang damit wurde experimentell die kontinuierliche Bildung von 107 g/l Ethanol nachgewiesen.

3. Untersuchungen zum Einfluß von Ethanol auf die Physiologie von *Zymomonas mobilis* zeigten, daß bei Ethanolkonzentrationen über 33 g/l die Fähigkeit von *Zymomonas mobilis* zur pH-Homöostasis abnahm. Dazu konnte die Inhibierung der membrangebundenen H^+ -ATPase durch Ethanol beitragen. Die spezifische Aktivität einiger katabolen Enzyme in den Zellen der zweiten Stufe war ca. 30 % niedriger als in denen der ersten Stufe. Das erklärte die Abnahme der spezifischen Ethanolbildungsrate als Funktion der Inkubationszeit bei 100 g/l Ethanol. Die Lebensfähigkeit blieb jedoch bei 100 g/l Ethanol minimal 17 Stunden erhalten. Die ausgeprägte Ethanoltoleranz von *Zymomonas mobilis* zeigte sich zudem daran, daß die hohen Werte für Energie Charge (0.9) und ATP-Konzentration (4.4 mM) in der zweiten Stufe erhalten blieben.

4. Messungen der zellinternen Glukosekonzentration in *Zymomonas mobilis* in kontinuierlicher Kultur als Funktion der Ethanolkonzentration ergaben, daß bei abnehmenden spezifischen Ethanolbildungsraten die zellinterne Glukosekonzentration zunahm. Damit wurde erstmalig gezeigt, daß die Inhibierung der Ethanolbildung durch Ethanol nicht auf die Inhibierung des Glukosetransportes, sondern auf die Inhibierung des zellinternen Stoffwechsels zurückzuführen ist.

5. Untersuchungen zum Mechanismus der Wachstumsinhibierung durch Ethanol ergaben, daß nach schrittweiser Erhöhung der Ethanolkonzentration von 50 g/l auf 80 bis 100 g/l die Wachstumsrate nur langsam gegen Null ging. Die Biomassezunahme war bei diesen Ethanolkonzentrationen hauptsächlich auf Proteinbiosynthese zurückzuführen. Die Zellteilung sowie die DNA- und Fettsäuresynthese wurden nach der Ethanolzugabe sofort und vollständig inhibiert. Es konnte gezeigt werden, daß diese Inhibierungen nicht durch eine erhöhte Permeabilität oder durch Energiemangel bedingt waren. Somit sind Inhibierungen im Anabolismus die primäre Ursache für die vollständige Inhibierung des Wachstums durch hohe Ethanolkonzentrationen.

6. *Zymomonas mobilis* weist mit 30 mg Hopanoide pro g Trockengewicht einen sehr hohen Hopanoidgehalt auf. Dabei machen die Ether- und Glykosidderivate des Tetrahydroxybakteriohopans (THBH) 41 bzw. 49 %, THBH 6%, Diplopterol 3% und Hopen 1% der Gesamthopanoide aus. Innerhalb weiter Bereiche von Ethanolkonzentrationen (5-60 g/l), Wachstumsraten (0.08-0.40 l/h) und Temperaturen (25-37 °C) änderte sich die Hopanoidzusammensetzung nur geringfügig. Die Hopanoide werden konstitutiv gebildet und haben einen Anteil von 43 % an den Gesamtlipiden in *Zymomonas mobilis*. In Monoschichtuntersuchungen wiesen die Hopanoide aus *Zymomonas mobilis* eine fluiditätsmodulierende Wirkung auf und bewirkten eine dichtere laterale Packung der Gesamtlipide. Diese Eigenschaften bedingen die, für die Ethanoltoleranz wichtige, Verringerung der passiven Permeabilität und Stabilisierung der Membran.

VI. Literaturverzeichnis

- Albrecht, O. (1983). The construction of a mikroprocessor-controlled film balance for precision measurement of isotherms and isobars. *Thin Solid Films* 99: 227-234.
- Albrecht, O., H. Gruler, E. Sackmann (1981). Pressure-composition phase diagrams of cholesterol/lecithin, cholesterol/phosphatidic acid and lecithin/phosphatidic acid mixed monolayers: a Langmuir film balance study. *J. Colloid Interface Sci.* 79:319-338.
- Algar, E.M., R.K. Scopes (1985). Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 2: 275-287.
- Amin, G., E. Van den Eynde, H. Verachtert (1983). Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cell systems of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1-5.
- Amin, G., H.W. Doelle (1990). Production of high ethanol concentrations from glucose using *Zymomonas mobilis* entrapped in a vertical rotating immobilized cell reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 443-446.
- An, H., R.K. Scopes, M. Rodriguez, K.F. Keshav, L.O. Ingram (1991). Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: Identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. *J. Bact.* 173: 5975-5982.
- Anderson, R.L., K.W. Minton, G.C. Li, G.M. Hahn (1981). Temperature-induced homeoviscous adaptation of chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* 641: 334-348.
- Antunes-Madeira, M.C., V.M.C. Madeira (1983). Partition of parathion in synthetic and native membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 778: 49-56.
- Baratti, J., J.D. Bu'lock (1986). *Zymomonas mobilis*: a Bacterium for Ethanol production. *Biotechnol. Adv.* 4: 95-115.
- Barnell, W.O., K.C. Yi, T. Conway (1990). Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J. Bact.* 172: 7227-7240.
- Barrow, K.D., J.G. Collins, P.L. Rogers, G.M. Smith (1983). Lipid composition of an ethanol tolerant strain of *Zymomonas mobilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 753: 324-330.
- Bartlett, G.R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 395-399.

- Beavan, M. B., Zawadzki, R., Droniuk, H., Lawford, J., Fein. (1989). Comparative performance trials with yeast and *Zymomonas* for fuel alcohol production from Corn. Appl. Biochem. Biotechnol. 20/21: 319-326.
- Beavan, M.J., C. Charpentier, A.H. Rose (1982). Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. J. Gen. Microbiol. 128: 1447-1455.
- Belaich, J.P., J.C. Senez, M. Murgier (1968). Microcalorimetric study of glucose permeation in microbial cells. J. Bact. 95: 1750-1757.
- Benz, R., D. Hallmann, K. Poralla, H. Eibl (1983). Interaction of hopanoids with phosphatidylcholines containing oleic and Ω -cyclohexyldodecanoic acid in lipid bilayer membranes. Chem. Phys. Lipids 34: 7-24.
- Bergmeyer, H.U., E. Berndt, F. Schmidt, H. Stork (1974). Glukosetest. 1241-1246. In: Methoden der enzymatischen Analyse. Ed. Bergmeyer. VCH Weinheim.
- Bernheim, F. (1978). The effect of aliphatic alcohols on efflux of H^+ and K^+ from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios Lett. 9: 91-95.
- Beyeler, W., P.L. Rogers, A. Fiechter (1984). A simple technique for the direct determination of maintenance energy coefficient: An example with *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 277-280.
- Bisseret, P., G. Wolff, A.-M. Albrecht, T. Tanaka, Y. Nakatani, G. Ourisson (1983). A direct study of the cohesion of lecithin bilayers: the effect of hopanoids and α, Ω -dihydroxycarotenoids. Biochem. Biophys. Res. Comm. 110: 320-324.
- Bligh, E.G., W.J. Dyer (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Physiol. 37: 911-917.
- Boggs, J.M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. Biochim. Biophys. Acta 906: 353-404.
- Booij, H.L., W. Dijkshoorn (1950). Studies on hemolysis II: The influence of alcohols on monomolecular films of stearic acid compared with that on hemolysis. Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 1: 631-637.
- Booth, I.R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in Bacteria. Microbiol. Rev. 49: 359-378.
- Boyer, P.D. (1987). The unusual enzymology of ATP synthase. Biochem. 26: 8503-8507.
- Bringer, S., R.K. Finn, H. Sahm (1984). Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 139: 376-381.

- Bringer, S., T. Härtner, K. Poralla, H. Sahm (1985). Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 140: 312-316.
- Bringer-Meyer, S., H. Sahm (1989). Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 529-536.
- Brown, A.D. (1976). Microbial water stress. Bacteriol. Rev. 40: 803-846.
- Bruce, L.J., D.B. Axford, B. Ciszek, A.J. Daugulis (1991). Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behaviour. Biotechnol. Lett. 13: 291-296.
- Buchholz, S.E., M.M. Dooley, D.E. Eveleigh (1987). *Zymomonas*- an alcoholic enigma. TIBTECH 5: 199-204.
- Burton, K. (1956) Biochem. J. 62: 315-322.
- Calibo, R.L., M. Matsumura, H. Kataoka (1989). Continuous ethanol fermentation of concentrated sugar solutions coupled with membrane distillation using a PTFE module. J. Ferment. Bioeng. 67: 40-45.
- Carey, V.C., L.O. Ingram (1983). Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of Ethanol and Glucose. J. Bact. 154: 1291-1300.
- Cartwright, C.P., F.J. Veazey, A.H. Rose (1987). Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 133: 857-865.
- Cartwright, C.P., J.R. Juroszek, M.J. Beavan, F.M.S. Ruby, S.M.F. De Moraes, A.H. Rose (1986). Ethanol dissipates the proton motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 132: 369-377.
- Castillo, F.J., M.E. Izaguirre, M. Michelena, B. Moreno (1982). Optimization of fermentation for ethanol production from Whey. Biotechnol. Lett. 4: 567-572.
- Chapman, A.G., D.E. Atkinson (1977). Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. Adv. Microbial Phys. 15: 253-306.
- Charley, R.C., J.E. Fein, B.H. Lavers, H.G. Lawford, G.R. Lawford. (1983). Optimization of process design for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Biotechnol. Lett. 5: 169-174.
- Chattaway, T., G. Goma, P.Y. Renaud (1988). Modelling ethanol and secondary inhibitions of ethanol fermentation in a multistage Reactor. Biotechnol. Bioeng. 32: 271-276.

- Chen, C., M.C. Dale, M.R. Okos (1990a). The long-term effects of ethanol on immobilized cell reactor performance using *K. fragilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 975-982.
- Chen, C., M.C. Dale, M.R. Okos (1990b). Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modelling and design of immobilized cell reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 983-992.
- Chen, C.-H., S.G. Engel (1990). The susceptibility of membrane vesicles to interaction with ethanol. *Chem. Phys. Lipids* 52: 179-187.
- Cheng, Y.-S.E. (1983). Increased cell buoyant densities of protein overproducing *Escherichia coli* cells. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 111: 194-111.
- Chin, J.H., D.B. Goldstein (1977). Drug tolerance in biomembranes: a spin label study of the effects of ethanol. *Science* 196: 684-685.
- Chu, C.J., C.J. Chion, A.K. Ng, T.C. Lin, E.C. Hwang, C.H. Rao (1970). Multistage continuous alcohol fermentation. *Chung Kuo Ning Yeh Hua Hsueh Hui Chih.* 8: 84. (Chem. Abstr. 75:3981, 1971).
- Clark, D.P., J.P. Beard (1979). Altered phospholipid composition in mutants of *Escherichia coli* sensitive of resistant to organic solvents. *J. Gen. Microbiol.* 113: 267-274.
- Davison, B.H., C.D. Scott (1988). Operability and feasibility of ethanol production by immobilized *Zymomonas mobilis* in a fluidized-Bed Bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 17: 19-34.
- De Young, R.L., K.A. Dill (1988). Solute partitioning into lipid bilayer membranes. *Biochem.* 27: 5281-5289.
- Demel, R.A., B. De Kruffyff (1976). The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457: 109-132.
- Dhathathreyan, A., D. Möbius (1988). A study of dibacaine binding to lipid monolayers. *Coll. Surf.* 33: 43-53.
- Dimarco, A.A., A.H. Romano (1985). D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 151-157.
- Doelle, H.W. (1982). Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glukokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 241-246.
- Dombek, K.M., L.O. Ingram (1987). Ethanol produktion during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in Glycolytic Enzymes and internal pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1286-1291.
- Dombek, K.M., L.O. Ingram (1988). Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in rate of ethanol produktion by *Saccharomyces cerevisiae* during batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 98-104.

- Eggstein, M., E. Kuhlmann (1974). Triglyceride und Glycerin. In: Methoden der enzymatischen Analyse Bd 2, 1871-1877. Ed. Bergmeyer. VCH Weinheim.
- Enequist, H.G., T.R. Hirst, S. Harayama, S.J.S. Hardy, L.L. Randall (1981). Energy is required for maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 116: 227-233.
- Fein, J.E., D.L. Barber, R.C. Charley, T.J. Beveridge, H.G. Lawford (1980). Effect of commercial feedstocks on growth and morphology of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 6: 123-128.
- Fein, J.E., R.C. Charley, K.A. Hopkins, B. Lavers, H.G. Lawford (1983). Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotech. Lett. 5: 1-6.
- Fieschko, J., A.E. Humpfrey (1983). Effect of temperature and ethanol concentration on the maintenance and yield coefficient of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 25: 1655-1660.
- Finn, R.K., S. Bringer, H. Sahm (1984). Fermentation of arabinose to ethanol by *Sarcina ventriculi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 161-166.
- Flesch, G. (1987). Biosynthèses des bactériohopanepolyols, triterpénoides bactériens. Inhibiteurs de la squalène-cyclase de procaryotes. Thèse, l'Université de Haute-Alsace, Mulhouse.
- Flesch, G., M. Rohmer (1989). Prokaryotic triterpenoids: a novel hopanoid from the ethanol producing bacterium *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 262: 673-675.
- Fried, V.A., A. Novick (1973). Organic solvents as Probes for the structure and function of the bacterial Membrane: Effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. J. Bact. 114: 239-248.
- Friedman, M.H. (1986). Principles and Models of biological transport. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Fuhrmann, G.F., B. Völker, S. Sander, M. Potthast (1989). Kinetic analysis and simulation of glucose transport in plasma membrane vesicles of glucose-repressed and depressed *Saccharomyces cerevisiae* cells. Experientia 45: 1018-1023.
- Gaines, G.L. (1966) Insoluble monolayers at gas-liquid interface. Wiley Interscience, New York.
- Germain, P., F. Toukourou, L. Donaduzzi (1986). Ethanol production by anaerobic thermophilic bacteria: regulation of lactate dehydrogenase activity in *Clostridium thermocellum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 300-305.

- Ghommidh, C., J. Vaija, S. Bolarinwa, J.M. Navarro (1989). Oscillatory behaviour of *Zymomonas* in continuous cultures: a simple stochastic model. *Biotechnol. Lett.* 11: 659-664.
- Ghose, T.K., R.D. Tyagi (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 1401-1420.
- Gibbs, M., R.D. De Moss (1951). Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. *Arch. Biochem. Biophys.* 34: 478-479.
- Gibbs, M., R.D. De Moss (1954). Anaerobic dissimilation of ^{14}C -labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. *J. Biol. Chem.* 207:689-694.
- Godia, F., C. Casas, C. Sola (1987). A survey of continuous ethanol fermentation systems using immobilized cells. *Process Biochem.* April: 43-48.
- Goffau, A., J.P. Dufour (1988). Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enz.* 157: 528-534.
- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial metabolism*. Springer Verlag, New York, 210-280.
- Hauser, H., I. Pascher, R.H. Pearson, S. Sundell (1981). Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 650: 21-51.
- Hayashi, M., T. Muramatsu, I. Hara (1972). Surface properties of synthetic phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 255: 98-106.
- Hayashida, S., K. Ohta (1978). Cell structure of yeasts grown anaerobically in *Aspergillus oryzae*-proteolipid-supplemented media. *Agric. Biol. Chem.* 42:1139-1145.
- Herbert, D., P.J. Phipps, R. E. Strange (1971). Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods in Microbiology* 2. Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons, Academic Press, New York.
- Hermans, M.A.F., B. Neuss, H. Sahn (1991). Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. *J. Bact.* 173: 5592-5595.
- Herrero, A.A. (1983). End-product inhibition in anaerobic fermentations. *TIBTECH* 1: 49-53.
- Hiemenz, P.C. (1977). *Principles of colloid and surface chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Hitzemann, R.J., H.E. Schueler, C. Graham-Brittain, G.P. Kreishman (1986). Ethanol induced changes in neuronal membrane order. An NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 859: 189-197.
- Hoek, J.B., T.F. Tarashi (1988). Cellular adaptation to ethanol. *TIBS* 13: 269-274.

- Horbach, S., B. Neuss, H. Sahm (1991). Effect of azasqualene on hopanoid biosynthesis and ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 79: 347-350.
- Houssin, C., N. Eynard, E. Shechter, A. Ghazi (1991). Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions. Biochim. Biophys. Acta 1056: 76-84.
- Hunter, K., A.H. Rose (1972). Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. Biochim. Biophys. Acta 260: 639-653.
- Hutkins, R.W., E.R. Kashket (1986). Phosphotransferase activity in *Clostridium acetobutylicum* from acidogenic and solvotogenic phases of growth. Appl. Environ. Microb. 51: 1121-1123.
- Ingram, L.O. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. J. Bacteriol. 125: 670-678.
- Ingram, L.O. (1977). Preferential inhibition of phosphatidyl ethanolamine synthesis in *E. coli* by alcohols. Can. J. Microbiol. 23: 779-789.
- Ingram, L.O. (1986). Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. TIBTECH febr. 40-44.
- Ingram, L.O., B.F. Dickens, T.M. Buttke (1980 a). Reversible effects of ethanol on *E. coli*. Adv. Exp. Med. Biol. 126: 299-337.
- Ingram, L.O., N.S. Vreeland, L.C. Eaton (1980 b). Alcohol tolerance in *E. coli*. Pharmacol. Biochem. Behav. 13: 191-195.
- Ingram, L.O., T.M. Buttke (1984). Effects of alcohols on microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol. 25: 253-300.
- Jones, C.W., H.W. Doelle (1991). Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microb. Biotechnol. 35: 4-9.
- Jones, R.P., P.F. Greenfield (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Enzyme Microb. Technol. 4: 210-223.
- Jones, R.P., P.F. Greenfield (1986). Role of water activity in ethanol fermentations. Biotechnol. Bioeng. 28: 29-40.
- Jones, R.P., P.F. Greenfield (1987). Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. Yeast 3: 223-232.
- Jöbses, I.M.L., G.T.C. Egberts, A. van Baalen, J.A. Roels (1985). Mathematical modelling of growth and substrate conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35 °C. Biotechnol. Bioeng. 27: 984-995.
- Jöbses, I.M.L., G.T.C. Egberts, K.C.A.M. Luyben, J.A. Roels (1986). Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: oscillations in continuous cultures. Biotechnol. Bioeng. 28: 868-877.

- Jöbses, I.M.L., H.C.H. Hiemstra, J.A. Roels (1987). Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* near zero growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 502-512.
- Jöbses, I.M.L., J.A. Roels (1986). The inhibition of the maximum specific growth and fermentation rate of *Zymomonas mobilis* by ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 554-563.
- Kalnenieks, U.Z., J.B. Saulitis, N.I. Galinina, E.E. Liepins, J.E. Shvinka (1988). Proton motive force in *Brevibacterium flavum*: the lack of intracellular pH homeostasis. *Arch. Microbiol.* 151: 213-219.
- Kannenbergh, E. (1983). Membraneeigenschaften von Hopanoiden und Lipiden, die Fettsäuren mit endständigen Verzweigungen und Ω -Cyclohexanringen enthalten. Dissertation, Universität Tübingen.
- Kannenbergh, E., A. Blume, K. Geckeler, K. Poralla (1985). Properties of hopanoids and phosphatidylcholines containing Ω -cyclohexane fatty acid in monolayer and liposome experiments. *Biochim. Biophys. Acta* 814: 179-185.
- Kannenbergh, E., K. Poralla, A. Blume (1980). A Hopanoid from the thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* condenses membranes. *Naturwissenschaften* 67: 458-459.
- Karl, D.M. (1980). Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44: 739-796.
- Kates, M. (1982). Isolation, analysis and identification of lipids. In: *Techniques in Lipidology*. Ed. E. Work. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Kida, K. S. Asano, M. Yamadaki, K. Iwasaki, T. Yamaguchi, Y. Sonoda (1990). Continuous high-ethanol fermentation from cane molasses by a flocculating yeast. *J. Ferment. Bioeng.* 69: 39-45.
- Klingenberg, M., E. Pfaff (1967). Means of terminating reactions. *Method. Enzymol.* 10: 680-684.
- Kluyver, A.J., W.J. Hoppenbrouwers (1931). Ein merkwürdiges Gärungsbakterium: Lindner's *Thermobacterium mobile*. *Arch. Microbiol.* 2: 245-260.
- Korten, K., T.J. Sommer, K.W. Miller (1980). Membrane composition modulates thiopental partitioning in bilayers and biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* 599: 271-279.
- Kreishman, G.P., C. Graham-Brittann, R.J. Hitzemann (1985). Determination of ethanol partition coefficients to the interior and the surface of dipalmityl-phosphatidylcholine liposomes using deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130: 301-305.
- Kubitschek, H.E., W.W. Baldwin, R. Graetzer (1983). Buoyant density constancy during the cell cycle of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 155: 1027-1032.

- Lawford, H., P. Holloway, A. Ruggiero (1988). Effect of pH on growth and ethanol production by *Zymomonas*. Biotechnol. Lett. 10: 809-814.
- Lawford, H.G. (1988). A new approach to improving the performance of *Zymomonas mobilis* in continuous ethanol fermentations. Appl. Biochem. Biotechnol. 17: 203-221.
- Lawford, R., R. Charley, R. Edamura, J. Fein, K. Hopkins, D. Potts, B. Zawadzki, H. Lawford (1984). Biomass to ethanol by the bio-hol process. Proceedings of the 5th. Canadian Bioenergy R & D Seminar. Eds.: Hasnam, Sadiq. Elsevier, Amsterdam.
- Lazdunski, A., J.P. Belaich (1972). Uncoupling in bacterial growth: ATP pool variation in *Zymomonas mobilis* cells in relation to different uncoupling conditions of growth. J. Gen. Microbiol. 70: 187-197.
- Leao, C., N. van Uden (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 24: 2601-2604.
- Leao, C., N. van Uden (1984). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 774: 43-48.
- Lee, J.M., J.F. Pollard, G.A. Coulman (1983). Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnol. Bioeng. 25: 497-511.
- Lee, K.J., D.E. Tribe, P.L. Rogers (1979). Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. Biotechnol. Lett. 1: 421-426.
- Lee, K.J., M.L. Skotnicki, D.E. Tribe, P.L. Rogers (1981). The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 3: 291-296.
- Lee, K.J., P.L. Rogers (1983). The fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Chem. Eng. J. 27: B31-B38.
- Lin, J.J., M.C. Dale, M.R. Okos (1991). Osmotic (a_w) effects on growth and ethanol production of free and immobilized *Zymomonas mobilis*. Process Biochem. 26: 143-151.
- Ljungdahl, L.G., J. Wiegel (1986). Working with anaerobic Bacteria. 84-96. In: Manual of Industrial microbiol. and Biotechnol. Ed. Demain, Solomon. ASM, Washington.
- Lynd, L.R., J.H. Cushman, R.J. Nichols, C.E. Wyman (1991). Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science 251: 1318-1323.
- Maiorella, B.L. (1985). Ethanol. In: Comprehensive Biotechnology vol. 3, The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products. Eds. M. Moo-Young, H.W. Blanch, S. Drew, D.I.C. Wang. Pergamon Press Oxford.

- Markwell, M.A.K., S.M. Haas, L.L. Bieber, N.E. Tolbert (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in the membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- Michaelis, E.K., M.L. Michaelis (1983). Physico-chemical interactions between alcohol and biological membranes. In: *Research Advances in alcohol and drug problems*. 7: 127-173. Eds. R.G. Smarts, F.B. Glaser, H. Kalant, R.E. Popham, W. Schmidt. Plenum Press, New York.
- Michel, G.P.F., J. Starka (1986). Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bact.* 165: 1040-1042.
- Millar, D.G., K. Griffiths-Smith, E. Algar, R.K. Scopes (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.* 4: 601-606.
- Millar, I.R., E. Yavin (1988). The effect of interactions in the head groups on monolayer structure and permeability. *Bioelec. Bioenerg.* 19: 557-567.
- Mishra, P., S. Kaur (1991). Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 697-702.
- Montenecourt, B.S. (1985). *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. In *Biology of industrial microorganisms*. 261-289. Eds. A.L. Demain, N.A. Solomon. Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park Calif.
- Moser, A. (1985). Continuous cultivation. In: *Biotechnol.* 2 : 286-309. Eds. H.J. Rehm, G. Reed. VCH Weinheim.
- Nagumo, A., K. Takanashi, Y. Suzuki (1991). Effect of inserted Bacteriohopane-32-ol on the stability of liposomal Membranes. *Chem. Pharm. Bull.* 39: 1889-1891.
- Namba, A., Y. Nishizawa, Y. Tsuchiya, S. Nagai (1987). Kinetic analysis for Batch Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 65: 277-283.
- Noll, F. (1974). Bestimmung mit LDH, GPT und AD. In: *Methoden der enzymatischen Analyse Bd 2*, 1521-1525. Ed. Bergmeyer. VCH Weinheim.
- Ohki, K., K. Tamura, I. Hatta (1990). Ethanol induces interdigitated gel phase (L_{β_i}) between lamellar gel phase (L_{β}) and ripple phase (P_{β}) in phosphatidylcholine membranes: a scanning density meter study. *Biochim. Biophys. acta* 1028: 215-222.
- Osman, Y.A., L.O. Ingram (1985). Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J. Bact.* 164: 173-180.

- Osman, Y.A., T. Conway, S.J. Bonetti, L.O. Ingram (1987). Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: enzyme and metabolite levels during batch fermentation. J. Bact. 169: 3726-3736.
- Pankova, L.M., J.E. Shvinka, M.J. Beker (1988). Regulation of intracellular H^+ balance in *Zymomonas mobilis* 113 during the shift from anaerobic to aerobic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 583-588.
- Park, S.C., J. Baratti (1991). Batch fermentation kinetics of sugar beet molasses by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 38: 304-313.
- Pascual, C., A. Alonso, I. Garcia, C. Romay (1988). Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 32: 374-378.
- Pawluk, A., R.K. Scopes, K. Griffiths-Smith (1986). Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 238: 275-281.
- Pethica, B.A., J. Mingins, J.A.G. Tayler (1976). Phospholipid interactions in monolayers. J. Coll. Interface Sci. 55:1-8.
- Phaff, H.J. (1984). Industriell nutzbare Mikroorganismen. In: Industrielle Mikrobiologie. 22-36. Eds. P. Gruss, R. Herrmann, A. Klein. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg.
- Piepenbrock, A., J. Perl (1988). Nutzung landwirtschaftlicher Rohstoffe zur Alkoholvergewinnung. BINE Projekt Info-Service Nr.18. Hrsgb: Fachinformationszentrum Energie, Physik, Mathematik GmbH, Karlsruhe.
- Poralla, K. (1982). Hopanoide - Steroidequivalente in Membranen von Bakterien und ein möglicher Seitenzweig bei der Evolution der Steroidbiosynthese. Forum Mikrobiologie 5: 176-179.
- Poralla, K., T. Härtner, E. Kannenberg (1984). Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. FEMS Microbiol. Lett. 23: 253-256.
- Posten, C. (1987). Modellierung und Anlagenoptimierung der Ethanolfermentation mit *Zymomonas mobilis*. Fortschrittberichte VDI Reihe 17: Biotechnik Nr.38. VDI-Verlag Düsseldorf.
- Quesnel, L.E. (1971). Microscopy and Mikrometry. In: Methods in microbiology. 5A: 73. Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons. Academic Press, New York.
- Rabin, A., D.C. Bode, P.B.C. Molinoff (1986). Relationship between ethanol-induced alterations in fluorescence anisotropy and adenylate-cyclase activity. Biochem. Pharmacol. 35: 2332-2335.

- Rauh, J. (1987). Eine spektroskopische Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf Membranen. Diplomarbeit Technischen Hochschule Darmstadt.
- Rogers, P.L., A.E. Goodman, R.H. Heyes (1984). *Zymomonas ethanol fermentations*. Microbiol. Sci. 1: 133-136.
- Rogers, P.L., K.J. Lee, M.L. Skotnicki, D.E. Tribe (1980). Ethanolproduction by *Zymomonas mobilis*. 359-369. In: Proc. 2nd International symposium on bioconversion and biochemical engineering. Ed. T.K. Ghose. Indian Inst. Technol., Delhi.
- Rogers, P.L., K.J. Lee, M.L. Skotnicki, D.E. Tribe (1982). Ethanol produktion by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Eng. 23: 37-84.
- Rohmer, M., P. Bouvier, G. Ourisson (1979). Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 847-851.
- Rohmer, M., P. Bouvier-Nave, G. Ourisson (1984). Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. J. Gen. Microbiol. 130: 1137-1150.
- Rohmer, P. Bouvier-Nave, G. Ourisson (1984). Distribution of hopanoid triterpenes in procaryotes. J. Gen. Microbiol. 130: 1137-1150.
- Rosa, M.F., I. Sá-Correia (1991). In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 57:830-835.
- Rosa, M.F., I. Sá-Correia (1992). Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. 14: 23-27.
- Rottenberg, H. (1979). The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles and vesicles. Meth. Enzymol. 55: 547-569.
- Rowe, E.S. (1983). Lipid chain length and temperature dependence of ethanol-phosphatidylcholine interactions. Biochem. 22: 3299-3305.
- Ruhrmann, J., R. Krämer (1992). Quantification of energetic parameters in *Zymomonas mobilis* exemplified by secondary uptake of glutamate. In Press.
- Ryes, L., R.K. Scopes (1991). Membrane associated ATPase from *Zymomonas mobilis*; purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta 1068: 174-178.
- Ryu, Y.W., M. Navarro, G. Durand (1982). Comparative study of ethanol production by an immobilized yeast in a tubular reactor and in a multistage reactor. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 1-8.

- Sahm, H., S. Bringer-Meyer (1987). Ethanol-Herstellung mit Bakterien. Chem Ing. Tech. 59: 685-694.
- Schimz, K.-L., B. Rütten, M. Tretter (1981). Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyzer. Adv. in Biotechnol. 1: 457-461.
- Schmid, U. (1987). Xylosevergärung mit dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobacter finii*. Dissertation Universität Düsseldorf.
- Schmid, W. (1985). Untersuchungen zur on-line Prozessanalyse bei der satzweisen und kontinuierlichen Ethanolproduktion mit *Zymomonas mobilis*. Dissertation Universität Hannover.
- Schmidt, A. (1988). Einfluß von Ethanol auf die Hopanoidbildung in *Zymomonas mobilis*. Dissertation Universität Bonn.
- Schmidt, A., S. Bringer-Meyer, K. Poralla, H. Sahm (1986). Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microb. Biotechnol. 25: 32-36.
- Schulenberg-Schell, H., B. Neuss, H. Sahm (1989). Quantitative determination of various hopanoids in mikroorganisms. Anal. Biochem. 181: 120-124.
- Schügerl, K. (1991). Bioreaktionstechnik, Reaktionstechnik mit Mikroorganismen und Zellen. Band 1: Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozeßführung. In: Grundlagen der chemischen Technik. Verfahrenstechnik der chemischen und verwandten Industrie. Hrsgb. K.Dialer, J.Pawlowski, W. Springer. Salle und Sauerlander, Frankfurt.
- Scopes, R.K., K Griffiths-Smith (1986). Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glycolytic enzymes. Biotechnol. Lett. 8: 653-656.
- Scopes, R.K., V. Testolin, A. Stoter, K. Griffiths-Smith, E.M. Algar (1985). Simultaneous purification and characterization of glukokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 228: 627-634.
- Skotnicki, M.L., J. Lee, D.E. Tribe, P.L. Rogers (1982). Genetic alteration of *Zymomonas mobilis* for Ethanol production. In: Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Basic Life Sciences 19: 271-290. Eds. A. Hollaender, R.D. De Moss, S. Kaplan. Plenum Press, New York.
- Spielman, H., U. Jakob-Müller, P. Schulz (1981). Simple assay of 0.1-1.0 pmol ATP, ADP and AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase. Anal. Biochem. 113: 172-178.
- Sreekumar, O., S.C. Basappa (1991). Characterization of a superior thermotolerant mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 for ethanol production in glucose medium. Biotechnol. Lett. 13: 365-370.

Steinke (1987). MEAS MeßwertErfassungs und Auswertungs Software. Ingenieurbureau Steinke, Düren.

Stevnsborg, N., H.G. Lawford (1986). Performance assessment of two patent strains of *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 106-115.

Stevnsborg, N., H.G. Lawford, N. Martin, T. Beveridge (1986). Effect of growth temperature on the morphology and performance of *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in batch and continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 116-123.

Strohdeicher, M., B. Schmitz, S. Bringer-Meyer, H. Sahm (1988). Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 378-382.

Struch, T., B. Neuss, S. Bringer-Meyer, H. Sahm (1991). Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 518-523.

Sutter, B. (1991). Biosynthese Isoprenique chez les procaryotes: un modele innovateur *Zymomonas mobilis*. Dissertation L'Universite de Haute-Alsace.

Swings, J., J. De Ley (1977). The Biology of *Zymomonas*. Bact. Rev. 41: 1-46.

Tahara, Y., H. Yuhara, Y. Yamada (1988). Distribution of Tetrahydroxybacteriohopane in the membrane fractions of *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. 52: 607-609.

Tahara, Y., H. Yuhara, Y. Ogawa, Y. Yamada (1986). Tetrahydroxypentane-substituted pentacyclic triterpene isolated from *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. 50: 1345-1346.

Tanigawa, T., M. Umezu (1979). Studies on the cell wall of Hiochi bacteria with special reference to the change of its thickness due to growth conditions. J. Gen. Appl. Microbiol. 25: 31-40.

Thauer, R.K., K. Jungermann, K. Decker (1977). Energy conversion in chemotrophic anaerobic bacteria: Bact. Rev. 41: 100-180.

Toda, K., T. Asakura, H. Ohtake (1987). Inhibitory effect of ethanol on ethanol fermentation. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 421-428.

Tornabene, T.G., G. Holzer, A.S. Bittner, K. Grohmann (1982). Characterization of the total extractable lipids of *Zymomonas mobilis* var. *mobilis*. Can. J. Microbiol. 28: 1107-1118.

Torres, E.F., J. Baratti (1987). The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 121-128.

- Uchida, K. (1974). Occurrence of saturated and monounsaturated fatty acids with unusually-long-chains (C20-C30) in *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholphilic bacterium. Biochim. biophys. Acta 348: 86-93.
- Ullrich, J. (1970). Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacidcarboxylase, EC 4.1.1.1). Assay of thiamine pyrophosphate. Meth. Enzymol. 18: 109-115.
- Van Baalen, T. (1991). Influence of the water Activity on *Zymomonas mobilis*. Dissertation Technische Universität Delft.
- Van Deenen, L.L.M., U.M.Z. Houtsmüller, H.G. de Haas, E. Mulder (1962). Monomolecular layers of phosphatides. J. Pharma. Pharmacol. 14: 429-444.
- Veeramallu, U., P. Agrawal (1990). A structured kinetic Model for *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. Biotechnol. Bioeng. 36: 694-704.
- Verduyn, C., E. Postma, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken (1990). Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 136: 395-403.
- Vikarii, L. (1988). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. CRC Critical Reviews in Biotechnology 7: 237-261.
- Watanabe, T., T. Aoki, H. Honda, M. Taya, T. Kobayashi (1990). Production of ethanol in repeated-batch fermentation with membrane-type bioreactor. J. Ferment. Bioeng. 69: 33-38.
- Weuster, D. (1991). Ethanolproduktion mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor. Dissertation Universität Karlsruhe.
- Wieland, O., I. Witt (1974). Dihydroxyaceton. In: Methoden der enzymatischen Analyse Bd 2, 1487-1490. Ed. Bergmeyer. VCH Weinheim.
- Woldringh, C.L., J.S. Binnerts, A. Mans (1981). Variation in *E. coli* buoyant density measured in Perkoll gradients. J. Bact. 148: 58-63.

VII. Anhang

1. Berechnung der mittlere spezifische Ethanolbildungsaktivität der zweiten Stufe

Bei entsprechend hohen Ethanolkonzentrationen nimmt die spezifische Ethanolbildungsrate von *Zymomonas mobilis* mit zunehmender Inkubationszeit ab. Bei zweistufigen Fermentationen stellt die aus Ethanolbildung und Biomassekonzentration berechnete spezifische Ethanolbildungsrate aufgrund der Altersverteilung der Zellen in der zweiten Stufe einen Mittelwert dar. Zur Berechnung des Mittelwertes aus den gemessenen spezifischen Ethanolbildungsraten als Funktion der Zeit kann der Fermenterinhalt in n Altersfraktionen mit jeweils einem Alter zwischen t_{i-1} und t_i sowie einer Fraktionsgröße $F(t_{i-1}, t_i)$ zerlegt werden. Da einer Altersgruppe die spezifische Ethanolbildungsrate $Q(\alpha)$, mit $t_{i-1} < \alpha < t_i$, zugeordnet werden kann, beträgt die mittlere spezifische Aktivität :

$$\overline{Q_e}(\text{EtOH}, \tau) = \frac{\sum_{i=1}^n \{F(t_{i-1}, t_i) * Q(\alpha)\}}{\sum_{i=1}^n F(t_{i-1}, t_i)} \quad (1)$$

Bei kleiner Intervallgröße kann Gleichung (1) ersetzt werden durch:

$$\overline{Q_e}(\text{EtOH}, \tau) = \frac{\int_{t_0}^{t_n} Q(t) dF(t)}{\int_{t_0}^{t_n} dF(t)} \quad (2)$$

Da die Mischzeit des Reaktors viel kleiner als die Verweilzeit τ ist, kann die Größe einer Altersgruppe $F(t_{i-1}, t_i)$ bzw. $dF(t)$ aus der Verweilzeitverteilungsfunktion für ideal gemischte Reaktoren berechnet werden (Schügerl 1991):

$$dF(t) = (-1/\tau) * \exp(-t/\tau) dt \quad (3)$$

Aufgrund der idealen Mischung ist das minimale Alter gleich Null. Das maximale Alter geht gegen ∞ . $\overline{Q_e}(\text{EtOH}, \tau)$ ist daher:

$$\overline{Q_e}(\text{EtOH}, \tau) = \frac{\int_{t=0}^{t=\infty} (1/\tau) * \exp(-t/\tau) * Q(t) dt}{\int_{t=0}^{t=\infty} (1/\tau) * \exp(-t/\tau) dt} \quad (4)$$

oder

$$\overline{Q_e}(\text{EtOH}, \tau) = \frac{1}{\tau} * \int_{t=0}^{t=\infty} \exp(-t/\tau) * Q(t) dt \quad (5)$$

2. Einfluß von oberflächenaktiven Substanzen in der Subphase auf den Anstieg des Filmdruckes bei Monoschichtuntersuchungen

Die Abb. 23 und 24 zeigten, daß die Erhöhung der Ethanolkonzentration in der Subphase zu einem zunehmend späteren Anstieg des Filmdruckes führt. Booij und Dijkshoorn (1950) beobachteten diesen Effekt ebenfalls bei Monoschichten von Stearinsäure im festanalogen Zustand und deuteten ihn als Kondensierung, beruhend auf der Dehydratisierung der hydrophilen Lipidköpfe durch Ethanol. Demnach wäre der Anfang des Druckanstiegs in den Isothermen auf eine Kopfgruppenwechselwirkung zurückzuführen. Die Phospholipidmischung aus *Zymomonas mobilis* ist aber, bedingt durch den hohen Gehalt an *cis*-Vaccensäure, flüssiganalog. Die Wechselwirkung zwischen den Lipiden wird in diesem Fall deshalb überwiegend durch die Fettsäurereste und nicht durch die Kopfgruppe bestimmt (v. Deenen et al. 1962). Außerdem zeigen die Isothermen in Abb. 23 und 24 bei zunehmender Ethanolkonzentration im ansteigenden Teil eine höhere Kompressibilität sowie eine geringe Expansion der Monoschicht, die beide gegen eine Kondensierung der Monoschicht durch Ethanol sprechen.

Eine mögliche Erklärung für den zunehmend späteren Anstieg des Filmdruckes bezieht die oberflächenaktiven Eigenschaften des Ethanols mit ein: Ethanol setzt die Oberflächenspannung einer wäßrigen Lösung herab. Aus der Gibbs-Gleichung (Hiemenz 1977) folgt daher, daß es in der Phasengrenzschicht einen Ethanolüberschuß relativ zur Subphase gibt. Bezüglich des Verteilungsverhaltens lipidlöslicher Substanzen zwischen wässrigen Medien und Lipiddoppelschichten wurde bereits gezeigt, daß eine zunehmende Packungsdichte der Lipide zur Verdrängung von lipidlöslichen Molekülen aus der Lipidinterphaseschicht und damit zu einer Herabsetzung des Verteilungskoeffizienten führt (De Young und Dill 1988). Die während der Komprimierung von Lipid-Monoschichten zunehmende Strukturierung der Lipide könnte analog dazu zur Verdrängung von freien Ethanolmolekülen aus der Grenzschicht führen.

Unter Anwendung dieser Hypothese kann die Änderung der Isothermen bei zunehmender Ethanolkonzentration folgendermaßen erklärt werden:

Die Abnahme der Oberflächenspannung bzw. Zunahme des Filmdruckes durch Konzentrierung und Komprimierung der Lipide wird am Anfang der Isotherme durch eine Verdrängung von freien Ethanolmolekülen aus der Phasengrenze kompensiert, so daß die Oberflächenspannung und der Filmdruck konstant bleiben. Ab einer gewissen mittleren molekularen Lipidfläche bewirkte die weitere Komprimierung der Lipide eine größere Abnahme der Oberflächenspannung als durch Verdrängung von freien Ethanolmolekülen aus der Grenzschicht kompensiert werden konnte, was zum Anstieg des Filmdruckes führt. Bei zunehmendem Ethanolgehalt ist der Überschuß an Ethanol in der Grenzschicht größer, so daß der Filmdruck bei fortschreitender Komprimierung der Lipide länger durch die Verdrängung von Ethanolmolekülen konstant bleibt. Mit Butanol statt Ethanol in der Subphase ist dieser Effekt besonders ausgeprägt. Butanol ist stärker oberflächenaktiv als Ethanol und reichert sich deshalb bei gleicher Konzentration in der Subphase stärker in der Phasengrenzschicht an, so daß die Kompensation bis kurz

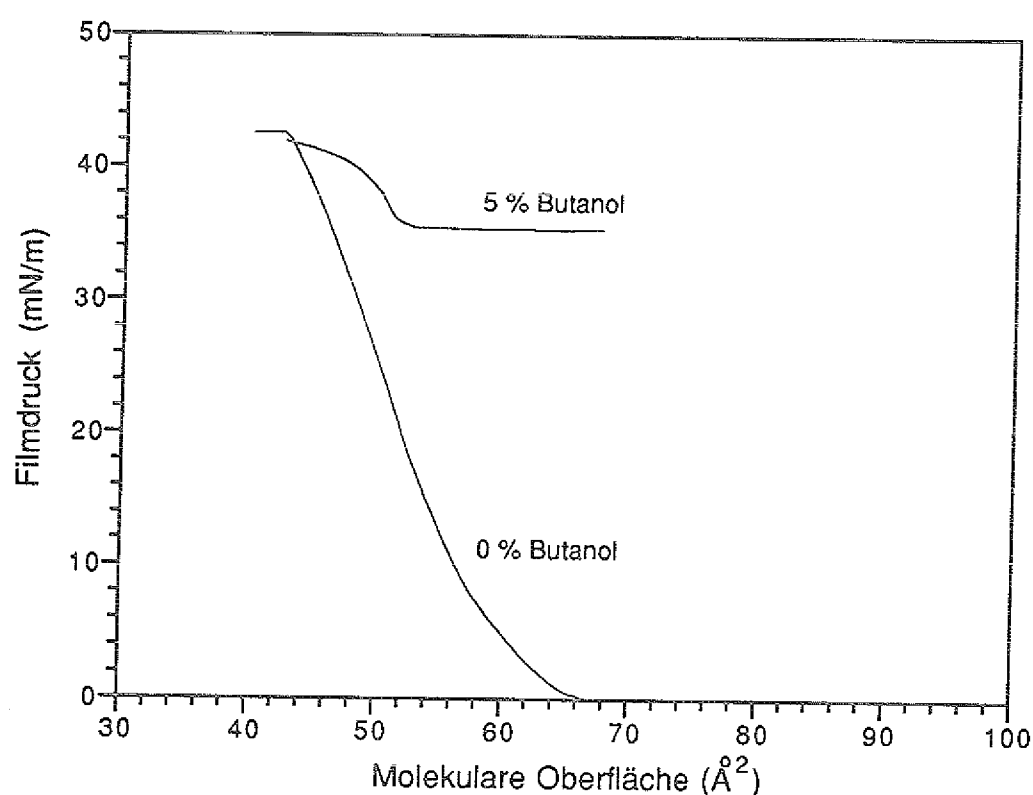


Abb. 26: Isothermen des Lipidextraktes bei 20 °C und 0% oder 5 % (v/v) butanol in der Subphase.

Dargestellt ist der Filmdruck relativ zur Wasseroberfläche als Funktion der molekularen Lipidfläche in der Phasengrenze.

vor den Kollaps der Monoschicht anhält (Abb. 26).

Die Anwesenheit von oberflächenaktiven Substanzen in der Subphase führt also dazu, daß Lipidwechselwirkungen in der Phasengrenze bis zu einem bestimmten Filmdruck von der Verteilung der oberflächenaktiven Substanz zwischen Bulk und Phasengrenze überlagert werden.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich GmbH durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Krämer bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates und für anregende Diskussionen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. B. Neuss und Frau Dr. S. Bringer-Meyer für die Betreuung, ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und viele Ratschläge die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Ringsdorf und seine Arbeitsgruppe danke ich für die Einführung in die Monoschicht Methodik und die Möglichkeit in seinem Institut die Monoschichtuntersuchungen durchzuführen.

Besonders herzlich möchte ich allen Mitarbeitern der *Zymomonas*-Gruppe, Cornelia Gätgens, Silke Horbach, Käthe Striegel, Michael Strohdeicher, Doris Rittman, Theo Struch, Heidi Loos und Ralf Klasen für das gute Arbeitsklima, die kollegiale Zusammenarbeit und die vielfältige Unterstützung bedanken. Bedanken möchte ich mich auch bei den Praktikantinnen Roswitha Przewosnik und Jana Schewe für ihre Mitarbeit.

Letzendlich möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für die freundliche Aufnahme, die stets gewährte Unterstützung und vielseitige Hilfsbereitschaft bedanken.

Jüli-2644

Juli 1992

ISSN 0366-0885