



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

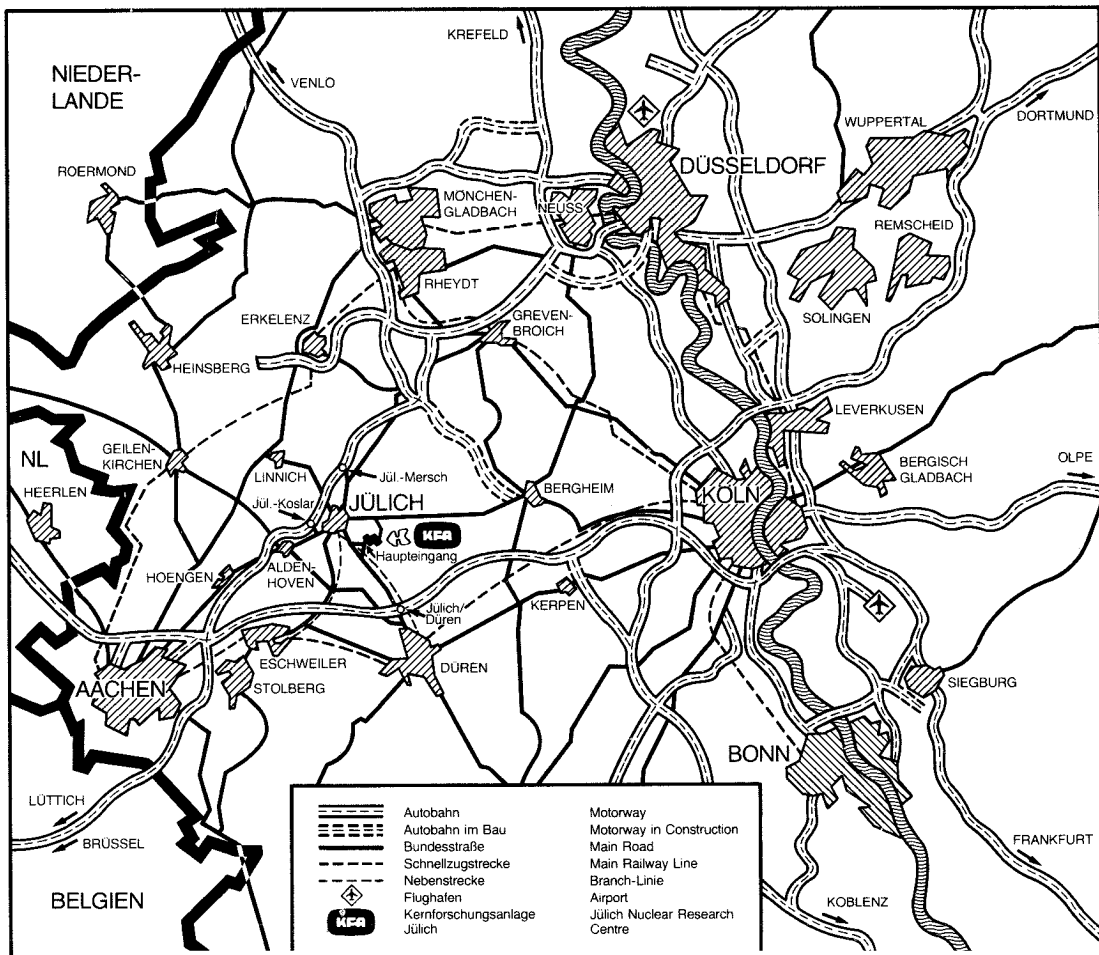
Institut für Biotechnologie

**KONTINUIERLICHE XYLANASEPRODUKTION
MIT BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS**

von

Klaus Memmert

**Jül-2132
Mai 1987
ISSN 0366-0885**



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2132
 Institut für Biotechnologie Jül-2132

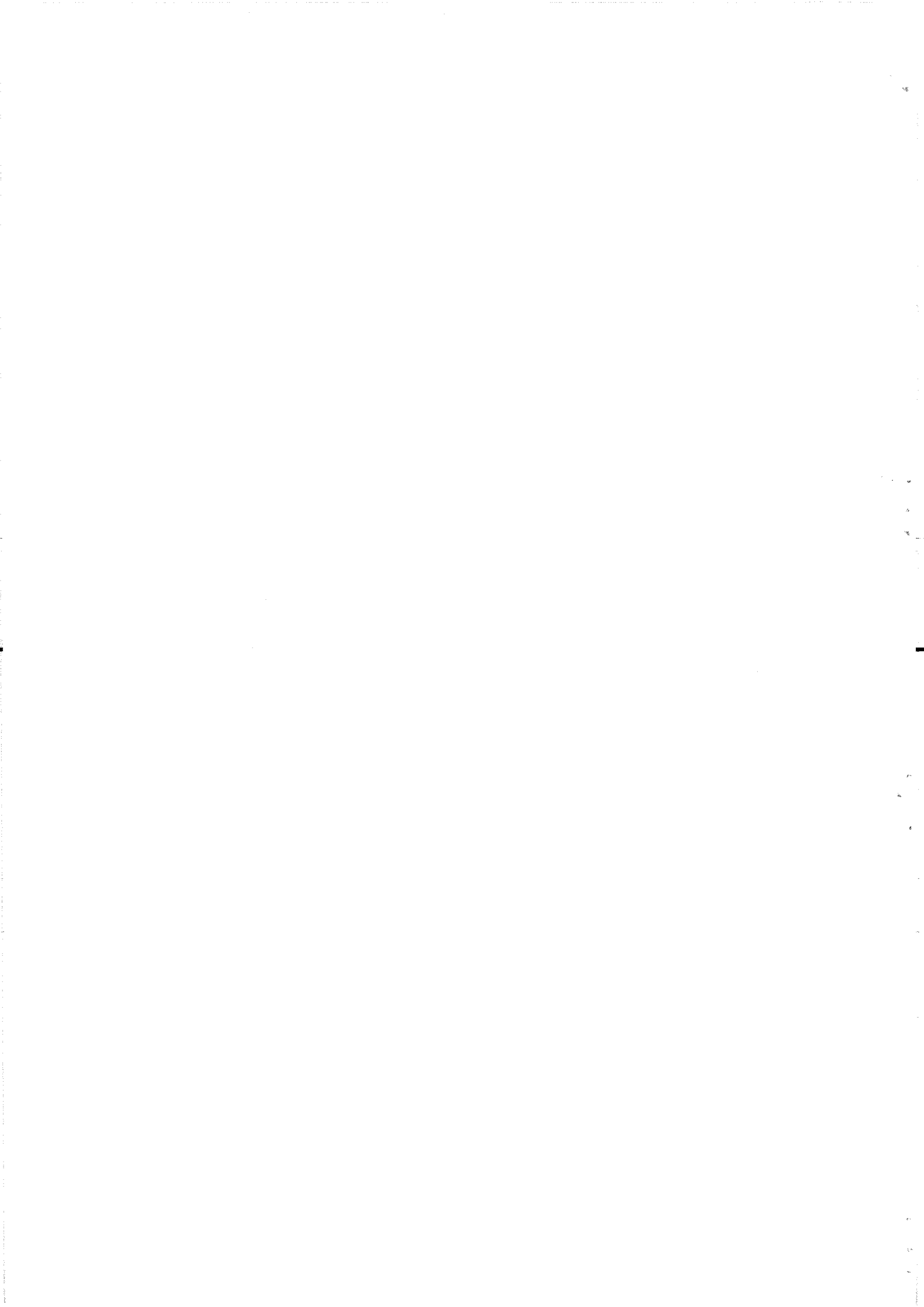
Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

KONTINUIERLICHE XYLANASEPRODUKTION MIT BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS

von

Klaus Memmert

D 83 (Diss. T.U. Berlin)



Abstract

Xylanase Production in Continuous Culture with *Bacillus amyloliquefaciens*

Xylanase synthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 was found to be constitutive but controlled by catabolite repression. This control mechanism caused a declining yield in xylanase production, as soon as the culture reached a steady-state growth in chemostate culture.

It could be shown that the catabolite repression of exoenzyme synthesis could be lifted and xylanase production occurred, when the bacteria were subject to a defined oxygen limitation.

This defined oxygen limitation could be reached by holding the oxygen tension inside narrow limits around 0.5% of saturation. As this range of low oxygen tensions only occurred in transient states but never in steady states of continuous cultivation, it had to be fixed by varying the fermenter's stirrer speed thus changing the oxygen transfer rate by an automatic control. As a redox probe generates more accurate values at this range of very low oxygen tensions than a polarographical oxygen electrode, the culture's redox potential was used as the control signal. Comparative measurements of redox potential and oxygen tension indicated that the redox potential is proportional to the logarithm of the oxygen tension.

Holding the redox potential and oxygen tension by control within this unstable non-steady range, a constant high xylanase productivity of about 1000 U/(g·h) could be obtained in continuous culture.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Liste der Symbole und Abkürzungen.....	III
Liste der Tabellen.....	IV
Liste der Figuren und Abbildungen.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Rolle der Saprophyten und extrazellulärer Enzyme in der Natur.....	1
1.2. Photosynthese und Biomasse als Speicher der Sonnenenergie.....	2
1.3. Produktion hemicellulolytischer Enzyme.....	4
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit.....	5
2. Theorie und Grundlagen.....	6
2.1. Grundlagen der Mikroorganismenzucht.....	6
2.2. Regulation der Enzymsynthese bei Bakterien.....	14
2.3. Bacillus und sein Stoffwechsel.....	20
2.4. Redoxpotential und Sauerstoffpartialdruck.....	23
2.5. Xylan und xylanolytische Enzyme.....	28
3. Apparativer Aufbau.....	32
3.1. Fermenter.....	32
3.2. Kontinuierliche Nährstoffdosierung.....	44
4. Analysen-Methoden.....	49
4.1. Bestimmung der Biomassekonzentration.....	49
4.2. Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	50
4.3. Quantitative Glycerinbestimmung.....	57
4.4. Quantitative Proteinbestimmung.....	59
4.5. Säureanionen-Analyse mittels Isotachophorese.....	60
4.6. Gaschromatographische Bestimmungen.....	62
4.7. Xylanhydrolyse und HPLC-Analytik der Abbauprodukte.....	63
5. Organismen und Kulturbedingungen.....	65
5.1. Organismen.....	65
5.2. Stammhaltung.....	65
5.3. Medienzusammensetzung und Kulturbedingungen.....	66

6. Ergebnisse	70
6.1. Vorversuche.....	70
6.2. Batchfermentation.....	86
6.3. Kontinuierliche Fermentation mit chemostatischer Betriebsweise.....	91
6.4. Kontinuierliche Fermentation mit oszillierenden Kulturen.....	93
6.5. Messung des Redoxpotentials.....	104
6.6. Versuche zur Regelung des Redoxpotentials.....	111
7. Diskussion	129
7.1. Oszillationen der Biomasse.....	129
7.2. Konstitutive Xylanase-Synthese.....	131
7.3. Katabolit-Repression der Xylanase-Synthese.....	131
7.4. Sauerstofflimitierung der Kultur.....	132
7.5. Messung des Redoxpotentials.....	135
7.6. Regelung des Redoxpotentials.....	138
7.7. Rechnersimulation des Regelungskonzepts.....	141
7.8. Vorschläge für weitere Untersuchungen.....	154
8. Zusammenfassung	156
Anhang	158
A. Schrifttum.....	158
B. Liste der verwendeten Chemikalien.....	168
C. Liste der verwendeten Geräte.....	169

LISTE DER SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

Symbole:

a	(m^2/m^3)	Volumenspezifische Phasengrenzfläche
C	(mol)	Konzentration
D	(h^{-1})	Durchflußrate
d_R	(m)	Rührerdurchmesser
E_h	(mV)	Redoxpotential
E_0	(mV)	Standardpotential
E_{ref}	(mV)	Potential der Referenzelektrode gegen die Normalwasserstoffelektrode
F	(ml/h)	Volumenstrom
k_L	(m/h)	Stoffübergangskoeffizient gas/flüssig
K_M	(mol/l)	Michaelis-Menten-Konstante
K_0	(mg/l)	Sauerstoffsättigungs-Konstante für Wachstum
K_q	(mg/l)	Sauerstoffsättigungs-Konstante für Atmung
K_s	(mol/l)	Substratsättigungs-Konstante
m	(h^{-1})	Maintenance-Koeffizient
n	(-)	Anzahl
n	(min^{-1})	Drehzahl
N	($kg \cdot m^2/s^3$)	Leistung
OTR	(mg/(l·h))	Sauerstoff-Eintragsrate
P	(bar)	Druck
q_{O_2}	(mg/(g·h))	Biomassespezifische Sauerstoffaufnahme
Q_{O_2}	(mg/(l·h))	Volumenbezogene Sauerstoffaufnahme
r	(-)	Faktor
R	(l·bar/(K·mol))	Allgemeine Gaskonstante
s	(-)	Faktor
S	(mol/l)	Substratkonzentration
t	(h)	Prozeßzeit
T	(°C)	Temperatur
U	($\mu mol/min$)	Enzymaktivität
V	(l)	Volumen
X	(g/l)	Biomassekonzentration
$Y_{X/S}$	(-)	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat
δ	(-)	Faktor
τ	(h)	Verweilzeit
μ	(h^{-1})	spezifische Wachstumsrate

Abkürzungen:

gTS	Gramm Biotrockenmasse
BW	Blindwert
Xyl	Xylose
Ara	Arabinose
Glc	Glucose
$X_{2..6}$	Xylooligomere, Polymerisationsgrad 2 bis 6
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (=Glycolyse)

LISTE DER TABELLEN

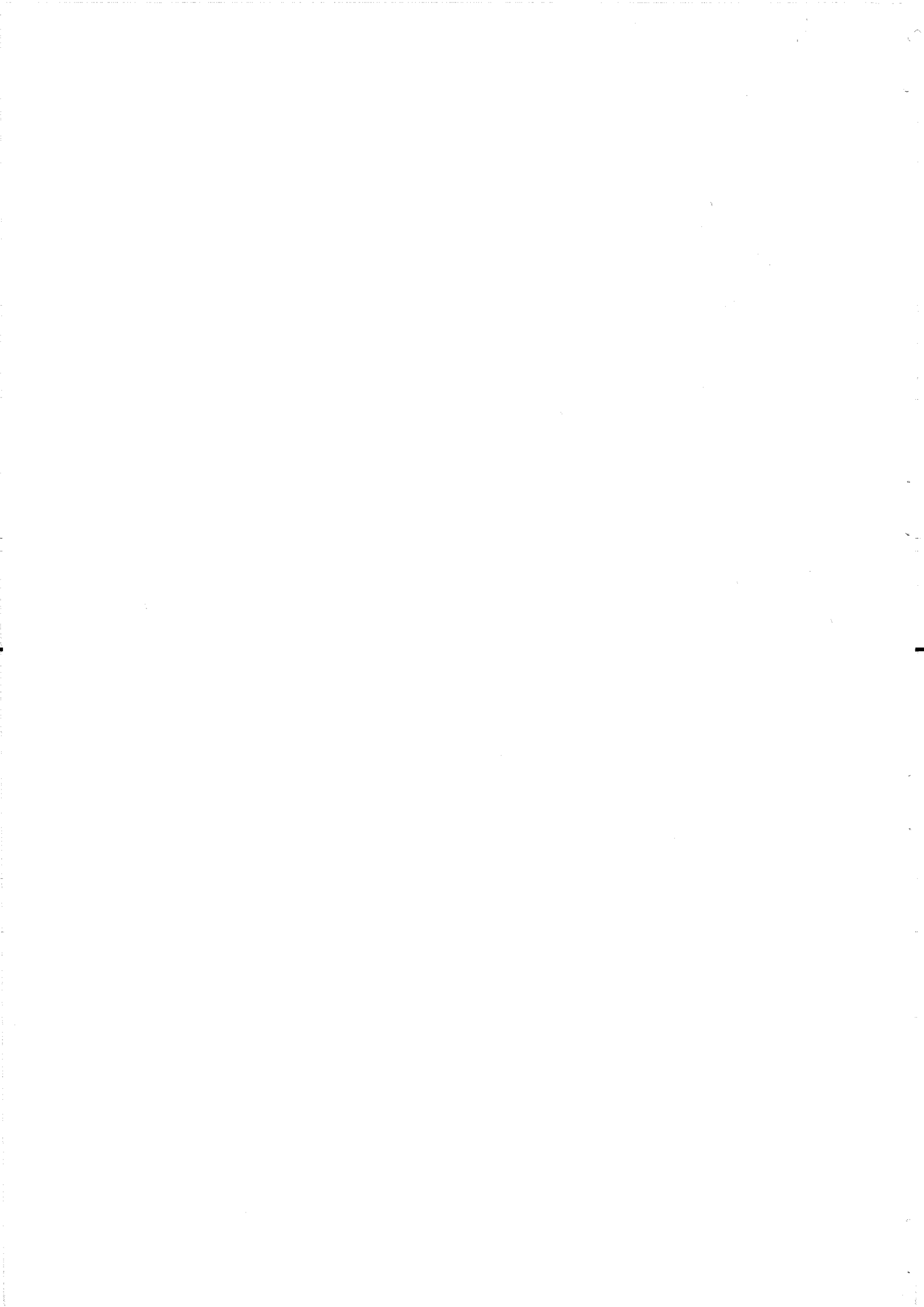
Tabelle 1: Prozentuale Trockengewichtsanteile der Zellwandkomponenten bei verschiedenen Pflanzenarten.....	28
Tabelle 2: Seitenketten des Xylanmoleküls bei verschiedenen Pflanzenarten und prozentualer Anteil des substituierten Xylosemoleküls in der Hauptkette.....	29
Tabelle 3: Geräte- und Meßstellenliste der Versuchsanlage....	34
Tabelle 4: Max. Xylanase- und Xylosidaseaktivitäten (U/ml) zum Zeitpunkt t (h).....	71
Tabelle 5: Biomasse- und Xylanaseproduktion bei verschiedenen C-Quellen.....	74
Tabelle 6: Unterschiedliche Ca ²⁺ -Konzentrationen im Inkubationsansatz.....	77
Tabelle 7: Konzentrationen freigesetzter reduzierender Zucker (als Xylose) und resultierende Xylanaseaktivitäten bei unterschiedlichen Xylankonzentrationen im Testansatz nach 20 min Inkubation.....	82
Tabelle 8: Abhängigkeit der Xylanaseaktivität von der Probenverdünnung.....	83
Tabelle 9: Abhängigkeit der biomassespezifischen Produktivität von der Erholungsdauer.....	102
Tabelle 10: Konzentrationen von Gärungsprodukten zu verschiedenen Zeiten.....	109
Tabelle 11: C-Bilanzen der Produktbildung bezogen auf den Glycerinverbrauch zu verschiedenen Zeiten.....	109

LISTE DER FIGUREN UND ABBILDUNGEN:

Figur 1: Die Rolle der Saprophyten im Kreislauf der Natur.....	1
Figur 2: Wachstumsphasen in der Batchfermentation.....	6
Figur 3: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substrat- konzentration.....	8
Figur 4: Abhängigkeit der stationären Werte der Biomasse- und Substratkonzentration sowie der Produktivität und der Wachstumsrate von der Durchflußrate.....	10
Figur 5: Transport des Sauerstoffs aus der Gasphase in die Flüssigkeit und aus der Flüssigkeit in die Mikroorganismen.....	11
Figur 6: Katabolitrepression und Induktion der Transkription bei <i>E. coli</i>	16
Figur 7: Zusammenstellung möglicher Stoffwechselwege zum Glucose- bzw. Glycerinabbau.....	22
Figur 8: Einfluß der Austauschstromdichte zwischen Redoxelektrode und der Meßlösung.....	25
Figur 9: Ausschnitt aus einem Xylanmolekül mit Seitengruppen.....	29
Figur 10: Einwirkung verschiedener xylanolytischer Enzyme auf das Xylanmolekül.....	30
Figur 11: Photographische Ansicht der Versuchsanlage.....	32
Figur 12: Fließbild der Fermentationsanlage mit Meß- und Regelstellen.....	33
Figur 13: Eichkurve der kontinuierlich ermittelten optischen Dichte in Abhängigkeit vom Trockengewicht.....	41
Figur 14: Stoffströme der Gaskomponenten durch den Fermenter.....	43
Figur 15: Dosierregelung mittels induktiver Durchflußmessung.....	46
Figur 16: Fließbild der Dosieranlage YPP01.....	47
Figur 17: Dosierregelung mittels differentieller Gewichtsmessung.....	48
Figur 18: Eichkurve der optischen Dichte gegen das Trockengewicht der Fermenterkultur.....	50
Figur 19: Eichkurve zur Bestimmung der Xylanaseaktivität.....	52
Figur 20: Eichkurve zur Bestimmung der β -Xylosidase- aktivität.....	55
Figur 21: Eichkurve zur Ermittlung der α -Amylaseaktivität.....	57
Figur 22: Eichkurve für die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
Figur 23: Eichchromatogramm der Isotachophorese.....	61
Figur 24: Eichchromatogramme der Gaschromatographie für Poropak- und Carbopak-Säule.....	63
Figur 25: Volumenaktivitäten der Xylanase im Kulturfiltrat verschiedener <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Stämme.....	73

Figur 26: Spezifische Xylanaseaktivitäten bezogen auf das Gesamtprotein im Kulturfiltrat verschiedener <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Stämme.....	73
Figur 27: Biomassewachstum in Abhängigkeit von verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen im Medium.....	76
Figur 28: Xylanaseproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen im Medium.....	76
Figur 29: Chromatogramm der Produkte der Säurehydrolyse des Xylans, Vergleich mit Eichstandards.....	79
Figur 30: Chromatogramme der Produkte der enzymatischen Hydrolyse des Xylans nach unterschiedlichen Inkubationsdauern.....	80
Figur 31: Abhängigkeit der auf Originalverdünnung bezogenen Xylanaseaktivität von der simulierten Substratkonzentration.....	83
Figur 32: Abhängigkeit der gemessenen Xylanaseaktivitäten von der Enzymverdünnung.....	85
Figur 33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Stamm DSM 7.....	87
Figur 34: Batchfermentation: Substrataufnahme und Produktbildung unter Fermentationsbedingungen ohne Rühren.....	88
Figur 35: Abhängigkeit der Wachstumsrate der Organismen vom Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit.....	90
Figur 36: Kontinuierliche Fermentation im chemostatischen Betrieb bei pH 6.0.....	91
Figur 37: Kontinuierliche Fermentation im chemostatischen Betrieb bei pH 5.5 bzw. pH 5.1.....	93
Figur 38: Induzierte Biomasseschwingungen und wiederangeregte Produktion der Enzyme.....	96
Figur 39: Abhängigkeit der Auswaschdauer von der Länge der pH-Absenkung und von der Verweilzeit.....	98
Figur 40: Abhängigkeit des Schwingungsverhaltens und der Xylanaseproduktion von der Länge der Erholungsdauer zwischen den pH-Wert-Absenkungen.....	100
Figur 41: Start der Xylanaseproduktion mit dem Beginn der Sauerstofflimitierung.....	103
Figur 42: Biomasse und Xylanaseaktivität in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck und vom Redoxpotential.....	104
Figur 43: Zusammenhang zwischen den Meßwerten des Redoxpotentials und dem Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit.....	106
Figur 44: Zeitliche Abfolge der Produktbildung in Abhängigkeit vom Redoxpotential und PO_2	107
Figur 45: Zeitliches Verhalten von Biomasse und Redoxpotential in unterschiedlichen Verweilzeitbereichen..	112
Figur 46: Unterschiedliches Verhalten der Kultur bei Verweilzeitverkürzung von 3.64 auf 3.53 Stunden.....	114
Figur 47: Versuch der Beeinflussung des Redoxpotentials durch Verlängern der Verweilzeit.....	116

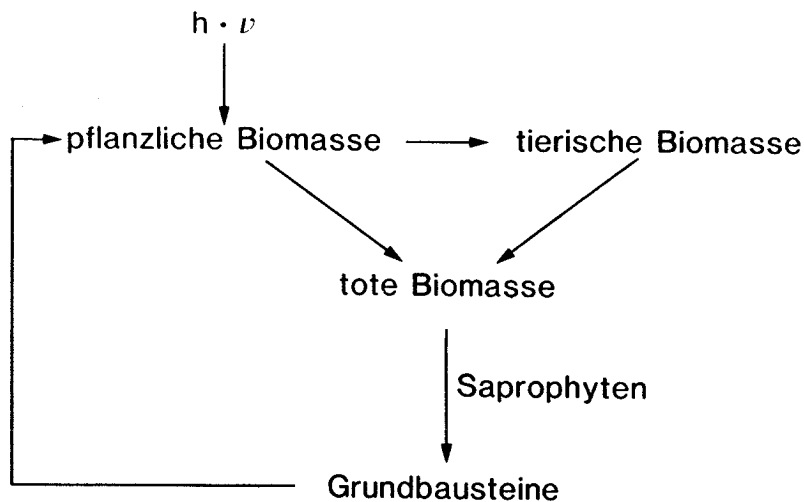
Figur 48: Versuch der Beeinflussung des Redoxpotentials durch Verkürzen der Verweilzeit.....	118
Figur 49: Theoretische Überlegung zur gleichzeitigen Regelung von Redoxpotential und Biomassekonzentration.....	121
Figur 50: Ausschnitt aus kontinuierlicher Fermentation ohne Redoxregelung. Gleiche Bedingungen wie im nachfolgenden Regelungsversuch.....	122
Figur 51: Darstellung des Regelungskonzepts anhand des Fermentationsausschnitts mit Redoxregelung.....	124
Figur 52: Vergleich von Fermentationsausschnitten mit und ohne Regelung des Redoxpotentials.....	126
Figur 53: Kinetischer Regelkreis für Drehzahlregelung.....	139
Figur 54: Kinetischer Regelkreis für Redoxregelung.....	139
Figur 55: Simulation instabiler Redoxregelung, wenn keine simultane Biomasseregelung stattfindet.....	147
Figur 56: Simulation starker Regelschwingungen bei doppelter Regelung mit großen Proportionalfaktoren.....	148
Figur 57: Simulation gedämpfter Regelschwingungen bei doppelter Regelung mit gemäßigten Proportionalfaktoren....	149
Figur 58: Simulation sehr trägen Regelverhaltens bei doppelter Regelung mit sehr kleinen Proportionalfaktoren..	150
Figur 59: Simulation verringerter Amplitude der Regelschwingungen, wenn mit höherem $k_1 \cdot a$ gestartet wird.....	151
Figur 60: Simulation wirksamer Schwingungsdämpfung mit Mittelwertverfahren.....	152
Figur 61: Simulation gedämpfter Regelschwingungen durch Einführung eines Dämpfungsgliedes in den Regelalgorithmus der Biomasseregelung.....	153



1. EINLEITUNG

1.1. Die Rolle der Saprophyten und extrazellulärer Enzyme in der Natur

Unter dem Begriff "Biomasse" wird die Materie aller lebenden Organismen, also Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen zusammengefaßt. Diese Materie ist einem immerwährenden Kreislauf unterworfen, in dessen Verlauf ständig hochspezialisierte Biomoleküle aus niedermolekularen Bausteinen aufgebaut werden, zu denen sie nach Beendigung des Lebens wieder zerfallen (Figur 1). Sowohl der Aufbau, als auch der Zerfall der Biomoleküle findet dabei nicht spontan statt, sondern benötigt Energie und die Hilfe von Katalysatoren.



Figur 1: Die Rolle der Saprophyten im Kreislauf der Natur

Die zum Aufbau der Biomoleküle benötigte Energie entstammt in den meisten Fällen dem Sonnenlicht: entweder direkt durch den Prozeß der Photosynthese (bei Pflanzen) oder indirekt durch Aufnahme der mit Hilfe der Photosynthese aufgebauten Substanzen (bei Tieren und dem größten Teil der Mikroorganismen).

Eine zentrale Rolle beim Abbau toter Biomasse in die organischen und mineralischen Bausteine spielen die Saprophyten (griech.: "Faulpflanzen"), zu denen vor allem die (Schimmel-)Pilze und einige Bakterienarten (unter anderem der Gattung *Bacillus*) gehören. Indem diese Organismen entsprechende Enzyme produzieren und in ihre Umgebung ausscheiden ("Exoenzyme"), können auch diejenigen Biomoleküle abgebaut werden, deren

Abbau sehr energieaufwendig ist, und die ohne die katalytische Wirkung dieser Enzyme dem Kreislauf der Natur entzogen wären. Zu diesen Exoenzymen zählen vor allem die zahlreichen Vertreter der Cellulasen, Hemicellulasen und Ligninasen, sowie die extrazellulären Vertreter der Proteasen, Amylasen und Lipasen.

Gelingt es, diese Exoenzyme mit fermentativen Verfahren zu gewinnen, lassen sich diese als Katalysatoren in vielen Anwendungen einsetzen. So können fermentativ gewonnene Hemicellulasen z.B. für die Verzuckerung von Holzkomponenten, aber auch in der Lebensmittelverarbeitung (Klären von Fruchtsäften) oder im Gerbereiprozeß eingesetzt werden.

1.2. Photosynthese und Biomasse als Speicher der Sonnenenergie

Bei der Photosynthese assimilieren die Pflanzen CO_2 aus der Atmosphäre und bilden daraus neue pflanzliche Biomasse. Durch diesen größten globalen Produktionsprozeß entstehen jährlich in allen Land- und Wasserpflanzen rund $1.7 \cdot 10^{11}$ t Trockenmasse mit einem Energiegehalt von $3.2 \cdot 10^{21}$ J, einem Mehrfachen des jährlichen Energieverbrauchs der Erdbevölkerung (Gwinner, 1978).

Vergleicht man die jährliche pflanzliche Energiefixierung mit der gesamten jährlichen Sonneneinstrahlung von $2.5 \cdot 10^{24}$ J, so ergibt sich je nach geographischer Zone nur eine durchschnittliche Nutzung von 0.1% bis 0.3%. Die Nutzung des Sonnenlichts kann allerdings von Pflanzenart zu Pflanzenart erheblich variieren. So bindet z.B. eine Mais-Monokultur etwa dreimal mehr Sonnenenergie, als die gleiche Fläche unberührten Urwalds (Gwinner, 1978). Neben Mais gehören Zuckerrübe, Zuckerrohr, Cassava und Eukalyptus zu den besonders guten Verwertern der Sonnenenergie.

Durch den Prozeß der Photosynthese stellt die pflanzliche Biomasse einen gigantischen Träger sich regenerierender Energie dar. Die Hauptkomponenten dieser Biomasse sind Cellulose, Hemicellulosen, Lignin, Stärke, Proteine und weitere Zellbausteine wie Nucleinsäuren und Lipide. Die Verwendung pflanzlicher Biomasse für die Erzeugung von Energieträgern oder Chemikalien, die bisher aus Erdöl hergestellt wurden, hat seit der ersten "Ölkrise" Mitte der Siebziger Jahre weltweites Interesse gefunden.

Die Biomasse ist jedoch nicht nur ein potentieller Rohstoff für die Energie- oder Chemikalienproduktion, sie ist vor allem auch Nahrungsquelle für Mensch und Tier. Soll eine Verminderung der Nahrungsmittelmenge für Mensch und Tier vermieden werden, so ist Voraussetzung, daß die technische Verwertung der pflanzlichen Biomasse sich auf jene Bestandteile konzentriert, die keinen oder nur geringen Nährwert haben

(Schmidt, 1983). Cellulose, Hemicellulosen und Lignin stehen hier im Vordergrund. Nachdem Cellulose schon seit längerem für die Produktion von Papier, Zellstoff und Viskosefasern verwertet wird, Lignin andererseits bisher aufgrund der äußerst widerstandsfähigen Struktur einer technischen Verwertung unzugänglich ist, konzentriert sich das Interesse seit einigen Jahren insbesondere auf die Hemicellulosen (Schmidt, 1983).

Hemicellulosen sind Makromoleküle aus kettenförmig verknüpften Pentosezuckern. Sie sind Hauptbestandteile einer ganzen Reihe von Abfällen der Nahrungsmittelproduktion, wie z.B. Stroh und Getreidespelzen, Zuckerrübenschnitzel, Bagasse, Rückstände von Citrusfrüchten und Preßkuchen der Obstsafterzeugung. Zum Teil werden diese Materialien als Futtermittelzusatz verwendet, der Großteil wird jedoch verworfen. Gelingt es die Hemicellulosen zu den sie aufbauenden Pentosen zu spalten, lassen sich durch fermentative Umsetzungen dieser Pentosen eine ganze Reihe interessanter Grundchemikalien wie Ethanol, Butanol, Aceton, Furfural oder Essigsäure gewinnen, die zum Teil als Energieträger, zum Teil als Vorstufen für die chemische Synthese Verwendung finden. Aus der wichtigsten Pentose, der Xylose, lassen sich zudem spezielle Zucker und Zuckeralkohole wie Xylit, der als Zuckeraustauschstoff verwendet wird, gewinnen (Gwinner, 1978).

Die Spaltung der Hemicellulosen kann einerseits durch Säurehydrolyse, zum anderen enzymatisch erfolgen.

Die Säurehydrolyse ist ein industriell bereits erprobtes Verfahren, das hohe Temperaturen in korrosionsfesten Kesseln erfordert. Wenn die richtigen Bedingungen gewählt werden, kann das Xylan aus einem Cellulose- und Xylan-haltigen Rohstoff selektiv hydrolysiert werden. Der Abbau ist dann jedoch meist nicht vollständig. Bei entsprechend längeren Hydrolysezeiten entstehen aber große Mengen von Nebenprodukten, die nur schwer von der Xylose abzutrennen sind und zu Ausbeuteverlusten führen (Reilly, 1981).

Der enzymatische Abbau der Hemicellulosen wird durch den in Rohmaterialien enthaltenen Ligningehalt gehemmt. Durch geeignete Vorbehandlung (Whistler & Richards, 1970) lassen sich jedoch Fraktionen gewinnen, die durch die milde und spezifische Einwirkung der Enzyme wesentlich effektiver abgebaut werden können als durch die Säurehydrolyse.

1.3. Produktion hemicellulolytischer Enzyme

Wie eingangs erwähnt, werden hemicellulolytische Enzyme vor allem von Organismen aus der Gruppe der Saprophyten gebildet. Typische und gut untersuchte Produzenten dieser Enzyme sind Arten der Gattungen:

Aspergillus

(Conrad, 1981; Gorbacheva & Rodionova, 1977; Flannigan & Sellars, 1978; John et al., 1979; Reilly, 1985)

Trichoderma

(Schmidt et al., 1982; Dekker, 1983, Robison, 1984)

Cryptococcus

(Notario et al., 1979; Biely et al., 1980a; Kratky & Biely, 1980; Yasui et al., 1984)

Streptomyces

(Iizuka & Kawaminami, 1969; Nakanishi et al., 1980)

Trichosporon

(Stevens & Payne, 1976; Stüttgen & Sahm, 1982)

Cellulomonas

(Peiris et al., 1982)

Bacillus

(Emi et al., 1971; Esteban et al., 1982; Deschamps et al., 1982; Bernier et al., 1983; Okazaki et al., 1984).

Zu den gebildeten Enzymen gehören Mannanasen, Galaktanasen, Xylosidasen und Xylanasen, wobei letztgenannte die technisch bedeutendsten sind. Da diese Enzyme i.a. von den Organismen ins umgebende Medium ausgeschieden werden, lassen sie sich in submerser Fermentation durch absatzweises oder kontinuierliches Abtrennen der Organismen aus dem Nährmedium gewinnen.

In vielen Fällen produzieren die Organismen ihre extrazellulären Enzyme jedoch nur, wenn das Enzymsubstrat oder Abbauprodukte desselben als Induktoren im Nährmedium vorhanden sind. Um verfahrenstechnische Probleme mit Feststoff-Substraten, wie z.B. Xylan, zu vermeiden, wird vielfach versucht, niedermolekulare und wasserlösliche Induktoren einzusetzen (Nakanishi, 1976; Biely, 1980; Yasui, 1984). Solche Substanzen (z.B. Methyl- β -D-Xyloside oder Xylobiosebutyrylester, Nakanishi, 1976) sind jedoch relativ teuer und daher für die Anwendung in großtechnischen Verfahren nicht geeignet.

Vorteilhafter ist die Verwendung von Organismen, die keinen Induktor für die Exoenzymsynthese benötigen. Dies ist zum Beispiel für die Synthese einiger extrazellulärer Enzyme bei Arten der Gattung *Bacillus* der Fall. (Priest, 1977 u. 1983). Bei diesen Organismen wird die Exoenzymsynthese jedoch oft durch den Mechanismus der Katabolit-Repression kontrolliert,

das heißt, daß hohe Nährstoffkonzentrationen die Exoenzymsynthese hemmen (vergl. Abschnitt 2.2.2). Diese Repression führt bei der kontinuierlichen Fermentation dazu, daß eine konstant anhaltende Enzymproduktion nicht möglich ist (Priest, 1983). Versuche, die Organismen in ihrem Nährstoffangebot zu limitieren und damit die Katabolit-Repression aufzuheben, haben bislang nur relativ geringe Erfolge gezeigt (Frankena et al., 1986).

In der vorliegenden Arbeit wird dagegen ein Verfahren vorgestellt, mit dem eine konstante hohe Xylanaseproduktion in der kontinuierlichen Fermentation durch eine geregelte Sauerstofflimitierung der Organismen erreicht wird.

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein Verfahren zur kontinuierlichen fermentativen Produktion einer Xylanase zu entwickeln. Dazu sollte zunächst ein geeigneter Organismus und ein für diesen geeignetes Nährmedium gefunden werden. Im Nährmedium sollte dabei nach Möglichkeit auf die Verwendung feststoffhaltiger Substanzen wie Xylan verzichtet werden.

Anhand geeigneter Meßmethoden sollte die Abhängigkeit der Xylanasesynthese von den die Organismen umgebenden Bedingungen erforscht werden, sodaß eine Grundlage für eine gezielte Beeinflussung dieser Bedingungen im Sinne einer maximalen Xylanaseproduktion zur Verfügung stand.

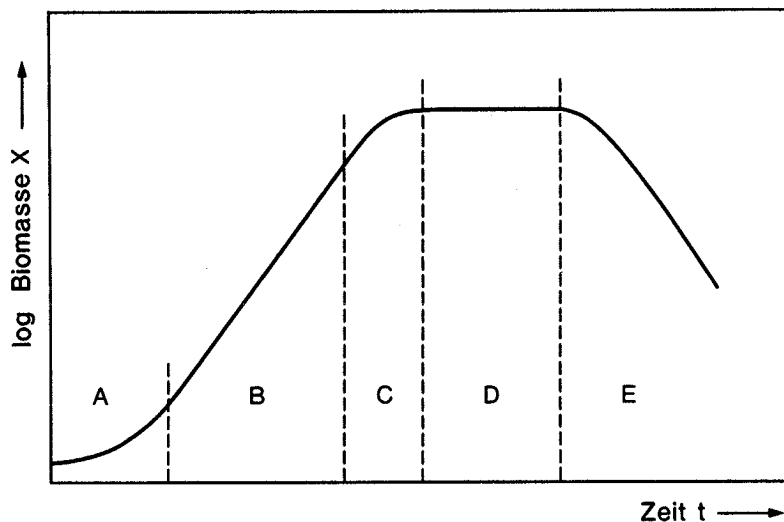
Als wichtige Voraussetzung für eine definierte kontinuierliche Kulturführung sollte der Einsatz von geregelten Dosierverfahren für das Nährmedium erprobt werden, mit deren Hilfe gewünschte Durchflußraten exakt eingestellt und konstant gehalten werden sollten.

2. THEORIE UND GRUNDLAGEN

2.1. Grundlagen der Mikroorganismenzucht

2.1.1. Wachstum in einer Batch-Kultur

Wird ein Nährmedium geeigneter Zusammensetzung und Temperatur mit Organismen beimpft, beginnen diese zu wachsen und durchlaufen nachfolgend eine Reihe von Übergangszuständen, die zur Ausbildung eines charakteristischen Wachstumszyklus führen. Im allgemeinen lassen sich dabei mehr oder weniger deutlich einzelne Phasen dieses Wachstumszyklus unterscheiden (Figur 2), so z.B. eine anfängliche Lag-Phase (A), eine exponentielle Wachstumsphase (B) gefolgt von Phasen sich verlangsamenden Wachstums (Übergangsphase (C), stationäre Phase (D)) und schließlich einer Absterbephase (E).



Figur 2: Wachstumsphasen in der Batchfermentation

Die spezifische Wachstumsrate μ (h^{-1})

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (\text{Gl.1})$$

mit X = Biomassekonzentration (g/l)

t = Zeit (h)

nimmt während des Wachstumszyklus anfänglich zu, erreicht und behält während der exponentiellen Phase ihren maximalen Wert μ_{\max} und nimmt danach wieder bis $\mu = 0$ ab.

Das Durchlaufen der einzelnen Wachstumsphasen ist dabei keine Eigenheit der Organismen, sondern eine Folge der Interaktion zwischen den Organismen und ihrer Umgebung. So würden die Organismen dauerhaft in der exponentiellen Phase mit $\mu = \mu_{\max}$ verbleiben, wenn ein wachsender "Umweltwiderstand" sie nicht daran hindern würde.

Dieser "Umweltwiderstand" kann darin bestehen, daß ein essentieller Bestandteil des Nährmediums durch die Organismen verbraucht wird und dadurch das Wachstum limitiert, oder daß die Organismen während des Wachstums Stoffwechselprodukte in das Medium ausscheiden, die sich anreichern und toxisch auf die Organismen wirken.

Für den ersten Fall hat Monod (1942) die modellmäßige Beschreibung der Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der Konzentration eines verbraucht werdenden Substrates S aufgestellt:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad [h^{-1}] \quad (\text{Gl. 2})$$

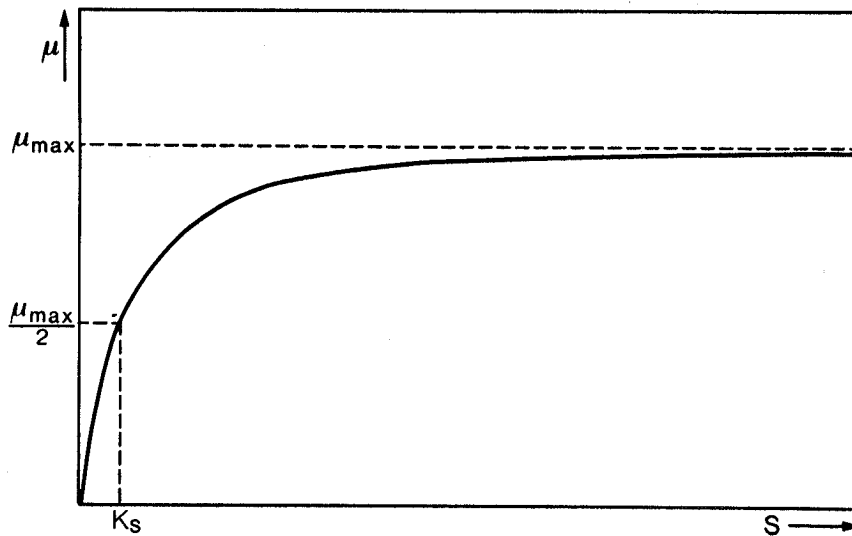
mit μ_{\max} = maximale Wachstumsrate (h^{-1})

S = aktuelle Konzentration des bezogenen Substrates in der Kulturbrühe (mol/l)

K_S = Substrat-Sättigungskonstante (mol/l), entspricht der Substratkonzentration bei der $\mu = 1/2 \mu_{\max}$ ist.

Wie Figur 3 zeigt, kann man grob zwischen einem Bereich, in dem μ nahezu unabhängig von S ist (Reaktion 0. Ordnung), und verbunden durch einen Übergangsbereich, einem Bereich nahezu linearer Abhängigkeit zwischen μ und S (Reaktion 1. Ordnung) unterscheiden. Im ersten Fall liegt Substratsättigung vor und die Organismen wachsen nahezu mit $\mu = \mu_{\max}$. Im zweiten Fall unterliegen die Organismen einer Substratlimitierung, die in der Batchkultur dazu führt, daß die Wachstumsrate kleiner wird, bis bei $S = 0$ kein Wachstum mehr stattfindet.

Diese Beziehung gilt für alle von den Organismen zum Wachstum benötigten Substrate, einschließlich des Sauerstoffs. Dasjenige Substrat, das als erstes zur Neige geht, ist dabei das limitierende und bestimmt die Wachstumsrate der Mikroorganismen.



Figur 3: Abhängigkeit der Wachstumsrate μ von der Substratkonz. S

2.1.2. Kontinuierliche Kulturführung:

Von einer kontinuierlichen Fermentation spricht man, wenn einem Kulturgefäß pro Zeiteinheit genau die Menge Kulturbrühe entnommen wird, die gleichzeitig als frisches Medium in das Kulturgefäß einläuft.

Die Rate, mit der dabei ein konstantes Reaktorvolumen V (l) von einem Volumenstrom F (l/h) durchströmt wird, nennt man Durchflußrate D (h^{-1}).

$$D = \frac{F}{V} \quad [h^{-1}] \quad (\text{Gl. 3})$$

Der Kehrwert der Durchflußrate bezeichnet die mittlere Verweilzeit τ (h) eines Flüssigkeitelements im Reaktorvolumen.

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V}{F} \quad [h] \quad (\text{Gl. 3a})$$

Wird die Durchflußrate D über die Zeit konstant gehalten spricht man von chemostatischer Kulturführung. Wird die kontinuierliche Kultur dagegen so geführt, daß die Biomassekonzentration X über die Zeit konstant bleibt, indem die Trübung der Kultur photometrisch gemessen wird und durch Variation der Durchflußrate auf ihrem Sollwert gehalten wird, so spricht man von turbidostatischer Kultur.

Überführt man eine Batchkultur, in der aufgrund des Organismenwachstums bereits ein Substrat limitierend wirkt oder verbraucht ist, in eine chemostatische Kultur, so ermöglicht dies den Organismen, mit genau der Geschwindigkeit weiterzuwachsen, mit der das limitierende Substrat durchs Medium zugeführt wird:

$$\frac{dX}{dt} = D \cdot y_{X/S} \cdot S_0 \quad [g/(l \cdot h)] \quad (\text{Gl. 4})$$

mit $y_{X/S}$ = Ausbeutekoeffizient (-)

S_0 = Substratkonzentration im zulaufenden Nährmedium (mol/l)

Die zeitliche Änderung der Organismenkonzentration dX/dt im kontinuierlichen System ergibt sich aus Biomassezuwachs durch Wachstum ($\mu \cdot X$) und aus dem Austragen der Biomasse mit dem kontinuierlichen Durchfluß ($-D \cdot X$):

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) \cdot X \quad [g/l] \quad (\text{Gl. 5})$$

Im stationären Fall (steady state) ist $dX/dt = 0$ und die Wachstumsrate μ der Organismen entspricht genau der Durchflußrate D .

$$D = \mu \quad [h^{-1}] \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Organismen passen ihre Wachstumsrate also der Durchflußrate an.

Die zeitliche Änderung der Substratkonzentration dS/dt ergibt sich entsprechend aus dem Einspülen frischen Substrates mit der Durchflußrate ($D \cdot S_0$), dem Ausspülen unverbrauchten Substrates mit der Durchflußrate ($-D \cdot S$) und dem Substratverbrauch durch das Organismenwachstum ($\mu \cdot X/Y$) und den Erhaltungsstoffwechsel ($m \cdot X$):

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_0 - S) - \mu \cdot \frac{X}{y_{X/S}} - m \cdot X \quad [g/(l \cdot h)] \quad (\text{Gl. 7})$$

Im stationären Fall (Steady-state) ist $dS/dt = 0$ und

$$D \cdot (S_0 - S) = \mu \cdot \frac{X}{y_{X/S}} + m \cdot X \quad (\text{Gl. 8})$$

In Abhängigkeit von der Durchflußrate berechnen sich die stationären Konzentrationen von Biomasse X (aus Gl. 6 u. 8) und Substrat S (aus Gl. 2 u. 6) wie folgt:

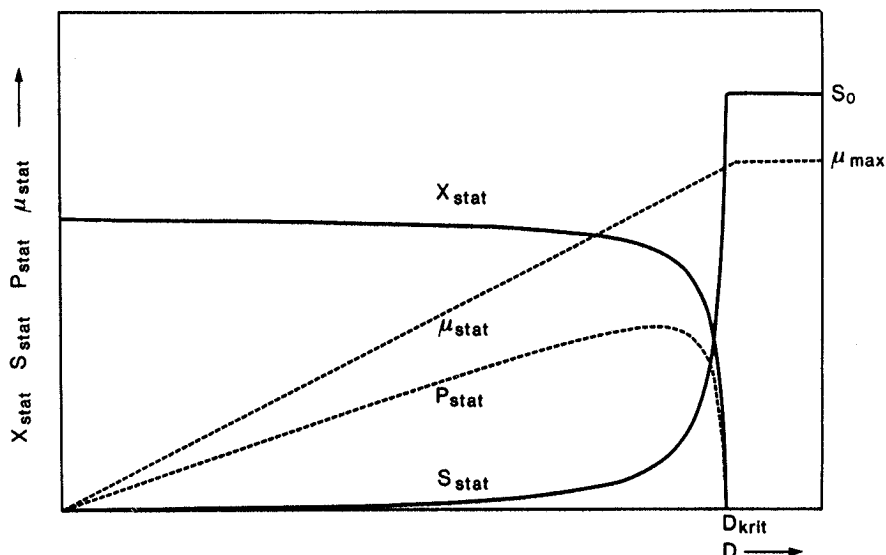
$$S_{\text{stat}} = \frac{K_S \cdot D}{\mu_{\text{max}} - D} \quad [\text{g/l}] \quad (\text{Gl. 9})$$

$$X_{\text{stat}} = Y_{X/S} \cdot (S_0 - S_{\text{stat}}) \quad [\text{g/l}] \quad (\text{Gl. 10})$$

Für die Biomasseproduktivität $P = D \cdot X$ (g/lh) gilt unter stationären Bedingungen:

$$P_{\text{stat}} = D \cdot X_{\text{stat}} \quad [\text{g/(l \cdot h)}] \quad (\text{Gl. 11})$$

Ein Auftragen der stationären Werte von X , S und P gegen die Durchflußrate D (Figur 4) macht deutlich, daß die Biomasse- und Substratkonzentration im Bereich niedriger Durchflußraten nur eine geringe Abhängigkeit von der Durchflußrate D zeigt, während die Produktivität fast linear zunimmt. Nähert man sich jedoch einer kritischen Durchflußrate D_{krit} , so ändern sich die stationären Werte von X , S und P zunehmend stark, bis bei D_{krit} die stationäre Substratkonzentration im Reaktor gleich der Konzentration S_0 im einlaufenden Medium ist und der Biomasseverlust durch Auswaschen durch das Wachstum nicht mehr ausgeglichen werden kann. Die stationäre Biomassekonzentration wie die Produktivität ist dann Null (wash-out). Entsprechend Gl. 6 nimmt die Wachstumsrate der Organismen dabei linear mit der Durchflußrate D zu.



Figur 4: Abhängigkeit der stationären Werte der Biomasse- und Substratkonzentration sowie der Produktivität P und der Wachstumsrate μ von der Durchflußrate D

2.1.3. Kontinuierliche Kultur bei Sauerstofflimitierung

Ist das das Mikroorganismenwachstum limitierende Substrat nicht eine im zulaufenden Medium enthaltene Substanz S, sondern der mit der Zuluft zugeführte Sauerstoff, so ist die Wachstumsrate μ in Gl. 2 keine Funktion von S, sondern eine Funktion der Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs C_{O_2} :

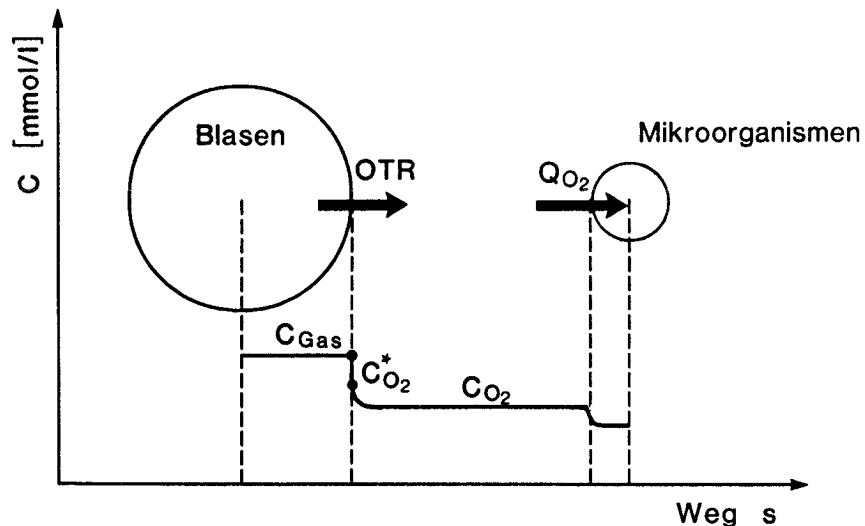
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_o + C_{O_2}} \quad [h^{-1}] \quad (\text{Gl. 12})$$

mit μ_{\max} = maximale Wachstumsrate (h^{-1})

C_{O_2} = Konzentration des gelösten Sauerstoffs (mmol/l)

K_o = Sättigungskonstante (mmol/l)

Der Sauerstofftransport aus der dispergierten Gasphase (Blasen) bis in das Innere der Mikroorganismen muß eine Folge hintereinandergeschalteter Einzelwiderstände überwinden (Figur 5). Geschwindigkeitsbestimmend ist dabei jedoch in der Regel der Transport des Sauerstoffs OTR von der Phasengrenzfläche Gas/Flüssig in den Kern der Flüssigkeit (Reuß, 1979a)



Figur 5: Transport des Sauerstoffs aus der Gasphase in die Flüssigkeit (OTR) und aus der Flüssigkeit in die Mikroorganismen (Q_{O_2}), sowie resultierendes Konzentrationsgefälle

Für die zeitliche Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit gilt:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - Q_{O_2} \quad [\text{mmol}/(\text{l}\cdot\text{h})] \quad (\text{Gl. 13})$$

und

$$Q_{O_2} = q_{O_2} \cdot X \quad [\text{mmol}/(\text{l}\cdot\text{h})] \quad (\text{Gl. 14})$$

mit OTR = Sauerstoffeintragsrate (mmol/(l·h))

Q_{O_2} = Sauerstoffaufnahme (mmol/(l·h))

q_{O_2} = spez. Sauerstoffaufnahme (mmol/(g·h))

X = Biomassekonzentration (g/l)

Die Sauerstoffeintragsrate OTR berechnet sich aus dem volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten für Sauerstoff $k_L \cdot a$ (h^{-1}) und dem treibenden Konzentrationsgefälle $C_{O_2}^* - C_{O_2}$:

$$OTR = k_L \cdot a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [\text{mmol}/(\text{l}\cdot\text{h})] \quad (\text{Gl. 15})$$

mit k_L = Stoffübergangskoeffizient (m/h)

a = volumenspezifische Phasengrenzfläche (m^2/m^3)

$C_{O_2}^*$ = Sauerstoffkonzentration an der Grenzfläche zwischen Gasphase und Flüssigphase

C_{O_2} = Sauerstoffkonzentration im Kern der Flüssigkeit

Das Produkt $k_L \cdot a$ ist dabei abhängig vom Leistungseintrag des Rührers N in den Fermenterinhalt V (Reuß, 1979a):

$$k_L \cdot a \approx (N/V)^n \quad (\text{Gl. 16})$$

mit $n = 0.4$: laminare Strömung

$n = 0.7$: turbulente Strömung

Die Rührerleistung N ($\text{kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^3$), gegeben durch den Rührerdurchmesser d_R und die Rührerdrehzahl n , ist in erster Linie von der Begasungsrate V_G abhängig:

$$N \approx n^3 \cdot d_R^5 = f(\dot{V}_G) \quad [\text{kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^3] \quad (\text{Gl. 17})$$

Die spezifische Sauerstoffaufnahme rate gehorcht analog der Wachstumsrate μ (Gl.12) einer Monod-Kinetik:

$$q_{O_2} = q_{O_2\text{max}} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_q + C_{O_2}} \quad [\text{mmol}/(\text{gTS}\cdot\text{h})] \quad (\text{Gl. 18})$$

mit $q_{O_2\text{max}}$ = maximale spez. Sauerstoffaufnahme rate (mmol/gh)
 K_q = Sättigungskonstante (mmol/l)

Im stationären Fall ist $dX/dt = 0$ und $dC_{O_2}/dt = 0$ und die stationären Konzentrationen von Biomasse und gelöstem Sauerstoff berechnen sich wie folgt:

$$X_{\text{stat}} = \frac{k_L \cdot a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2\text{stat}})}{q_{O_2}} \quad [\text{g}/\text{l}] \quad (\text{Gl. 19})$$

$$C_{O_2\text{stat}} = \frac{K_o \cdot D}{\mu_{\text{max}} - D} \quad [\text{mmol}/\text{l}] \quad (\text{Gl. 20})$$

2.2. Regulation der Enzymsynthese bei Bakterien

2.2.1. Allgemeine Mechanismen und Regulationsmodelle

Würden alle Proteine, insbesondere alle Enzyme, zu deren Synthese die Zelle aufgrund ihrer genetischen Information befähigt ist, ungehemmt gebildet, so wäre ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels nicht denkbar (Leuthardt, 1977).

Die weitaus meisten im Stoffwechsel der Bakterien tätigen Enzyme unterliegen daher Regulationsmechanismen. Diese zielen darauf ab, die StoffwechsellLeistungen einzelner Enzymsysteme sinnvoll und ökonomisch zu koordinieren und die Überproduktion von Enzymen, Intermediärverbindungen und Endprodukten zu vermeiden. Diese Reaktionsmechanismen können je nach dem Niveau, auf dem sie wirken, unterschieden werden in Regulation der Enzymsynthese und Regulation der Enzymaktivität.

Die Regulation der Enzymaktivität ist im allgemeinen ein allosterischer Mechanismus, bei dem ein positiver oder negativer Effektor (meistens ein Endprodukt) am Enzym bindet und dabei die Aktivität des Enzyms verändert. Diesem Regulationsmechanismus unterliegen vorwiegend die Schlüsselenzyme innerhalb des Intermediär-Stoffwechsels (Schlegel 1985), so daß er z.B. bei extrazellulären Enzymen kaum eine Rolle spielt.

Der Regulation auf dem Niveau der Enzymsynthese unterliegen dagegen alle Stoffwechselwege. Die Synthese der Enzyme kann dabei theoretisch sowohl bei der Transkription als auch bei der Translation reguliert werden.

Bei der Transkription wird die Information von DNA-Abschnitten auf m-RNA-Moleküle überschrieben. Regulatorisch wirkt sich aus, wie oft pro Zeiteinheit durch die Wirkung der RNA-Polymerase eine Kopie von einem Strukturgen als m-RNA hergestellt wird.

Bei der Translation wird die Basensequenz der m-RNA an den Ribosomen in die Aminosäuresequenz der entstehenden Proteine übersetzt. Die Geschwindigkeit der Translation kann regulativ variiert werden.

Es hat sich jedoch herausgestellt, daß die Enzymproduktion bei Prokaryonten vorwiegend auf der Stufe der Transkription reguliert wird (Schlegel 1985). Die beste Erklärung für den der Transkription zugrunde liegenden Mechanismus liefert das Operon-Modell (Jacob & Monod, 1961). Operons sind funktionelle Einheiten aus mehreren Genen auf der DNS (vergl. Figur 6). Neben den Strukturgenen, die die Information der zu

synthetisierenden Proteine enthalten, enthält jedes Operon ein Promotor- und ein Operatorgen.

Der Promotor stellt eine Basensequenz dar, die von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (dem Enzym, das die Information der Strukturgene auf die m-RNA überträgt) erkannt wird. Der Promotor ist damit die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase und gleichzeitig der Startpunkt für die Transkription. Diese Eigenschaften des Promotors können jedoch durch die Wirkung von Regulatorproteinen verändert werden.

Der Operator ist eine Basensequenz, die zwischen dem Promotor und den Strukturgenen liegt und ebenfalls mit einem Regulatorprotein (dem sog. Repressor) reagieren kann. Diese Reaktion entscheidet darüber, ob die Strukturgene zur Transkription freigegeben werden oder nicht. Die Regulatorproteine werden von eigenen Operons synthetisiert, die wahrscheinlich selbst keiner Regulation unterliegen (Leuthardt, 1977). Die Fähigkeit der Regulatorproteine am Operator zu binden, wird durch niedermolekulare Substanzen (Effektoren), meist dem Enzymsubstrat oder dem Produkt, gesteuert. Je nach positiver oder negativer Wirkung des Effektors spricht man vom Induktor oder vom Repressor. Man unterscheidet daher in diesem Zusammenhang zwischen:

- Enzyminduktion
- Endprodukt-Repression
- Katabolit-Repression

Der Endprodukt-Repression unterliegen vorwiegend die Enzyme des anabolischen (aufbauenden) Stoffwechsels (Grunow, 1981). Das Endprodukt einer Biosynthesekette wirkt dabei als Co-Repressor, der mit dem Repressorprotein des Regulatorgens zum wirksamen Repressor bindet und dann das Operatorgen blockiert.

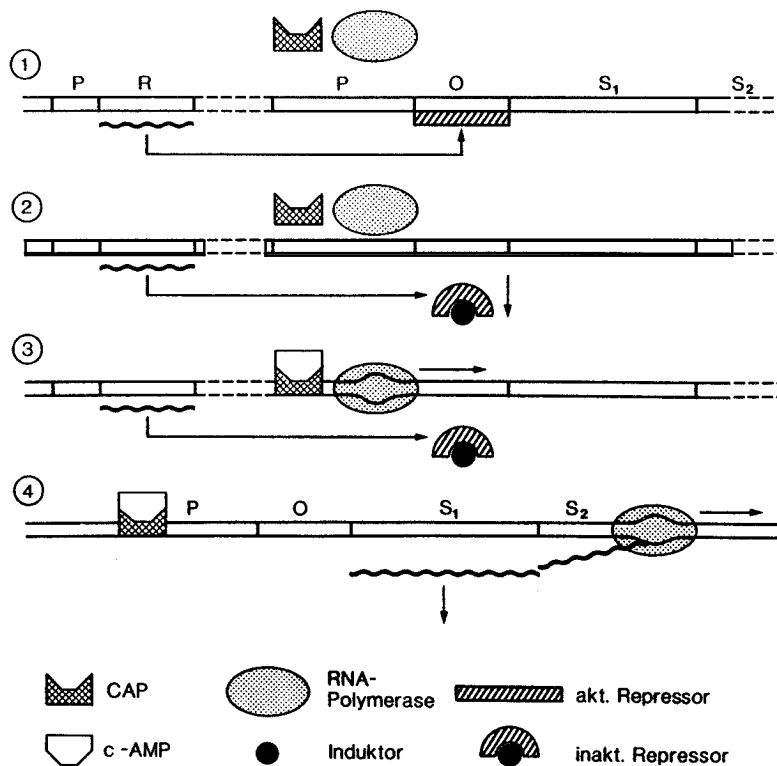
Der Enzyminduktion und der Katabolit-Repression unterliegen dagegen hauptsächlich die katabolischen Enzyme, also alle zur Aufnahme und zur Einschleusung eines Substrats in den Intermediär-Stoffwechsel notwendigen Enzyme. Hierzu zählen auch die meisten extrazellulären Enzyme.

Bei der Enzyminduktion wirkt ein im Nährmedium vorhandenes Enzymsubstrat als Induktor, indem es den vom Regulatorgen produzierten Repressor bindet und so das Operatorgen zur Enzymsynthese freigibt. Bei extrazellulären Enzymen, deren Substrate nicht in die Zelle gelangen können, kann auch ein niedermolekulares Enzymprodukt als Induktor wirken (Welker & Campbell, 1963).

Bei der Katabolit-Repression wird die Synthese bestimmter konstitutiver oder induzierbarer Enzyme unterbunden, wenn eine leichter verwertbare

Substanz im Medium vorhanden ist. Diesem Mechanismus wird von vielen Autoren auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synthese extrazellulärer Enzyme (besonders auch der Gattung *Bacillus*) zugeschrieben (vergl. Abschnitt 2.2.2).

Bei *Escherichia coli* beruht die Katabolit-Repression darauf, daß Glucose und andere leicht verwertbare Zucker die Konzentration an 3',5'-cyclischem Adenosinmonophosphat (c-AMP) herabsetzen. Ein bekanntes Beispiel ist die Regulation des Lac-Operons von *E.coli*. Die Transkription der Gene des Lactose-Stoffwechsels unterliegen dabei zum einen der negativen Kontrolle der Katabolit-Repression, zum anderen einer positiven Kontrolle durch Induktion (Lehninger, 1979 /Figur 6).



Figur 6: Katabolit-Repression und Induktion der Transkription bei *E. coli*:
 1) Doppelte Repression in Abwesenheit von c-AMP und Induktor
 2) Katabolit-Repression trotz Anwesenheit des Induktors
 3) Anheften der RNA-Polymerase in Anwesenheit von c-AMP
 4) Transkription bei Anwesenheit von c-AMP und Induktor

Zur Transkription der Gene durch die RNA-Polymerase ist das Anheften eines Katabolit-Aktivator-Proteins (CAP) an einen Bereich des Promotors erforderlich, was aber nur in Verbindung des CAP mit c-AMP geschieht. Abwesenheit von Glucose oder anderer leicht verwertbarer C-Quellen im Medium führt zum Ansteigen der intrazellulären c-AMP-Konzentration und so zum Aufheben der Katabolit-Repression. Zusätzlich

muß aber auch Lactose als Induktor vorhanden sein, der den vom Regulatorgen ständig erzeugten Repressor inaktiviert und dadurch das Operatorgen freigibt, so daß die RNA-Polymerase die Strukturgene transkribieren kann.

2.2.2. Regulation der Synthese extrazellulärer Enzyme bei *Bacillus*

Die Mechanismen, die für die Regulation der verschiedenen extrazellulären Enzyme bei *Bacillus* verantwortlich sind, sind bis heute noch unvollständig geklärt. Zum Teil lassen sich spezielle, auf das jeweilige Enzym zugeschnittene Regulationsmechanismen beobachten (z.B. die Induktion der Penicillinase durch Benzylpenicillin (Imsande, 1970) oder andere Penicillin-Derivate), zum Teil scheinen aber auch übergreifende Mechanismen zu existieren, die die Synthese mehrerer Exoenzyme gleichzeitig regulieren (Sippola, 1981).

Tatsächlich kommen die meisten der oben genannten Regulationsmechanismen auch bei der Regulation der extrazellulären Enzyme vor:

Induktion:

Viele extrazelluläre Enzyme benötigen zur Synthese einen Induktor. Klassische induzierbare Enzyme werden in Abwesenheit eines Induktors nur auf einem kaum meßbaren Grundlevel synthetisiert (Priest, 1983). Bei den extrazellulären Enzymen, deren Polymersubstrate zu groß sind, um innerhalb der Zelle als Induktor wirken zu können, bewirkt diese immer vorhandene Grundaktivität einen ersten Abbau des Substrates zu niedermolekularen Komponenten, die dann in die Zelle gelangen und dort als Induktor für eine verstärkte Synthese des Exoenzyms sorgen. So wird z.B. die α -Amylase-Produktion durch *Bacillus stearothermophilus* durch Maltoligomere, besonders Maltotetraose, induziert (Welker & Campbell, 1963).

Der Grundlevel der Enzymproduktion in Abwesenheit des Induktors kann je nach Organismus und Enzym erheblich variieren, so daß man bei manchen Enzymen schon von "teilweise konstitutiv" sprechen kann. So produziert z.B. *Bacillus megaterium* unabhängig von der C-Quelle β -Amylase nahezu konstitutiv. Durch Wachstum auf α -1,4-Glucan kann die Synthese jedoch zu noch höheren Mengen "induziert" werden (Priest, 1983).

Wirklich konstitutive Enzyme werden in Anwesenheit wie in Abwesenheit des Enzymsubstrates oder eines Derivats desselben mit der gleichen maximalen Rate gebildet. Hierzu gehören z.B. die α -Amylasen von *Bacillus amyloliquefaciens* (Coleman, 1967), *Bacillus licheniformis* (Meers, 1972; Thirunavukkarasu & Priest, 1980) und *Bacillus subtilis* (Sekiguchi & Okada, 1972).

Endprodukt-Repression:

Dieser Regulationsmechanismus, dem sonst nur Enzyme des anabolischen Stoffwechsels unterliegen (Grunow, 1981), spielt vor allem eine Rolle bei der Proteasesynthese, die durch Ammonium, einzelne Aminosäuren oder durch Oligopeptide reprimiert wird. So wird z. B. die extrazelluläre Protease von *Bacillus megaterium* mit steigender Aminosäurekonzentration im Medium zunehmend reprimiert (Moravkova & Chaloupka, 1984)

Katabolit-Repression:

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, verursacht das Wachstum auf einer schnell metabolisierbaren C-Quelle eine Katabolit-Repression der Synthese vieler induzierbarer oder konstitutiver katabolischer Enzyme. So unterliegt auch die Synthese der meisten extrazellulären Enzyme einer Katabolit-Repression. Beispiele sind α -Amylase (Meers, 1972; Priest & Thirunavukkarasu, 1985) und Protease (Laishley & Bernlohr, 1968) von *Bacillus licheniformis*, die durch Anwesenheit von Glucose oder Mannit völlig reprimiert sind, sowie die α -Amylase von *Bacillus amyloliquefaciens*, die ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, durch Glucose reprimiert wird (Ingle & Boyer, 1976). Coleman (1966) konnte zeigen, daß die Syntheserate der α -Amylase bei *Bacillus subtilis* umgekehrt proportional zu der von der C-Quelle ermöglichten Wachstumsrate ist.

Für die Synthese von Proteasen konnte bei verschiedenen *Bacillus*-Arten eine doppelte Regelung aus Endprodukt-Repression und Katabolit-Repression nachgewiesen werden (z.B. Egorov et al., 1983; Hanlon et al., 1982; Chaloupka, 1985). Dabei wird die Protease-Synthese initiiert, wenn wichtige Nährstoffe im Medium (C-Quelle oder Nährsalze) verbraucht sind, die Synthese wird jedoch reprimiert, wenn die Konzentration von Stickstoff-Metaboliten (z.B. Aminosäuren) aufgrund der Wirkung der Protease ansteigt.

Die Regulation verschiedener extrazellulärer Enzyme (z.B. Proteasen und Ribonucleasen) steht offensichtlich auch in einem engen Zusammenhang mit dem Sporulationsprozeß sporogener *Bacillus*arten (James & Mandelstam, 1985; Shimizu et al., 1983; Chaloupka et al., 1982; Dancer & Mandelstam, 1975; Mandelstam, 1969), der ebenso wie die Exoenzymsynthese am Ende des exponentiellen Wachstums eingeleitet wird, wenn wichtige Komponenten des Nährmediums aufgebraucht sind und sich dadurch die Wachstumsgeschwindigkeit verlangsamt. Schon Schaeffer et al. (1965) berichtet von einer Katabolit-Repression der Sporulation bei *Bacillus subtilis*, von der in gleicher Weise auch die Synthese extrazellulärer Enzyme betroffen ist. Im Gegensatz dazu berichtet Priest (1983), daß bei *Bacillus* die extrazelluläre Protease innerhalb der Zelle nicht vorkommt und mit dem Sporulationsprozeß daher nichts zu tun hat.

Die Mechanismen und Effektoren, die die Katabolit-Repression der Exoenzymsynthese im einzelnen steuern, sind bei *Bacillus* (im Gegensatz zu *E. coli*) noch weitgehend unbekannt. So konnte die für die Katabolit-Repression bei *E. coli* zentrale Substanz c-AMP in Zellen der Gattung *Bacillus* bisher nicht nachgewiesen werden (Priest, 1977). Berichte über einen Zusammenhang zwischen den intrazellulären Konzentrationen an Guanin und c-GMP einerseits und der Sporenbildung und Proteasesynthese andererseits (Egorov et al., 1982; Lopez et al., 1979) oder von einem regulativen Effekt der intrazellulären Glutamin Synthetase-Konzentration auf die Einleitung des Sporulationsprozesses bei *Bacillus polymyxa* (Kantengwa & Ohia, 1985) bestätigen immerhin die Annahme, daß auch im Stoffwechsel von *Bacillus* Metabolite des Stickstoff- oder Energiestoffwechsels existieren, die als Schlüsselsubstanzen der Katabolit-Repression analog zum c-AMP in *E. coli* fungieren.

2.2.3. Auswirkung der Regulationsmechanismen auf die Enzyymbildung in der Fermentation

Das Organismenwachstum in der Batch-Kultur kann grundsätzlich in eine Phase exponentiellen Wachstums (Trophophase) und eine Übergangs- bzw. stationäre Phase (Idiophase) unterteilt werden (vergl. Abschnitt 2.1.1). Die Synthese extrazellulärer Enzyme ist dabei entweder an die Trophophase oder an die Idiophase gebunden (Priest, 1983), wobei Enzyme, die einer Katabolit-Repression unterliegen, eher zu den Idiophase-Produkten gehören. So findet z. B. die α -Amylase-Produktion bei *Bacillus subtilis* (Sekiguchi & Okada, 1972; Yoneda & Marno, 1975) und bei *Bacillus amyloliquefaciens* (Welker & Campbell, 1967) vornehmlich nach Abschluß des exponentiellen Wachstums statt.

Von großer Bedeutung ist die Frage, ob ein Enzym in der Idio- oder in der Trophophase gebildet wird, d.h. ob es einer Katabolit-Repression unterliegt oder nicht, für die kontinuierliche Kultur. Zumindest bei größeren Durchflußraten in der chemostatischen Kultur (vergl. Figur 3) ist die stationäre Substratkonzentration so hoch, daß eine Katabolit-Repression stattfindet. Dazu kommt, daß die chemostatische und mehr noch die turbidostatische Kultur den Organismen ein dauerhaftes Verweilen in einem exponentiellen Wachstum (konstante Wachstumsrate) ermöglicht. Priest (1983) kommt daher zu dem Schluß, daß es unmöglich ist, Exoenzyme, die Idiophase-Produkte sind, in chemostatischer Kultur mit konstanter Ausbeute zu gewinnen. So wird auch von Heineken & O'Connor (1972) berichtet, daß die Sekretion extrazellulärer Enzyme bei *Bacillus amyloliquefaciens* nach anfänglichem Batch-Wachstum hoch ist, während des chemostatischen Betriebs jedoch nachläßt und schließlich ganz zurückgeht. Als Konsequenz wird i.a. versucht, die Katabolit-Repression durch die Limitierung eines Mediumbestandteils aufzuheben, was in der

kontinuierlichen Fermentation jedoch meist nur bei sehr geringen Durchflußraten gelingt (Frankena et al. 1986).

2.3. *Bacillus* und sein Stoffwechsel

Die Gattung *Bacillus* repräsentiert eine Gruppe verschiedener stäbchenförmiger Bakterien, die in der Lage sind Endosporen zu bilden (Bulla & Hoch, 1985). Gegenüber den vegetativen Zellen sind die Sporen resistenter gegenüber Hitze und Trockenheit und ermöglichen den Bacillen dadurch ein Überleben auch über längere Perioden mit ungünstigen Bedingungen.

Die Art *Bacillus amyloliquefaciens* wurde ursprünglich für eine Variante der Art *Bacillus subtilis* gehalten. Welker & Campbell (1967) konnten jedoch anhand der Basenkomposition der DNA zeigen, daß es sich um zwei verschiedene Arten handeln muß. In den meisten anderen charakteristischen Eigenschaften entsprechen sich dagegen die Zellen der beiden Arten weitgehend.

Die meisten Bacillen sind gram-positiv und durch laterale oder peritriche Begeißelung beweglich. Die Größe der Zellen variiert zwischen $0.3 \times 1.2 \mu\text{m}$ und $2.2 \times 7.0 \mu\text{m}$ (Buchanan & Gibbons, 1974). Meistens liegen die Zellen einzeln vor, einige Arten bilden jedoch auch Ketten. Bis auf einige thermophile Arten sind die Bacillen mesophil und bevorzugen Temperaturen zwischen 30 und 45 °C.

Der natürliche Lebensraum der meisten *Bacillus*-Arten ist der Erdboden, wo sie als Saprophyten mit Hilfe einer Reihe extrazellulärer Enzyme von den organischen Resten toter Lebewesen leben (Krieg, 1981). Ihr Stoffwechsel ist chemoheterotroph und erlaubt strikte Veratmung, strikte Vergärung oder auch gemischte Veratmung und Vergärung der organischen Substrate (Bulla & Hoch, 1985). Als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette wirkt molekularer Sauerstoff, lediglich bei einigen Arten kann er durch Nitrat-Sauerstoff ersetzt werden (Buchanan & Gibbons, 1974). Glucose wird in erster Linie über den EMP-Weg zu Pyruvat umgesetzt.

Das Pyruvat wird jedoch auch unter aeroben Verhältnissen nicht überwiegend veratmet, ein erheblicher Teil wird stattdessen zu Acetat, Acetoin und verschiedenen weiteren Produkten umgesetzt (Wood, 1961). Einen Überblick über mögliche Stoffwechselwege zur Acetoin- und Butandiolbildung (durchgezogene Linien) sowie der Bildung weiterer Gärungsprodukte (gestrichelte Linien) zeigt Figur 7. Bei *Bacillus subtilis* erfolgt die Acetoinbildung nach dem Schema (Doelle, 1975; dicke Linie in Fig. 7):



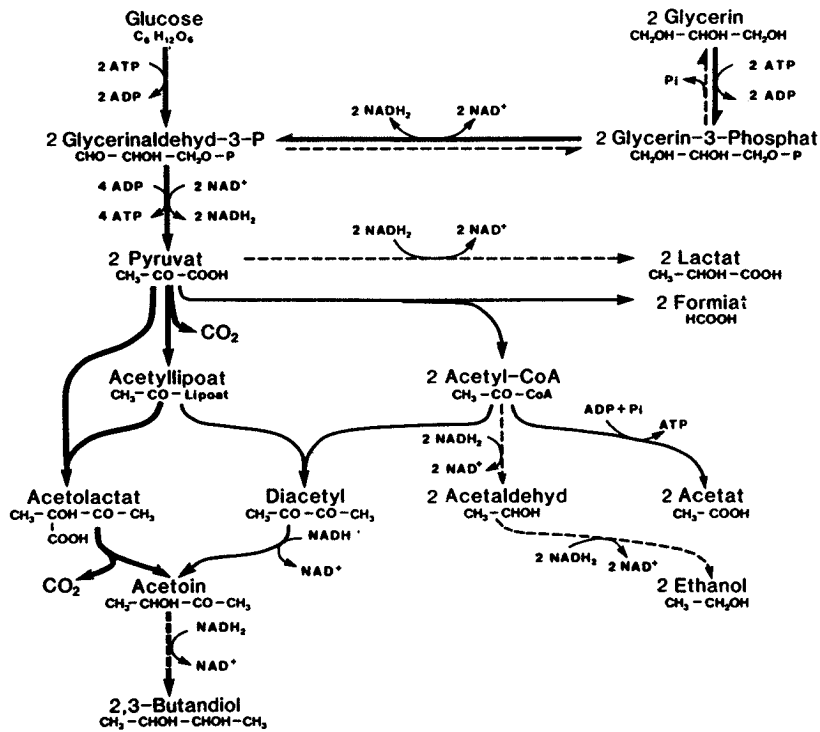
Dabei wird Pyruvat zunächst unter CO_2 -Abspaltung durch die Wirkung eines Teils des Pyruvat-Dehydrogenase-Systems zu Acetylipoat umgesetzt, das dann mit einem zweiten Molekül Pyruvat unter Lipoat-Freisetzung zu Acetolactat reagiert. Durch die Wirkung der Acetolactat-Decarboxylase wird Acetolactat unter CO_2 -Freisetzung zu Acetoin umgesetzt.

Unter anaeroben Bedingungen reduziert *Bacillus* das Acetoin mit Hilfe der Butandiol-Dehydrogenase zu 2,3-Butandiol. Bei dieser Reaktion kann während der Glycolyse entstandenes $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu NAD^+ regeneriert werden (Doelle, 1975):



Da hier aber pro mol Pyruvat nur $\frac{1}{2}$ mol NADH regeneriert werden kann, während in der Glycolyse pro mol Pyruvat 1 mol NADH entsteht, scheidet *Bacillus* unter anaeroben Bedingungen weitere Gärungsprodukte wie Ethanol und Glycerin aus. So erwähnt Wood (1961), daß *Bacillus subtilis* beim anaeroben Wachstum aus 100 mmol Glucose 54.6 mmol 2,3-Butandiol, 56.8 mmol Glycerin, 17.6 mmol Lactat, 7.7 mmol Ethanol, 117 mmol CO_2 und Spuren von Acetat, Acetoin, Formiat, Succinat und molekularem Wasserstoff produziert.

Die Butandiol-Bildung ist allerdings stark pH-abhängig (Doelle, 1975). Bei pH-Werten über pH 6.3 ist die Produktion von Acetoin und Butandiol unterdrückt, während sich Acetat und Formiat anreichern. Bei pH-Werten unter pH 6.3 schaltet der Stoffwechsel dagegen auf Acetoin- und Butandiolbildung um.



Figur 7: Zusammenstellung möglicher Stoffwechselwege zum Glucose- bzw. Glycerinabbau

Bildung von Acetoin, Acetat und Formiat unter aeroben Bedingungen (durchgezogene Linien) sowie 2,3-Butandiol, Lactat, Ethanol und Glycerin unter anaeroben Bedingungen (gestrichelte Linien)

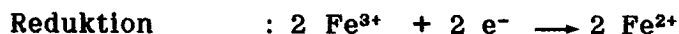
2.4. Redoxpotential und Sauerstoffpartialdruck

2.4.1. Redoxpotential:

Unter Oxidation versteht man einen Prozeß, in dem eine Substanz Elektronen abgibt, Reduktion ist umgekehrt ein Prozeß, in dem eine Substanz Elektronen aufnimmt.

Genauso wie Säure/Base-Reaktionen sind Oxidations- und Reduktionsreaktionen immer in komplementärer Weise miteinander verkoppelt, so daß die eine Reaktion genau so viele Elektronen abgibt, wie die andere Reaktion Elektronen verbraucht. Solche gleichzeitigen, komplementären Oxidations- und Reduktionsprozesse werden als Redox-Reaktionen bezeichnet.

Beispiel: Oxidation von Jodid durch Fe^{3+} :



Jede der beiden Substanzen Fe und J bilden also ein Redoxsystem:



Ein weiteres, vor allem in belüfteten Fermentationen wichtiges Redoxsystem ist das System $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$:



Die Stärke, mit der eine Substanz Elektronen anzieht oder abgibt (das heißt, die Frage, ob eine Substanz eine starke oder schwache reduzierende oder oxidierende Wirkung hat), kann mit einer Elektrode aus inertem Metall, z.B. Gold oder Platin, gemessen werden (Bühler, 1985)

Wird eine solche Meßelektrode in eine Lösung getaucht, in der sich ein Redoxsystem befindet, so übt die oxidierte Form der Substanz eine Elektronen-"Saugwirkung" auf die Elektrode aus, mit der Wirkung, daß das Elektrodenpotential positiver wird. Die reduzierte Form der Substanz übt dagegen einen Elektronen-"Druck" auf die Elektrode aus, mit der Wirkung, daß das Elektrodenpotential negativer wird. Das resultierende Elektrodenpotential ergibt sich aus der Differenz aus Elektronen-"Druck" und -"Saugwirkung".

Um dieses Potential der Meßelektrode meßbar zu machen, wird es mit dem konstanten Potential einer Referenz- oder Bezugselektrode verglichen. Die

Differenz dieser beiden Potentiale wird als das Redoxpotential E (mV) bezeichnet. Die Abhängigkeit des Redoxpotentials vom Verhältnis der Aktivität der oxidierten Form (A_{ox}) zur Aktivität der reduzierten Form (A_{red}) des bezogenen Redoxpaares läßt sich mit der Nernst-Gleichung beschreiben:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{A_{ox}}{A_{red}} \quad [\text{mV}] \quad (\text{Gl. 21})$$

mit E = gemessenes Redoxpotential (mV)

E_0 = Redoxpotential (mV) bei 25 °C und $A_{ox} = A_{red} = 1$ molar

R = allgemeine Gaskonstante (0.08314 l·bar/(K·mol))

n = Anzahl der beteiligten Elektronen (-)

F = Ladung (1 Faraday = 96487 C·mol⁻¹)

T = Temperatur (K)

Die Referenzelektrode, auf die sich letztendlich alle Redox-Meßwerte beziehen, ist die Standard-Wasserstoff-Elektrode (SWE). Sie besteht aus einer platinieren Platinelektrode, die in eine 1-normale Lösung von H⁺-Ionen getaucht ist (pH= 0) und von Wasserstoffgas umströmt wird. Gemessen wird also das Redoxpaar H₂/H⁺. Das Potential der Oxidationsreaktion $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ wurde dabei per Definition für alle Temperaturen auf 0 mV festgesetzt.

In der Praxis werden jedoch meist andere Bezugselektroden eingesetzt, die leichter zu handhaben sind. Diese haben bekannte Standardpotentiale gegenüber der SWE und lassen sich leicht umrechnen:

$$E_h = E + E_{ref} \quad [\text{mV}] \quad (\text{Gl. 22})$$

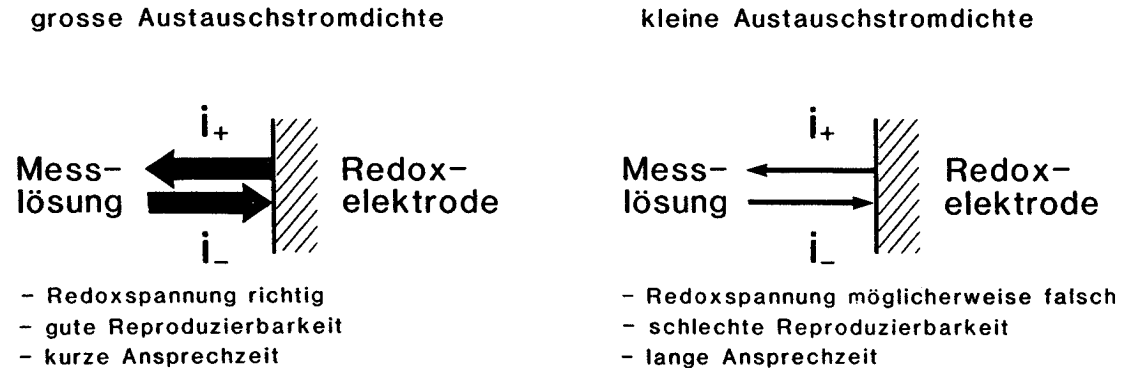
mit E_h = Redoxpotential gegenüber der SWE (mV)

E = gemessenes Redoxpotential (mV)

E_{ref} = Standardpotential der Bezugselektrode (mV)

Die gebräuchlichsten Bezugselektroden sind die Hg/Kalomel-Elektrode und die Ag/AgCl-Elektrode. Die Standardpotentiale solcher Bezugselektroden gegenüber der SWE sind von Temperatur und pH-Wert, bei denen gemessen wird, abhängig. Diese müssen daher mit den Redox-Meßwerten angegeben werden. Bei 37°C beträgt das Standardpotential der Hg/Kalomel-Bezugselektrode beispielsweise 236.3 mV, das der Ag/AgCl-Bezugselektrode 198.3 mV (Bioengineering).

Verschiedene Redox-Paare können eine unterschiedliche Wirkung gegenüber der Redoxelektrode haben. Diese Wechselwirkung zwischen Redox-Paar und Redoxelektrode wird durch die Austauschstromdichte i (A/cm^2) charakterisiert (Figur 8). Im Gleichgewichtszustand sind die beiden Ströme i_+ und i_- gleich groß.



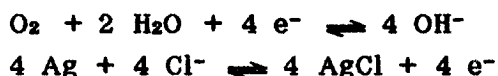
Figur 8: Einfluß der Austauschstromdichte zwischen Redoxelektrode und der Meßlösung

Die Austauschstromdichte ist stark abhängig vom Elektrodenmaterial, dem Redoxsystem und dessen Konzentration in der Meßlösung.

2.3.2. pO_2 -Messung:

Während es sich bei der oben geschilderten Redoxmessung um ein potentiometrisches Meßprinzip handelt, bei dem die Potentialdifferenz zwischen Meß- und Bezugs- elektrode nahezu stromlos gemessen werden kann, wird bei der Sauerstoffelektrode eine Stromstärke gemessen, es handelt sich also um ein amperometrisches Meßprinzip.

Die Sauerstoffelektrode besteht aus einer Platinkathode und einer Silberanode, die durch einen Cl^- -haltigen Elektrolyten elektrisch leitend verbunden sind. Durch eine geeignete Polarisationsspannung zwischen den beiden Polen wird der Sauerstoff selektiv an der Kathode reduziert:



Der aus diesen chemischen Reaktionen resultierende elektrische Strom ist dem Sauerstoffpartialdruck proportional.

Heutzutage werden vorzugsweise Sauerstoffelektroden mit einer gasdurchlässigen Membran (Clark-Prinzip) verwendet. Diese Elektroden haben den

Vorteil, daß sie sowohl zur Messung des Sauerstoffgehalts in Lösung, als auch in der Gasphase fähig sind, und daß durch die Membran die Gefahr einer gegenseitigen Vergiftung von Elektrode und Meßraum verhindert wird (Ingold).

Wie bereits erwähnt, ist der Meßwert vom Sauerstoffpartialdruck (bar), nicht dagegen von der Sauerstoffkonzentration (mmol/l oder mg/l) abhängig. Bei Messungen in Flüssigkeiten ist die absolute Sauerstoffkonzentration von der Temperatur und der Konzentration gelöster Substanzen abhängig, während der Sauerstoffpartialdruck davon unbeeinflusst bleibt. So lösen sich bei gleichem Sauerstoffpartialdruck (0.21 bar) in Wasser mit einer Temperatur von 20 °C ca. 9.2 mg/l Sauerstoff, bei 37 °C dagegen nur ca. 7 mg/l Sauerstoff (Ingold).

Zur Angabe der Sauerstoffkonzentration muß daher der Sauerstofflöslichkeitskoeffizient bekannt sein. Da dieser nur umständlich bestimmt werden kann, wird meist auf eine Angabe der Konzentration (mmol/l) verzichtet und entweder der Partialdruck (bar) oder der prozentuale Anteil der unter den Meßbedingungen erreichbaren Sauerstoffsättigung (%) angegeben. In beiden Fällen müssen sowohl Druck als auch Temperatur, die bei der Messung herrschen, berücksichtigt werden. So berechnet sich der Sauerstoffpartialdruck (bar) bei Begasung mit Luft (O₂-Anteil 20.9%):

$$p_{O_2} [\text{bar}] = (P_B + P_U + P_{\text{Lös}}) \cdot y_{O_2}^a \quad (\text{Gl. 23})$$

mit P_B = Barometerdruck (bar)

P_U = Überdruck (bar)

$P_{\text{Lös}}$ = Wasserdampfpartialdruck (bar) (aus Tabellen)

$y_{O_2}^a$ = prozentualer Anteil des Sauerstoffs in der Zuluft

2.3.3. p_{O_2} und Redoxpotential im biologischen System:

Während mit der Sauerstoffelektrode eindeutig der Partialdruck des in der Mikroorganismen-Kulturbrühe gelösten Sauerstoffs gemessen wird, läßt sich für den Meßwert der Redoxelektrode i.a. keine so eindeutige Aussage machen. Das liegt zum einen daran, daß in der Kulturbrühe neben dem System O₂/H₂O eine Vielzahl weiterer Redoxsysteme vorliegt. Zum anderen entsprechen die gemessenen Redoxspannungen oft nicht den thermodynamischen Werten, da die Austauschstromdichte i_0 der in der Fermentationsbrühe vorkommenden Redoxsysteme außerordentlich unterschiedlich sein können (Bühler, 1985). Bei der meist verwendeten Platinelektrode ist die Austauschstromdichte für einfache Redoxsysteme (J⁻/J₂, Fe²⁺/Fe³⁺, aber auch O₂/H₂O) groß, wogegen es bei den meisten organischen Redoxsystemen sehr klein ist.

Der Verlauf der Redoxkurve in belüfteten Fermentationen ist daher meist besonders stark vom Gehalt der Lösung an Sauerstoff bestimmt. Sie verläuft ähnlich zu der mit der Clark'schen Sauerstoffelektrode aufgenommenen Kurve und läßt daher gut den Versorgungszustand der Kultur mit Sauerstoff erkennen (Kjaergaard & Joergensen, 1980). Auch Änderungen des Stoffwechsels oder die Aufnahme oder Ausscheidung von Stoffen führt zu typischen Veränderungen des Redoxpotentials. So ist z.B. der Übergang vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel mit einer deutlichen Änderung des Redoxsignals verbunden, weshalb die Redoxelektrode z.B. auch gut geeignet ist, den für die Organismen kritischen Sauerstoffpartialdruck zu bestimmen (Jacob, 1970).

2.5. Xylan und Xylanolytische Enzyme

2.5.1. Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Cellulosen, Hemicellulosen und Lignin bilden die Hauptkomponenten der pflanzlichen Zellwand, die aufgrund ihrer Stützfunktion einen großen Anteil am Trockengewicht der Zellen hat. Große Teile der pflanzlichen Biomasse (Holz, Stroh, Samenschalen) bestehen sogar überwiegend aus diesen Komponenten der Zellwand. Die Anteile sind dabei bei unterschiedlichen Pflanzenarten verschieden (Tabelle 1, nach Kubicek, 1983).

Material	Hemicellulosen %	Cellulose %	Lignin %
Gräser			
Stiele	25 ÷ 50	25 ÷ 40	10 ÷ 30
Blätter	80 ÷ 85	15 ÷ 20	-
Fasern	5 ÷ 20	80 ÷ 95	-
Gehölze			
Laubhölzer	24 ÷ 40	40 ÷ 55	18 ÷ 25
Nadelhölzer	25 ÷ 35	45 ÷ 50	25 ÷ 35

Tabelle 1: Prozentuale Trockengewichtsanteile der Zellwandkomponenten bei verschiedenen Pflanzenarten

Nadelholz besteht zu 90 bis 95% aus Faserzellen, die miteinander verzahnt und durch eine Mittellamelle verbunden sind. In den Zellwänden ist die Cellulose dabei praktisch immer der Hauptbestandteil (Fengel, 1970). Ihr molekularer Aufbau ist vergleichsweise einfach, sie besteht aus langen Ketten von Glucosemolekülen, die β -1,4-glycosidisch miteinander verbunden sind. Die Kettenlänge beträgt im Holz ziemlich einheitlich 10000 bis 14000 Glucoseeinheiten, die Ketten sind unverzweigt und zu langen Fibrillen gebündelt.

Lignin ist ein stark vernetztes Polymer aus Guajacyl-Einheiten (Phenylpropangruppen mit Methoxy- und Hydroxylgruppen), das quasi als Klebstoff die Cellulosefasern zusammenhält (Fengel, 1970).

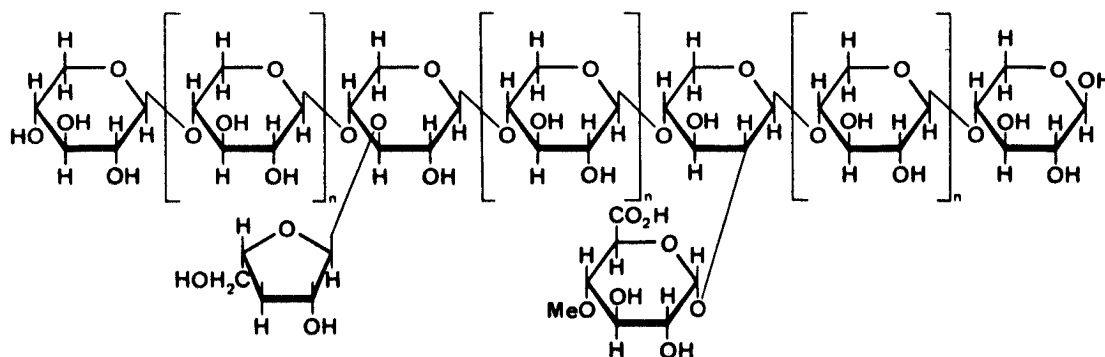
Unter dem Begriff Hemicellulosen oder Polyosen wird eine Gruppe von heterogenen Polysacchariden zusammengefaßt. Von der Cellulose unterscheiden sich die Hemicellulosen dadurch, daß andere Zuckereinheiten beteiligt sind, daß sie Seitengruppen haben und auch verzweigt sein

können (Fengel, 1970). Zudem sind sie deutlich kürzer als die Cellulosemoleküle. Die wichtigsten Vertreter der Hemicellulosen sind neben den Mannanen, Glucanen und Pektinen die Xylane.

Die Hauptkette der Xylane ist ausschließlich aus β -1,4-glycosidisch verknüpften Xyloseeinheiten aufgebaut, unverzweigt und nur ca. 25 bis 150 Einheiten lang (Aspinall, 1959 u. 1980). Bezüglich der Seitengruppen unterscheiden sich die Xylane der Gymnospermen (Nacktsamer, vornehmlich Nadelhölzer) von den Xylanen der Angiospermen (Bedecktsamer, Laubhölzer und Gräser) (Tabelle 2, nach Aspinall, 1980):

Pflanzenart	Seitengruppe	subst. Xylose %
Gymnospermen:	(4-o-methyl)- α -D-Glucuronsäure α -L-Arabinose	14 ÷ 18 ≤ 8
Angiospermen: Gräser :	(4-o-methyl)- α -D-Glucuronsäure	10
Laubhölzer:	(4-o-methyl)- α -D-Glucuronsäure o-Acetyl	10 ≤ 90

Tabelle 2: Seitenketten des Xylanmoleküls bei verschiedenen Pflanzenarten und prozentualer Anteil der substituierten Xylosemoleküle in der Hauptkette.



Figur 9: Ausschnitt aus einem Xylanmolekül mit Arabinose- und 4-o-Methylglucuronsäure-Seitengruppen

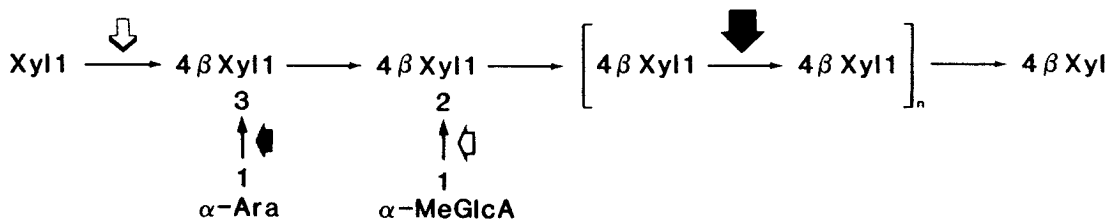
Der hohe Prozentsatz acetylierter Xyloseeinheiten im Laubholzxylan ist verantwortlich für den charakteristischen Essiggeruch frisch geschlagener Laubbäume. Eine Besonderheit ist das Xylan aus dem Espartogras, das keine Seitengruppen an der Hauptkette trägt und damit ein reines D-Xylan darstellt (Whistler & Richards, 1970).

Als typisches Beispiel für den Aufbau des Xylanmoleküls zeigt Figur 9 die Strukturformel eines Arabino-4-o-methylglucuronoxylans, wie es in Nadelhölzern vorkommt (Timell, 1965).





2.5.2. Enzymatische Xylanhydrolyse

Da Xylane aufgrund der verschiedenen Seitengruppen und des teilweise verzweigten Aufbaus einen viel größeren Variationsreichtum zeigen, als z.B. Cellulose oder Stärke, ist die Anzahl der von den Mikroorganismen produzierten xylanolytischen Enzyme größer, als die der Cellulasen oder Amylasen (Reilly, 1981).

Eine Auswahl der verschiedenen Enzyme, die beim Abbau des Xylanmoleküls beteiligt sind, sind in Figur 10 eingezeichnet (nach Biely, 1985). Neben der β -Xylosidase, die vom nicht reduzierenden Ende des Xylanmoleküls einzelne Xyloseeinheiten (X_1) abspaltet und neben speziellen Enzymen, die die verschiedenen Seitengruppen des Xylanmoleküls abspalten können, sind die Endo-Xylanasen die wichtigsten und häufigsten xylanolytischen Enzyme in der Natur (Reilly, 1981).



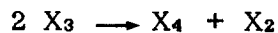
α -Ara = α -L-Arabinofuranosid
 β -Xyl = β -D-Xylanopyranosid
 α -MeGlcA = 4-O-Methyl- α -D-Glucuronsäure

 Endo-1,4- β -Xylanase (EC 3.2.1.8)
 β -Xylosidase (EC 3.2.1.37)
 α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)
 α -Glucuronidase (EC 3.2.1.)

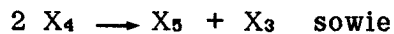
Figur 10: Einwirkung verschiedener xylanolytischer Enzyme auf das Xylanmolekül

Die Endo-Xylanasen spalten das Xylanmolekül in dessen Zentrum und werden von Reilly (1981) weiter unterschieden nach solchen Enzymen, die Xylose oder Xylobiose als Endprodukte freisetzen, und solchen Enzymen, deren Endprodukte größer als Xylobioseeinheiten sind. Ähnlich wie bei verschiedenen cellulolytischen Enzymen (Schmid, 1986; Biselli, 1986) lassen sich auch bei den xylanolytischen Enzymen rege Transferaktivitäten beobachten, bei denen länger-kettige Moleküle nicht nur in kürzere Einheiten gespalten werden, sondern auch aus kürzeren Einheiten aufgebaut werden können (Frederick et. al., 1985).

Diese Eigenschaften zeigen auch die Xylanasen verschiedener Bacillus-Stämme. So berichten Panbangred et.al. (1983) von einer gereinigten Endo-Xylanase aus *Bacillus pumilis*, die bei der Hydrolyse von Lärchenholz-Xylan zunächst größere Xylooligomere und schließlich als Endprodukte Xylobiose (X_2), Xylotriase (X_3) und Xylo-tetraose (X_4), nicht jedoch Xylose, freisetzte. Die Transfereigenschaften konnten durch die Verwendung von Xylooligomeren (X_2 bis X_4) als Enzymsubstrate gezeigt werden. Dabei wurde Xylobiose gar nicht, Xylotriase jedoch nach dem Schema:



und Xylo-tetraose nach dem Schema:



umgesetzt. Gemeinsam angebotene Xylose (X_1) wurde dabei in keinem Fall in die Transferaktivitäten einbezogen.

3. APPARATIVER AUFBAU

3.1. Fermenter

Die Fermentationsversuche wurden in Laborfermentern vom Typ "Biostat E" der Firma B.Braun Melsungen durchgeführt.

Die komplette Fermentationseinheit besteht im einfachsten Fall aus dem Fermenter-Grundgerät und dem Kulturgefäß, das auf der Konsole des Grundgerätes steht. Zur optimalen Durchführung kontinuierlicher Fermentationen dienen zusätzlich Voratsgefäße und eine geregelte Dosieranlage für das Nährmedium, eine Füllstandsregelung, die für ein konstantes Flüssigkeitsvolumen im Kulturgefäß sorgt, sowie ein kleiner externer Kreislauf, in dem Kulturflüssigkeit durch eine Photometerküvette gepumpt wird, um ein kontinuierliches Signal für die optische Dichte der Kultur zu erhalten.

Ein Photo der Fermenteranlage zeigt Abbildung 11. Einen Überblick über die Anlage geben Figur 12 und Tabelle 3.

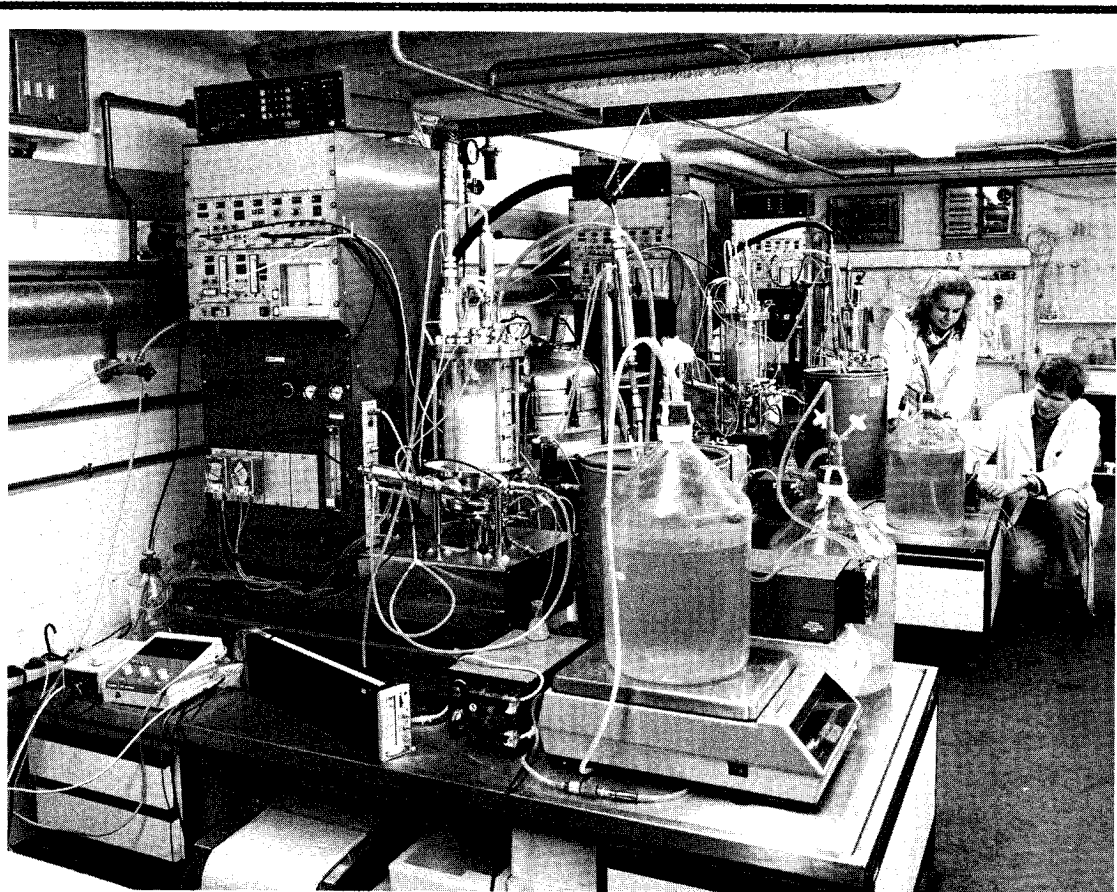
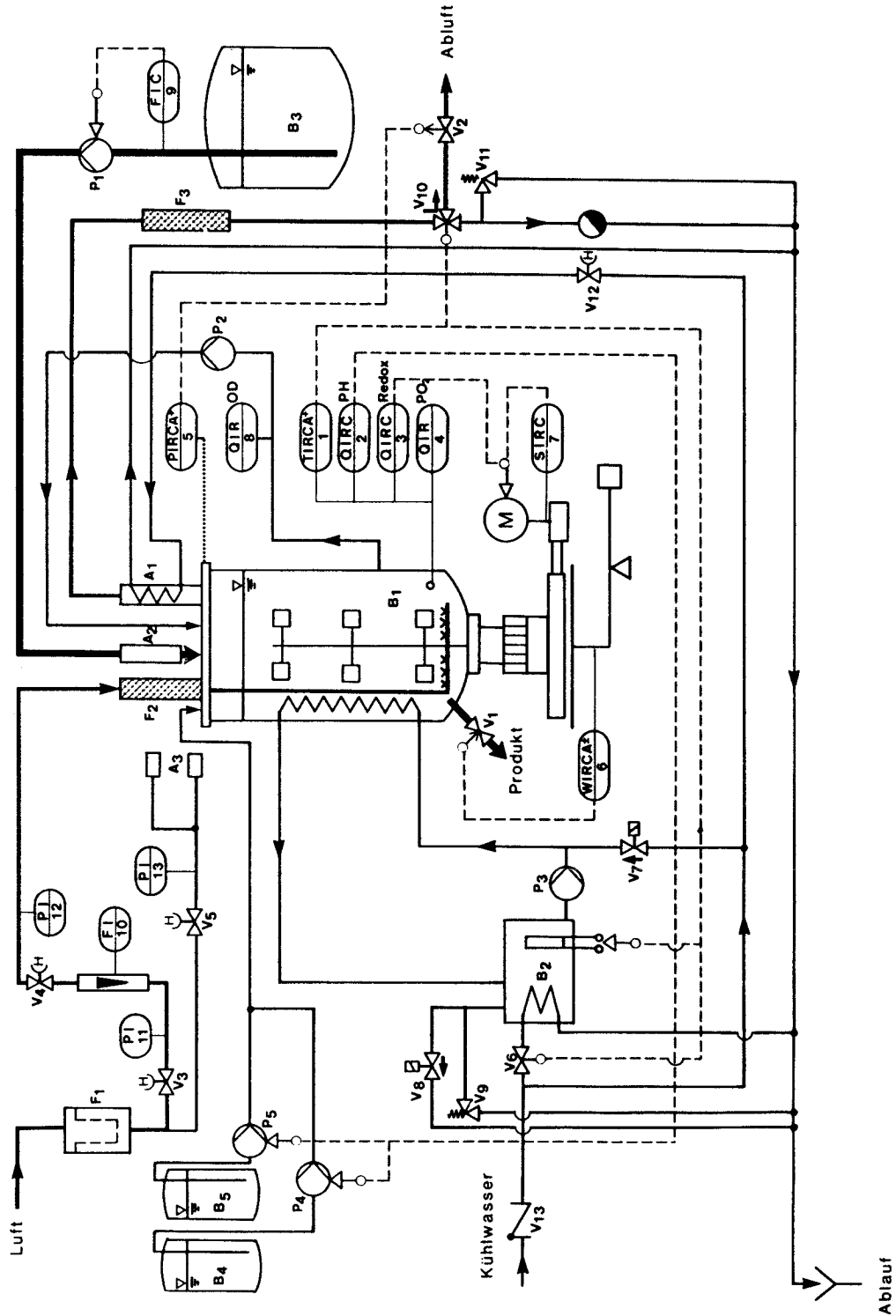


Abbildung 11: Photographische Ansicht der Versuchsanlage



Figur 12: Fließbild der Fermentationsanlage mit Meß- und Regelstellen

a.) Meßstellenliste

TIRCA	1	Messung und Regelung der Temperatur des Kulturmediums, Alarm bei Grenzwertüberschreitung
QIRC	2	Messung und Regelung des pH-Werts des Kulturmediums
QIRC	3	Messung und Regelung des Redoxpotentials des Kulturmediums
QIR	4	Messung des pO_2 im Kulturmedium
PIRCA	5	Messung und Regelung des Reaktor-Innendrucks, Alarm bei Überschreiten von oberem Grenzwert
WIRCA	6	Messung und Regelung des Reaktor-Füllstands, Alarm bei Grenzwert-Über- und Unterschreitung
SIRC	7	Messung und Regelung der Rührerdrehzahl
QIR	8	kontinuierliche Messung der optischen Dichte der Kulturflüssigkeit im By-Pass
FIC	9	Regelung der Förderleistung der Nährmediumpumpe
FI	10	Messung des Zuluftstroms (Schwebekörper)
PI	11	Messung des Drucks in Zuluftleitung nach Reduzierventil V3
PI	12	Messung des Drucks in Zuluftleitung vor Eintritt in den Fermenter
PI	13	Messung des Überlagerungsdrucks der pH- und Redoxelektrode

b.) Gerätelliste
Behältnisse

B1	Kulturgefäß mit Rührer, Belüftung und Wärmetauscher
B2	Thermostatentopf mit Heizstab und Kühlschlange
B3	Medium-Voratsgefäß
B4,B5	Vorlagegefäße für Korrektive (Säure und Lauge)

Pumpen

P1	geregelt Dosierpumpe (Schlauchpumpe) zur Substratförderung, angesteuert durch FIC 9
P2	Kreislaufpumpe für kont. OD-Messung
P3	Kreislaufpumpe des Thermostatensystems
P4,P5	Dosierpumpe für Korrektive, angesteuert durch QIRC 2

Ventile

V1	Bodenablaßventil, angesteuert durch WIRCA 6
V2	Membran-Stellventil zur Innendruckregelung, angesteuert durch PIRCA 5
V3	Reduzierventil in der Zuluftleitung, Handstellung
V4	Nadel-Stellventil zur Handeinstellung des Zuluftstroms
V5	Reduzierventil für Elektroden-Drucküberlagerung, Handstellung
V6	Magnetventil zur Gegenkühlung des Thermostatensystems, angesteuert durch TIRCA 1
V7	Magnetventil zum Auffüllen des Thermostatensystems, Handschaltung
V8	Magnetventil zum Entlüften des Thermostatensystems, Handschaltung gemeinsam mit V7

- V9 Sicherheitsventil im Thermostatensystem, öffnet bei 2.5 bar Überdruck
- V10 Dreiwege-Magnetventil, schaltet bei 97°C, angesteuert durch TIRCA 1
- V11 Sicherheitsventil bei Sterilisation, öffnet bei 1.3 bar Überdruck
- V12 Stellventil für Kühlwasserstrom des Rückflußkühlers A1, Handstellung
- V13 Rückschlagventil in Kühlwasserleitung

Filter

- F1 Zuluft-Feinfilter (Glasfaser-Tiefenfilter)
- F2 Zuluft-Sterilfilter (Keramik-Tiefenfilter)
- F3 Abluft-Sterilfilter (Keramik-Tiefenfilter)

Sonstiges

- A1 Abluft-Rückflußkühler
- A2 Thermofalle, elektrisch geheizt
- A3 Luftanschlüsse für Drucküberlagerung von pH- und Redoxelektrode

Tabelle 3: Geräte- und Meßstellenliste der Versuchsanlage

3.1.1. Fermentergrundgerät

Das Grundgerät enthält den Rührmotor, die komplette Installation für die Temperierung, Sterilisation und Belüftung, sowie, räumlich getrennt, das Meß-, Regel- und Registriersystem. Der Anschluß der Sonden erfolgt direkt an der Fronttafel der jeweiligen 19 Zoll-Meßeinschübe. Die Registrierung der Prozeßgrößen erfolgt mit einem eingebauten 6-Kanal-Punktdrucker Minicomp TP 6/144 der Firma Hartmann und Braun. Außerdem sind in das Grundgerät die Pumpen für die Korrekturmittel (Säure und Lauge) integriert.

3.1.2. Kulturgefäß

Das Kulturgefäß hat eine Innenhöhe von 350 mm, einen Innendurchmesser von 152 mm und ein maximales Arbeitsvolumen von 5 l. Es ist als Rührkesselreaktor ausgelegt und besteht aus Deckelplatte und halbkugelförmigen Bodenteil aus Edelstahl, sowie einem senkrechten Zylinder aus Borosilikatglas.

Die Deckelplatte enthält die Gewindebohrungen für die Stechanschlüsse, die mit einem Septum und Rundgewinde ausgeführt sind. Über die Stechanschlüsse werden alle Zu- und Ableitungen für Luft, Medien und Korrekturmittel angeschlossen.

In dem halbkugelförmigen Bodenteil befinden sich die Stützen zur Aufnahme aller Elektroden und Meßfühler, sowie zusätzliche Stechanschlüsse,

die unterhalb des Flüssigkeitspiegels liegen und zur Probenahme oder zum kontinuierlichen Abzug von Kulturflüssigkeit verwendet werden können.

Die Rührwelle ist bodenseitig gelagert und mittels einer Gleitringdichtung abgedichtet. Das untere Ende der Rührwelle ist über eine Steckkupplung mit dem Rührerantrieb verbunden. Als Rührorgane dienen auf die Rührwelle montierte Scheibenrührer. Die Funktion der Schikane bzw. des Leitkörpers erfüllt der geometrisch entsprechend ausgebildete, im Bodenteil befestigte Wärmetauscher.

3.1.3. Belüftung

Zur Belüftung dient Druckluft aus der Hausleitung. Die Einstellung der Begasungsrate erfolgt an einem Gasmengen-Durchflußmesser (Prinzip: Schwebekörper, Fa. Krohne) mit Präzisionsnadelventil.

Die Zuluft passiert zunächst einen Vorfilter, der weitgehend Schmutzpartikel sowie wasser- und ölhaltige Substanzen abscheidet. An zwei nachgeschalteten Druckminderern kann der maximale Fermenterbetriebsdruck und der Überlagerungsdruck für Elektroden vorgewählt werden. Über einen Keramik-Sterilfilter gelangt die Luft in ein ringförmiges Begasungsrohr im Bodenbereich des Kulturgefäßes und tritt durch eine Reihe feiner Öffnungen in Form kleiner Blasen in die Kulturbrühe ein.

Durch eine Deckelöffnung verläßt die Abluft das Kulturgefäß, passiert einen Rückflußkühler und eine Schaumfalle und verläßt den Sterilbereich durch einen Abluftfilter. Durch ein Regelventil zur Fermenterinnendruckregelung gelangt die Abluft entweder ins Freie oder wird der Abgasanalytik zugeführt.

3.1.4. Thermostat und Sterilisationsautomatik

Die Temperierung der Kulturflüssigkeit erfolgt indirekt über ein geschlossenes Umlaufthermostatensystem sowie den im Reaktorgefäß eingebauten Wärmetauscher.

Zur Temperaturmessung in der Kulturflüssigkeit dient ein Pt 100-Temperaturfühler, der über einen Stecker mit dem Thermostateinschub im Grundgerät verbunden ist. Die gewünschte Betriebstemperatur wird an einem Digitalschalter des Thermostateinschubs eingestellt oder von einem externen Sollwert vorgegeben.

Der Temperaturregler hat eine PD-PID-Reglerstruktur. Der Ausgang des Reglers steuert entweder über ein Halbleiterrelais die 2400 Watt -Heizung an, oder öffnet über ein Halbleiterrelais ein Ventil des Kühlwasserstroms.

Der Thermostateinschub verfügt über einen Umschalter von der Betriebsart "Fermentation" auf die Betriebsart "Sterilisation". Die Verwendung eines geschlossenen Thermostatsystems sowie die verfügbare Heizleistung von maximal 3600 Watt ermöglicht eine "in situ"-Sterilisation des Kulturgefäßes und der Abluftstrecke.

Der Sterilisationsvorgang wird durch eine Mikroprozessorsteuerung sequenziell gesteuert und umfaßt nacheinander die Aufheizphase, Sterilisationsphase und Abkühlphase.

Alle weiteren Anschlüsse, Gefäße und Medien müssen extern im Autoklaven sterilisiert werden und anschließend über Stechanschlüsse steril mit dem Kulturgefäß verbunden werden.

3.1.5. Drehzahlregelung

Das Rührsystem wird durch einen geregelten Gleichstrommotor angetrieben. Zur Erfassung der Ist-Drehzahl dient ein auf den Motor aufgeflanschter Tachogenerator. Die Rührerdrehzahl wird an einem Digitalschalter eingestellt, bzw. von einem externen Sollwertsignal vorgegeben. Der Ausgang des Drehzahlreglers wirkt auf einen Thyristorsteller, der in Abhängigkeit vom Reglerausgangssignal die Ankerspannung des Motors stetig ändert.

Neben dem Drehzahl-Istwert steht auch der Ankerstrom, der proportional zum Drehmoment (\approx Viskosität) ist, als Meßsignal zur Verfügung.

Mit zwei kalibrierten Potentiometern kann die Rührerdrehzahl auf einen minimalen bzw. maximalen Wert begrenzt werden. Mit diesen Begrenzungen lassen sich z.B. bei der Ansteuerung des Drehzahlreglers vom Redox-Regler unerwünschte Drehzahlbereiche vermeiden.

3.1.6. pH-Messung und -Regelung

Die Messung des pH-Wertes der Kulturlösung erfolgt mit einer sterilisierbaren Einstabmeßkette mit Brückenelektrolyt der Firma Ingold. Diese Elektrode hat zwei Elektrolytkammern; die innere enthält die Silber/Silberchlorid-Elektrode und mit Silberchlorid gesättigte 3m KCl-Lösung (Bezugselektrolyt), die äußere ist mit silberfreier 3m KCl-Lösung (Brückenelektrolyt) gefüllt und steht über zwei Diaphragmen sowohl mit dem Bezugselektrolyt als auch mit der Kulturlösung in Berührung.

Die pH-Elektrode ist über ein abgeschirmtes Kabel mit dem pH-Meter-Einschub im Grundgerät verbunden und wird vor der Sterilisation geeicht. Zum Einbau in den Fermenter ist die Elektrode mit einer Druckarmatur versehen. Dadurch kann der Elektrodeninnenraum mittels Druckluft mit

einem leichten Überdruck gegenüber dem Fermenterinnendruck überlagert werden, um ein Eindiffundieren von Kulturlösung durch das Diaphragma zu verhindern.

Zur Regelung des pH-Wertes der Kulturflüssigkeit wird das Meßsignal des pH-Meters auf den pH-Regler geschaltet. Der pH-Sollwert wird an einem Digitalschalter eingestellt oder von einem externen Sollwertsignal vorgegeben. Der Regler hat eine PI-Reglerstruktur. Seine Ausgänge steuern über Halbleiterrelais un stetig arbeitende Pumpen zur Säure- oder Lauge-dosierung an, wodurch eine beidseitige pH-Regelung möglich ist. An Potentiometern lassen sich sowohl der Proportionalbereich des Reglers verändern als auch eine Totzone einstellen, innerhalb derer die Regler-ausgänge inaktiviert sind.

Die einzelnen Dosierzeiten der Säure- und Laugepumpe werden aufsummiert und mit der Auflösung von einer Sekunde angezeigt bzw. registriert.

3.1.7. pO₂ -Messung

Die Messung des Gelöst-Sauerstoffs erfolgt mit einer sterilisierbaren O₂-Elektrode der Firma Ingold. Die Elektrode arbeitet nach dem polarographischen Meßprinzip und besteht aus einer Silberanode und einer Platin-kathode, welche durch eine gasdurchlässige Membran von der Meßlösung getrennt sind.

Das Meßsignal wird über ein Kabel zum O₂-Metereinschub im Fermentergrundgerät geleitet und auf dem Schreiber registriert. Die Elektrode wird nach der Sterilisation im Kulturmedium unter Betriebsbedingungen mit Stickstoff und Luft auf 0 bis 100 % Sauerstoffsättigung geeicht. Nach Gl. 23 kann das Meßsignal mit der Formel:

$$pO_2 \text{ (bar)} = pO_2 \text{ (\%)} \cdot 0.209 \cdot (P_B + P_U + P_{\text{Lös}})$$

von % Sauerstoffsättigung auf Sauerstoffpartialdruck (bar) umgerechnet werden (vergl. Abschnitt 2.4.2).

3.1.8. Redox-Messung und -Regelung

Die Messung des Redoxpotentials der Kulturlösung erfolgt mit einer sterilisierbaren Redox-Einstabmeßkette der Firma Ingold. Sie besteht aus einer Platin-Meßelektrode und einer Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode mit einer 3 m KCl-Lösung als Elektrolyt und ist wie die pH-Elektrode mit einer Brückenelektrolytkammer ausgestattet. Über ein abgeschirmtes Kabel ist die Elektrode mit einem externen Meßverstärker verbunden.

Das Standardpotential E_{ref} beträgt bei 37 °C 198 mV (vergl. Abschnitt 2.4.1). Zur Berechnung des absoluten Potentials gegenüber der Standard-Wasserstoffelektrode muß dieser Wert nach Gl. 22 jeweils zum Meßwert der Redoxelektrode addiert werden. Die in dieser Arbeit angegebenen Redoxpotentiale sind jeweils die Meßwerte der Platinelektrode bez. auf die SWE.

Zur Regelung des Redoxpotentials wird das Meßsignal mit einem Bereich von -500 bis +500 mV einem Prozeßregelsystem 99 UCB (Firma Foxboro) zugeführt. Der Redox-Sollwert kann über eine Tastatur des Prozeßreglers direkt in der Einheit mV eingegeben werden. Durch Wählen eines geeigneten Proportionalbereichs und einer geeigneten Integralzeit wird die Reglercharakteristik an die Regelstrecke angepaßt (PI-Regler). Der Ausgang des Reglers steuert als externer Sollwert den Drehzahlregler des Fermenterrührers an. Die Regelcharakteristik ist so gewählt, daß ein negativer werdendes Redoxpotential mit einer steigenden Rührerdrehzahl beantwortet wird und umgekehrt.

Durch Begrenzen der Rührerdrehzahl am Drehzahlreglereinschub auf einen Minimalwert und gegebenenfalls auch einen Maximalwert lassen sich für den Prozeß ungünstige Drehzahlbereiche vermeiden.

3.1.9. Füllstands-Regelung

Um das Arbeitsvolumen während der kontinuierlichen Fermentation konstant zu halten, ist der Fermenter mit einem speziell für den Fermenter "Biostat E" modifizierten Wägesystem 3520.03 der Firma Toledo ausgestattet. Das Wägesystem mißt das Gewicht des Fermenters und öffnet bzw. schließt zur Regelung des Füllstands ein Abbläbventil. Da es sich bei Fermentationsbrühen im allgemeinen um verdünnte wäßrige Lösungen oder Suspensionen mit einer Dichte nahe 1 g/ml handelt, wird in einer vereinfachenden Annahme die Meßgröße Gewicht (g) der Zielgröße Volumen (ml) gleichgesetzt.

Um eine Absolutmessung des Füllstands zu ermöglichen, steht das gesamte Fermentergrundgerät mit dem Kulturgefäß auf der Wägeplattform. Als Kraftaufnehmer dient ein Dehnungsmeßstreifen-Biegebalken. Die Vorlast ist mechanisch wegtariert, der Brutto-Wägebereich beträgt 50 kg.

Die Auswerteeinheit der Wägeplattform und die Steuereinheit zur Regelung des Reaktorgewichts ist in einem separaten 19-Zoll-Gehäuse eingebaut. Über einen Tastaturblock wird das Wägesystem auf das Nettogewicht tariert und das Netto-Sollgewicht (\approx Arbeitsvolumen) in Form eng beieinander liegender Grenzwerte eingegeben.

Zur Regelung des Füllstands wird ein im Rundboden des Kulturgefäßes befindliches Abbläbventil so angesteuert, daß es bei Erreichen des oberen

eingestellten Schaltpunktes öffnet. Dadurch läuft Kulturbrühe aus dem Reaktor heraus in ein Auffanggefäß, sodaß das von der Waage registrierte Gewicht abnimmt. Bei Erreichen des unteren eingestellten Schaltpunktes schließt das Ventil wieder. Die minimal einstellbare Schaltdifferenz und damit Gewichtsschwankung beträgt 5 g. Ein Arbeitsvolumen von 4.0 Litern läßt sich dadurch theoretisch mit einer Genauigkeit von 99.875 % konstant halten. In der Praxis läßt sich diese Genauigkeit nicht ganz erreichen, da während der Öffnen- und Schließzeit des Ablaufventils zusätzlich einige ml Kulturflüssigkeit aus dem Reaktor austreten. Die tatsächliche Genauigkeit der Füllstands-Regelung beträgt dadurch ca. 99.5 %.

3.1.10. Innendruck-Regelung

Die Messung des Innendrucks im Kulturgefäß erfolgt mit einem im Fermenterdeckel eingeschraubten piezoresistiven Druckaufnehmer. An einem im Druckmeßeinschub des Fermentergrundgerätes vorhandenen Potentiometer kann der gemessene Umgebungsdruck auf Null abgeglichen werden. Dadurch ist sowohl eine Messung des Überdrucks als auch des Unterdrucks im Reaktor möglich.

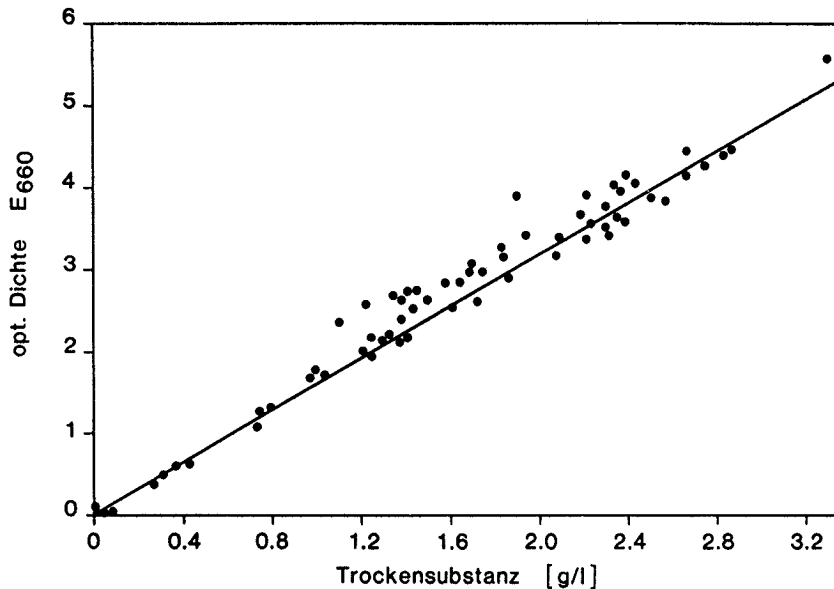
Zur Regelung des Innendrucks wird das Ausgangssignal des Meßverstärkers auf den Druckreglereinschub im Fermentergrundgerät geschaltet. Der Sollwert wird an einem Digitalschalter eingestellt. Der Ausgang des Reglers steuert ein in der Abgasleitung hinter dem Abgasfilter befindliches Stellventil an, das je nach Sollwertabweichung proportional öffnet oder schließt. Der Proportionalbereich ist dabei an die Regelstrecke anpaßbar.

Die Belüftungsrate ist durch diese Regelung nicht beeinflusst und bleibt unabhängig vom gewählten Innendruck gleich.

3.1.11. Kontinuierliche OD-Messung

Zur kontinuierlichen Erfassung der optischen Dichte der Kultur wird in einem kleinen Kreislauf ständig Kulturbrühe aus dem Reaktor durch eine Photometerküvette und zurück in den Reaktor gepumpt. Die Küvette besteht aus Quarzglas, hat eine Schichtdicke von 1 mm und ist als Durchflußküvette ausgebildet. Das verwendete Photometer ist ein Zweistrahl-Spektralphotometer UV-150-02 der Firma Shimadzu. Um eine Eigenextinktion der im Nährmedium enthaltenen gelb-rötlichen Farbstoffe zu vermeiden ist die Wellenlänge des Lichtes auf 660 nm eingestellt. Das Extinktionssignal des Photometers wird auf einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet.

Die optische Dichte (OD) der Kulturbrühe ist ein Maß für die Biomassekonzentration. Zur Umrechnung von der optischen Dichte OD E₆₆₀ (-) auf die Biomassekonzentration X (g/l) muß allerdings eine Eichkurve erstellt werden. Figur 13 zeigt die Eichkurve des OD-Signals gegen die Trockengewichtskonzentration der Biomasse.



Figur 13: Eichkurve der kontinuierlich ermittelten optischen Dichte in Abhängigkeit vom Trockengewicht

Aus der zeitlichen Änderung der kontinuierlich gemessenen Biomasseextinktion (\approx Biomassekonzentration X) läßt sich nach Gl. 1:

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$$

zu jedem Zeitpunkt die Wachstumsrate μ der Organismen berechnen. Durch direkte Datenübertragung des Photometer-Meßsignals auf einen Prozeßrechner und eine geeignete Datenreduktion und -glättung läßt sich theoretisch die Wachstumsrate "on-line" berechnen.

Da das Meßsignal aber verschiedenen, rechnerisch nicht eliminierbaren Störungen unterlag, wurde zur Berechnung der Wachstumsrate die Kurve des Analogschreibers verwendet, deren Werte i.a. im Abstand einer Stunde Prozeßzeit, falls erforderlich auch in kürzeren Abständen, in den Rechner eingelesen wurden. Das vom Rechner zu bildende Differential dt hat daher i.a. die Größe 1 Stunde.

3.1.12. Abgasanalytik

Zur kontinuierlichen Messung der Zusammensetzung der den Fermenter verlassenden Abluft wird diese über einen PVC-Schlauch einem "Multiple Gas Analyzer MGA 1200" der Firma Perkin-Elmer zugeführt. Mit diesem nach dem "Magnetic Sector"-Prinzip arbeitenden Massenspektrometer können neben anderen die Abgaskomponenten O_2 , N_2 und CO_2 quantitativ bestimmt werden. Die dem prozentualen Anteil der drei genannten Komponenten in der Abluft entsprechenden Ausgangssignale werden auf einem Analogschreiber aufgezeichnet.

Anhand der gemessenen prozentualen Abgaswerte y_i^α , der Kenntnis der prozentualen Anteile y_i^ω der in den Fermenter gelangenden Zuluft, des Volumenstromes V_G^α der Zuluft und des Flüssigvolumens V_F der Kulturbrühe (Figur 14) lassen sich die Gasbilanzen und daraus die den Energiestoffwechsel der Organismen kennzeichnenden Kenngrößen Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} , CO_2 -Produktionsrate Q_{CO_2} und Respirationsquotient $RQ = Q_{CO_2}/Q_{O_2}$ bestimmen (Reuß, 1979a).

Bilanz des Sauerstoffs:

$$\dot{V}_G^\alpha \cdot y_{O_2}^\alpha = \dot{V}_G^\omega \cdot y_{O_2}^\omega + \dot{Q}_{O_2} V_F \cdot 22.4 \quad (\text{Gl. 24})$$

Bilanz des Kohlendioxids:

$$\dot{V}_G^\alpha \cdot y_{CO_2}^\alpha + \dot{Q}_{CO_2} \cdot V_F \cdot 22.4 = \dot{V}_G^\omega \cdot y_{CO_2}^\omega \quad (\text{Gl. 25})$$

Bilanz des Stickstoffs:

$$\dot{V}_G^\alpha \cdot y_{N_2}^\alpha = \dot{V}_G^\omega \cdot y_{N_2}^\omega \quad (\text{Gl. 26})$$

Berechnung der Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} :

(Gl. 27)

$$\dot{Q}_{O_2} = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{22.4 V_F} \left[y_{O_2}^\alpha - \frac{1 - y_{O_2}^\alpha - y_{CO_2}^\alpha}{1 - y_{O_2}^\omega - y_{CO_2}^\omega} y_{O_2}^\omega \right] \quad [\text{mol } O_2 / (l \cdot h)]$$

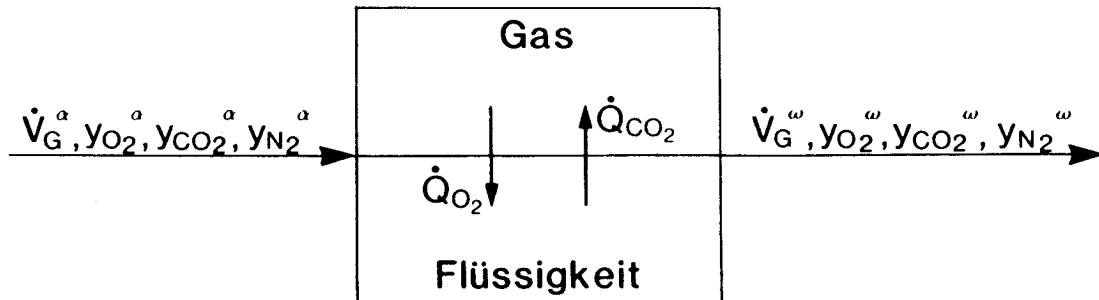
Berechnung der CO₂-Produktionsrate:

(Das zusätzliche Glied $-D \cdot C_{CO_2}$ für den Austrag von gelöstem CO₂ mit dem kontinuierlichen Ablauf von Kulturflüssigkeit wurde hier vernachlässigt) (Gl. 28)

$$\dot{Q}_{CO_2} = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{V_F \cdot 22.4} \left[y_{CO_2}^\omega \frac{1 - y_{O_2}^\alpha - y_{CO_2}^\alpha}{1 - y_{O_2}^\omega - y_{CO_2}^\omega} - y_{CO_2}^\alpha \right] \quad [\text{mol CO}_2/(\text{l} \cdot \text{h})]$$

Berechnung des Respirationsquotienten:

$$RQ = \frac{\dot{Q}_{CO_2}}{\dot{Q}_{O_2}} \quad [-] \quad (\text{Gl. 29})$$



Figur 14: Stoffströme der Gaskomponenten durch den Fermenter

3.2. Kontinuierliche Nährstoffdosierung

Zur Durchführung einer kontinuierlichen Fermentation wird das sterile Nährmedium mit einem konstanten Volumenstrom aus einem Voratsgefäß in das Kulturgefäß des Fermenters gepumpt. Für einen entsprechenden Ablauf von Kulturbrühe aus dem Reaktor bei konstantem Kulturvolumen sorgt die unter 4.1.9. beschriebene Füllstands-Regelung.

Als Medium-Voratsgefäße dienen alternativ ein Stahl-Rührkessel mit 72 l oder Glasflaschen mit 18 l Inhalt. Als Förderorgan dient eine Schlauchpumpe (Typ 501 U von Watson-Marlow oder Typ YPP01 von Sartorius). Für die Schlauchleitungen werden Silikonschläuche, in den Schlauchpumpen Schläuche aus Marprene (Firma Verder), verwendet. Um ein Rückwachsen von Organismen aus dem Kulturgefäß in die Voratsgefäße zu verhindern, passiert das Medium, bevor es in den Fermenter gelangt, eine elektrisch beheizte Thermofalle, die auf dem Fermenterdeckel montiert ist.

Zum Teil wurden Fermentationen mit geregelter Nährstoffdosierung, zum Teil aber auch mit unregelter Nährstoffdosierung durchgeführt. Bei den Fermentationen mit unregelter Nährstoffdosierung steht die Substratvoratsflasche auf einer elektronischen Waage der Firma Sartorius. Mit einer Stoppuhr wurde täglich die stündliche Masseabnahme auf der Waage ermittelt und, nach Vergleich mit dem Sollwert, gegebenenfalls die Drehzahl der Substratpumpe nachgestellt.

Bei den Fermentationen mit geregelter Nährstoffdosierung wurden zwei unterschiedliche Regelkonzepte angewandt:

3.2.1. Regelung aufgrund induktiver Durchflußmessung

Die Regelanlage besteht aus einem Meßwertaufnehmer X-1000 (Nenn-durchmesser 2.5 mm) und einem Meßumformer T 900 der Firma Krohne/Altometer sowie einem elektronischen Kompaktregler SD der Firma Hartmann + Braun. Angesteuert vom Reglerausgang wird eine Schlauchpumpe Typ 501 U 50 der Firma Watson-Marlow.

Bei der magnetisch-induktiven Durchflußmessung strömt eine elektrisch leitende Flüssigkeit (Nährmedium) durch ein senkrecht zur Strömungsrichtung angelegtes Magnetfeld. In der Flüssigkeit wird aufgrund ihrer Bewegung eine elektrische Spannung induziert, die proportional zur mittleren Strömungsgeschwindigkeit und damit zum Volumenstrom ist. Für die Spannung U gilt nach dem Faradayschen Induktionsgesetz (Altometer):

$$U = K \cdot B \cdot v \cdot D \quad [V] \quad (\text{Gl. 30})$$

mit K = Gerätekonstante

B = Stärke des Magnetfeldes

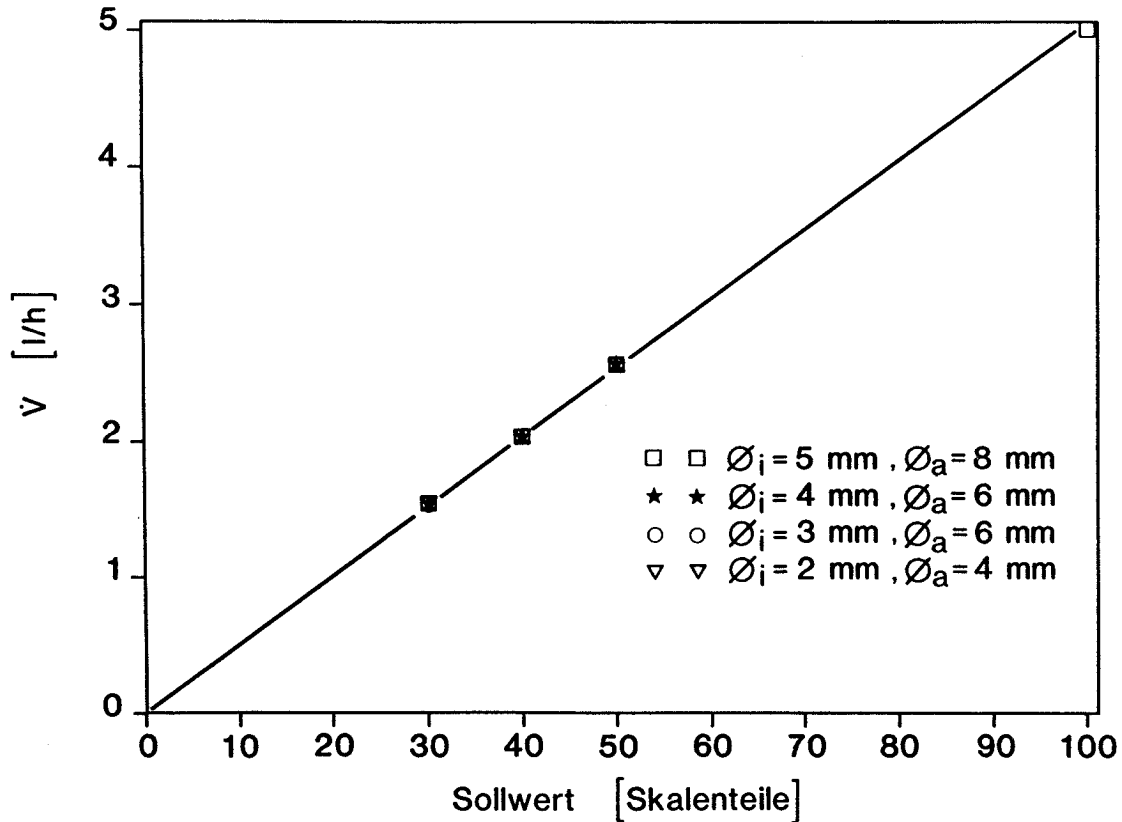
v = mittlere Geschwindigkeit

D = Rohrdurchmesser

Das induzierte Spannungssignal wird über zwei Platinelektroden, die in leitendem Kontakt mit der Flüssigkeit stehen, direkt abgegriffen und dem Meßumformer zugeführt, an dessen Ausgang ein Stromsignal anliegt, das dem Regler zugeführt wird. Der Volumenstrom-Sollwert wird über eine Rändelscheibe an einer Prozentskala des Reglers eingegeben. Das Ausgangssignal des Reglers steuert als externer Sollwert den Drehzahlregler der Schlauchpumpe an.

Der regelbare Bereich liegt zwischen einer Strömungsgeschwindigkeit im Meßwertaufnehmer von 0 bis 10 m/s. Der Meßbereichsendwert ist dabei einstellbar zwischen 0.5 und 10 m/s. Unterhalb einer Strömungsgeschwindigkeit von 0.5 m/s steigt der Meßfehler jedoch exponentiell an (Herstellerausangabe). Dieser Wert von 0.5 m/s entspricht nach dem Kalibrierzertifikat des Herstellers einem Volumenstrom von 8.84 l/h. Bei einem Arbeitsvolumen im Fermenter von 4.0 l entsprechen 8.84 l/h einer Durchflußrate $D = 2.21 \text{ h}^{-1}$. Bei den während der kontinuierlichen Fermentationen üblicherweise eingestellten Durchflußraten von $D = 0.1$ bis 0.5 h^{-1} (entspr. Volumenströmen von 0.4 bis 2.0 l/h) liegt man mit der induktiven Durchflußregelung daher deutlich unterhalb des optimalen Bereichs.

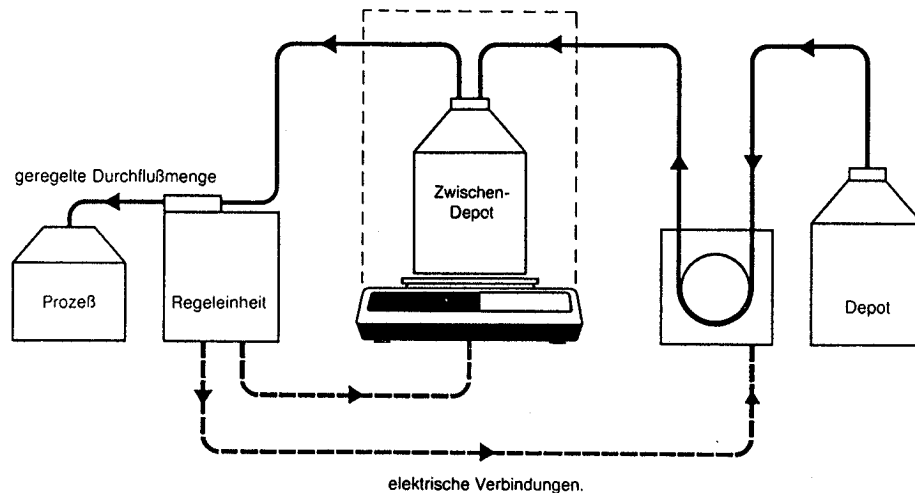
Figur 15 zeigt die resultierenden Volumenströme in Abhängigkeit von den an der %-Skala eingestellten Sollwerten bei Verwendung von Schläuchen verschiedener Durchmesser. Dabei zeigt sich trotz der aufgezeigten Problematik für alle Schlauchdurchmesser eine gute Linearität und Reproduzierbarkeit im Bereich von 1.5 bis 5 l/h. In dem wichtigen Bereich unterhalb 1.5 l/h wurde die Regelung dagegen zunehmend ungenau, sodaß nach einigen Fermentationen auf diese Regelung verzichtet wurde. Stattdessen wurde gemeinsam mit der Fa. Sartorius ein alternatives Regelkonzept, basierend auf differentieller Gewichtsmessung, entwickelt.



Figur 15: Dosierregelung mittels induktiver Durchflußmessung: Resultierende Volumenströme bei Verwendung verschiedener Schlauchdurchmesser in Abhängigkeit vom Sollwert des Durchflußreglers

3.2.2. Regelung aufgrund differentieller Gewichtsmessung

Die Dosier-Regelanlage YPP01 der Firma Sartorius ermöglicht eine Regelung der Substratdosierung auch in Bereichen unterhalb 100 ml/h. Sie besteht aus einer Präzisionswaage Typ 1507 MP8 zur Durchflußmengenmessung und aus einer kombinierten Pump/Regeleinheit, bestehend aus Rechereinheit, Schlauchpumpe, Tastatur und Anzeige von Soll- und Istwert. Als zusätzlich benötigte schnelllaufende Nachfüllpumpe dient eine Schlauchpumpe Typ 501 U 170 der Firma Watson-Marlow. Figur 16 zeigt das Fließdiagramm der Dosieranlage (Sartorius).



Figur 16: Fließbild der Dosieranlage YPP01

Auf der Waage steht als Zwischendepot eine Saugflasche, die ca. 2 l Nährmedium faßt. Aus dem Zwischendepot pumpt die Schlauchpumpe ständig Flüssigkeit ab, sodaß das Gewicht auf der Waage abnimmt. Über die Tastatur können alle Parameter wie Soll-Durchfluß, Vorlast und Sollfüllmenge des Zwischendepots eingegeben werden. Auf die Waage-schnittstelle des Reglers werden mit vorwählbarer Frequenz (100 bis 800 ms) die Nettogewichtswerte übertragen. Aus jeweils 300 Meßwerten ermittelt die Rechereinheit den Ist-Fluß und errechnet nach Vergleich mit dem vorgegebenen Sollwert die Steuergröße zur Ansteuerung der Drehzahl der Schlauchpumpe. Werden in dem Zwischendepot auf der Waage 10 % der Sollfüllmenge unterschritten, wird über einen potentialfreien Relaisausgang die Nachfüllpumpe so lange eingeschaltet, bis das Zwischendepot wieder gefüllt ist. Während des Nachfüllprozesses wird die Fördermenge von einer integrierten Motorregelung autark konstant gehalten.

Der regelbare Förderbereich beträgt 10 bis 10000 g/h (analog der Überlegung in Abschnitt 3.1.9. entspricht das 10 bis 10000 ml/h). Zur Abdeckung des gesamten Förderbereichs sind jedoch mehrere Schlauchgrößen erforderlich. In dem meist genutzten Bereich von 400 bis 2000 ml/h wurde ein Marprene-Schlauch mit einem Innendurchmesser von 4.8 mm und einer Wandstärke von 1.6 mm verwendet.

Kontrollmessungen des Volumenstroms nach dem für die unregelte Dosierpumpe beschriebenen Prinzips (s.o.) ergaben Abweichungen vom

4. ANALYSEN-METHODEN

Zur externen Bestimmung der in der Kulturbrühe gelösten oder suspendierten Substanzen werden am Probenahmeort des Fermenters kleine Volumina als Probe entnommen. Ein Teil der Probe wird unverändert für die Bestimmung der Biomassekonzentration verwendet, von dem Rest wird durch Zentrifugation (10 min bei 15000 g) der Feststoffanteil (Biomasse) von der Flüssigkeit (Kulturfiltrat) abgetrennt. Vom klaren Überstand der zentrifugierten Proben werden je ca. 1.5 ml bei -25 °C eingefroren. Diese Menge reicht i.a. für alle Enzymbestimmungen und weiteren Analysen. Bei Ansammlung von 20 bis 30 Proben werden diese kurzfristig aufgetaut und nach Entnahme der benötigten Menge wieder eingefroren. Eine Beeinträchtigung der Enzymaktivitäten wurde dabei nicht beobachtet.

4.1. Bestimmung der Biomassekonzentration

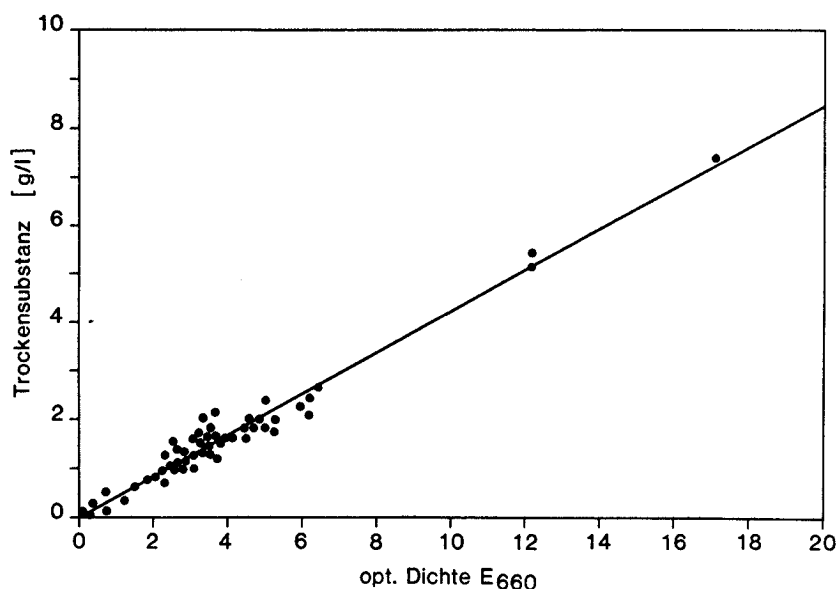
4.1.1. Photometrische Bestimmung

Von der Probe werden 0.1 ml entnommen und mit 1.9 ml dest. H₂O gemischt (Verdünnung 1:20). In einem Spektralphotometer PMQ 2 der Firma Zeiss wird die Extinktion der verdünnten Probe bei einer Wellenlänge von 660 nm gegen dest. H₂O gemessen. Die optische Dichte (OD) der Probe ergibt sich nach Multiplikation der Extinktion mit dem Verdünnungsfaktor.

Die optische Dichte ist nur ein indirektes Maß für die Biomassekonzentration; Werte der Einheit (g Biotrockenmasse/l) erhält man aus einer zuvor erstellten Eichkurve OD / Trockengewicht (Figur 18).

4.1.2. Trockengewicht-Bestimmung

Von der Probe werden mit einer Pipette genau 10 ml entnommen und in einem vorgewogenen Zentrifugenröhrchen 10 min bei ca. 30000 g abzentrifugiert (Doppelbestimmung). Der klare Überstand wird abgesaugt, die Röhrchen mit den Zellen werden in einem Vakuum-Trockenschrank der Firma Heraeus bei 50 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der Gewichts-differenz läßt sich das Trockengewicht der Biomasse (g/l) berechnen.



Figur 18: Eichkurve der optischen Dichte E_{660} gegen das Trockengewicht der Fermenterkultur

4.2. Bestimmung der Enzymaktivitäten

4.2.1. Xylanase-Test

Zur Bestimmung der Xylanaseaktivität wird analog zu der Methode von Conrad (1983), die auch von Ghose & Bisaria (1984) beschrieben ist, ultraschallbehandeltes, in Phosphatpuffer suspendiertes Xylan für 20 min mit der Probe bei 40 °C inkubiert und die dabei frei werdenden reduzierende Zucker nach der Methode von Nelson und Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) bei 660 nm nachgewiesen.

Diese Methode basiert auf der Reduktion von zweiwertigem Kupfer, das in einem Kupfertartratokomplex vorliegt. Die Reduktion erfolgt im Kochbad durch die aus dem Xylan freigesetzten Zucker. Dabei fällt Cu_2O aus, welches in einer anschließenden Reaktion wiederum eine Molybdän-Arsen-Heteropolysäure reduziert, die sich im sauren Milieu aus $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ und Na_2HAsO_4 gebildet hat. In dieser reduzierten Molybdän-Arsen-Heteropolysäure können sich die Valenzelektronen (aufgrund wandernder Elektronenlücken) über das ganze Molekül frei bewegen, sodaß eine tiefblaue Färbung mit einem Extinktionsmaximum bei 660 nm resultiert.

Reagentien:

Xylan aus Haferspелzen (Roth), ultraschallbehandelt,
2%-ig suspendiert in Phosphatpuffer

0.05 M Phosphatpuffer pH 6.0

Nelson-Lösung A:

25 g Na_2CO_3

25 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Kalium-Natriumtartrat)

20 g NaHCO_3

200 g Na_2SO_4

ad 1000 ml H_2O

Nelson-Lösung B:

15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

0.1 ml konz. H_2SO_4

ad 100 ml H_2O

Nelson-Lösung C:

25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Ammoniumheptamolybdat)

21 ml konz. H_2SO_4

3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

ad 496 ml H_2O

Die Nelson-Lösungen A und B werden vor der Bestimmung im Verhältnis 25 + 1 gemischt. Die Probe wird in geeignetem Verhältnis (meist 1 : 10) mit Phosphatpuffer verdünnt.

Testansatz:

1.0 ml Xylan-Suspension

0.9 ml Phosphatpuffer

0.1 ml verd. Probe (BW: 0.1 ml Puffer)

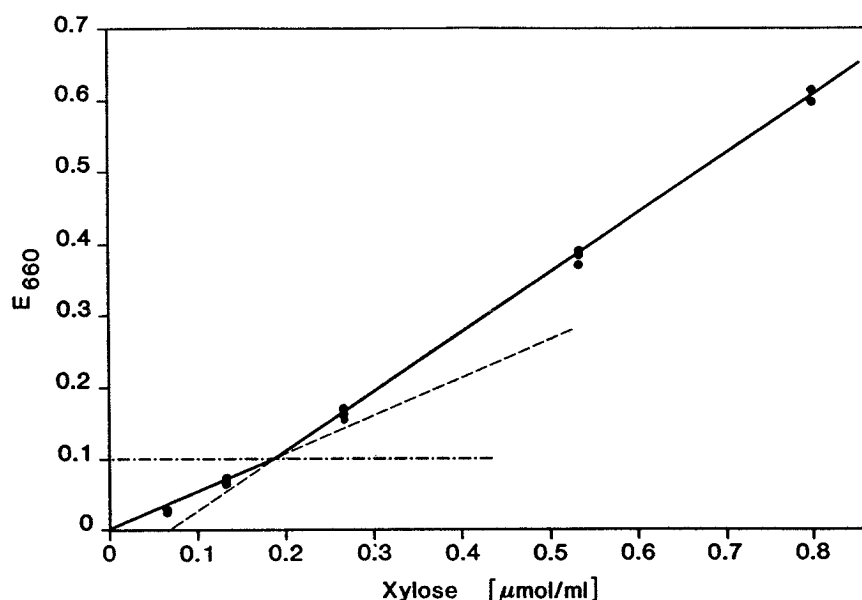
Der Ansatz (2 ml) wird 20 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend die Reaktion mit 2 ml Nelson-Lösung (A+B) abgestoppt und das Gemisch danach 5 min. zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Reduktionsäquivalente der Abbauprodukte werden nach der Methode von Nelson und Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) nachgewiesen.

Nelson-Methode (Doppelbestimmung):

0.4 ml Überstand 20 min im Kochbad
nach abkühlen:
0.2 ml Nelson-Lösung C
4.4 ml H₂O

Nach Mischen wird die Extinktion in einem Spektralphotometer PM 6 der Firma Zeiss bei einer Wellenlänge von 660 nm gegen den Blindwert (BW) gemessen. Die Xylanaseaktivität ist zur Extinktion proportional und wird aus einer Eichgeraden (Figur 19) berechnet. Zum Erstellen der Eichgeraden werden Xyloselösungen verschiedener Konzentrationen mit der Nelson-Methode gemessen.

Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die die Freisetzung von 1 μMol Reduktionsäquivalente pro Minute, bezogen auf Xylose, katalysiert.



Figur 19: Eichkurve zur Bestimmung der Xylanaseaktivität
(Um den im unteren Bereich nicht ganz linearen Extinktionsverlauf besser zu beschreiben werden für Extinktionswerte unter bzw. über 0.1 Einheiten unterschiedliche Geraden verwendet)

4.2.1.1. Vorbehandlung des Enzym-Substrates

Das käuflich zu erwerbende Xylan ist zur Durchführung des beschriebenen Xylanase-Tests nur ungenügend geeignet. Zwei Faktoren wiegen besonders schwer:

a) Das Xylan enthält einen relativ hohen Anteil kurzkettiger Komponenten. Durch den hierdurch erhöhten Blindwert wird die Empfindlichkeit der Bestimmung der vom Enzym freigesetzten reduzierenden Zucker mit der Methode nach Nelson-Somogyi stark herabgesetzt.

b) Auf der anderen Seite ist das (in neutralen Lösungen unlösliche) Xylan so grobkörnig, daß die dem Enzym in der Suspension angebotene Angriffsfläche völlig unzureichend ist.

Zu a): Mittels einer Fraktionierung (Whistler & Feather, 1965) werden die kurzkettigen (wasserlöslichen) Bestandteile von den langkettigen (wasserunlöslichen) Bestandteilen getrennt. Hierzu wird das gesamte Xylan in 1 M NaOH gelöst. Nach Filtrieren über Glasfaser-Filter (Whatman No. GF/F) wird die Lösung mit 10 %-iger Essigsäure langsam auf pH 6.0 neutralisiert, wodurch die langkettigen Moleküle wieder ausfallen, die kurzkettigen Moleküle aber in Lösung bleiben. Nach mehrmaliger Folge von Abzentrifugieren und Resuspendieren in dest. Wasser wird der Niederschlag lyophilisiert (Lyovac GT 4, Leybold-Heraeus). Dieses Substrat enthält keine das Nelsonreagenz reduzierenden Substanzen mehr und hat eine deutlich feinere Struktur als die Ausgangssubstanz.

Zu b): Um die stark mikrokristallinen Strukturen der Xylanmoleküle aufzuweiten und dadurch die Zahl der Angriffstellen für das Enzym zu vergrößern, wird das Xylan ultraschallbehandelt. Hierzu wird das Xylan direkt vor dem Enzymtest mit der benötigten Puffermenge suspendiert und in einem Ultraschallgerät B 15 (Fa. Branson) mit einem Standard 1/2"-Horn bei Leistungsstufe 10 dreimal 3 min beschallt. Wegen des hohen Energieeintrags und der daraus resultierenden Erwärmung muß die Suspension dabei im Eisbad stehen und mit einem Magnetrührer gerührt werden. Nach der Beschallung ist die Suspension direkt für den Xylanase-Test einsetzbar.

4.2.2. β -Xylosidase-Test

Die Bestimmung der β -Xylosidaseaktivität wird nach der Methode von Conrad (1983) durchgeführt. Diese Methode ist auch von Ghose & Bisaria (1984) beschrieben.

Der Test basiert auf der enzymkatalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranosid (pNPX) zu Xylose und p-Nitrophenolat, das aufgrund seiner gelben Färbung im Photometer bei 400 nm nachgewiesen werden kann. Da die Intensität der Gelbfärbung pH-abhängig ist, wird der pH-Wert mit einer 10 %-igen Na_2CO_3 -Lösung schwach basisch (pH \approx 10) eingestellt, wodurch gleichzeitig auch die enzymatische Reaktion gestoppt wird.

Reagentien:

p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranosid (pNPX)
0.05 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 3.0
10 %-ige Na_2CO_3 -Lösung

Substrat:

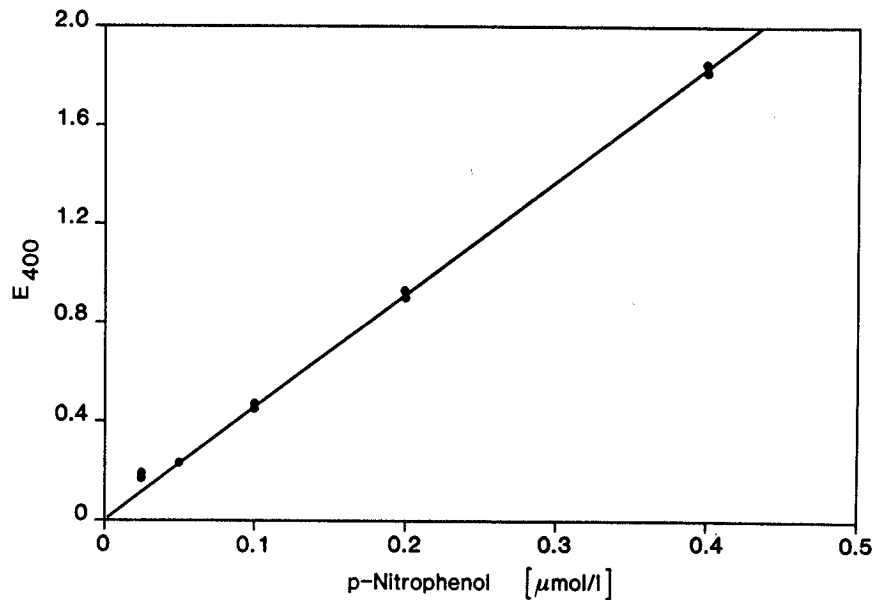
5 mM Lösung von pNPX in Citrat-Phosphat-Puffer

Testansatz:

1.9 ml Substratlösung
0.1 ml Probe (BW: 0.1 ml Puffer)

Der Testansatz wird 20 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion danach mit 2 ml Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt. Nach Mischen wird die Extinktion im Photometer bei 400 nm gemessen.

Die Extinktion ist der Menge freigesetztem p-Nitrophenols proportional. Eine Eichkurve (Figur 20) wird mit p-Nitrophenol erstellt. Eine Enzymeinheit (U) katalysiert die Freisetzung von 1 μMol p-Nitrophenol pro Minute.



Figur 20: Eichkurve zur Bestimmung der β -Xylosidaseaktivität

4.2.3. Protease-Test

Zur Bestimmung der Proteaseaktivität (Methode nach Prestidge et al. (1971) und Nakane (1978)) wird eine Lösung von Azocasein (mit diazotierter Sulfanilsäure gekoppeltes Casein) mit der Enzymprobe bei 37 °C inkubiert. Durch die Wirkung des Enzyms wird das Protein gespalten. Nach Zugabe von Trichloressigsäure fallen die größeren Proteinmoleküle aus. Kurzkettige Proteineinheiten mit dem daran gebundenen Azofarbstoff bleiben jedoch in Lösung. Aufgrund der im Basischen roten Färbung des Farbstoffs kann dieser bei 440 nm photometrisch bestimmt werden.

Reagentien:

- Azocasein, Na-Salz, lyophilisiert
- 0.1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 5.5
- 0.3 M Trichloressigsäure-Lösung (TCA)
- 10 M NaOH

Substrat:

- 10 mg/ml Azocasein, gelöst in Phosphatpuffer

Testansatz:

- 1.0 ml Azocaseinlösung
- 0.1 ml Probe (BW: 0.1 ml Puffer)

Der Ansatz wird 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion anschließend mit 3.0 ml TCA abgestoppt. Das nicht zersetzte Casein wird dadurch gleichzeitig ausgefällt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 15000 g wird 1 ml vom klaren Überstand, in dem sich der freigesetzte Azofarbstoff befindet, abgenommen und mit 0.12 ml 10 M NaOH versetzt. Die Extinktion wird bei 440 nm in einem Spektralphotometer PM 6 (Zeiss) gemessen. Sie ist der Menge freigesetzten Azofarbstoffs und damit der Proteaseaktivität proportional.

Die Enzymaktivität (U/ml) ist festgesetzt als die Extinktionszunahme mit der Zeit, multipliziert mit dem (willkürlichen) Faktor 1000:

$$U/ml = E_{440} \cdot 1000 / (t \cdot v)$$

mit t = Inkubationsdauer (min)
und v = Probevolumen (ml)

4.2.4. α -Amylase-Test

Die Bestimmung der α -Amylaseaktivität wird im Wesentlichen analog zum Xylanasetest (Abschnitt 4.2.1) durchgeführt.

Reagentien:

- Stärke, "löslich nach Zulkowski"
- 0.05 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.0
- Nelson-Lösungen A, B, C, wie unter Abschnitt 4.2.1. beschrieben.

Substrat:

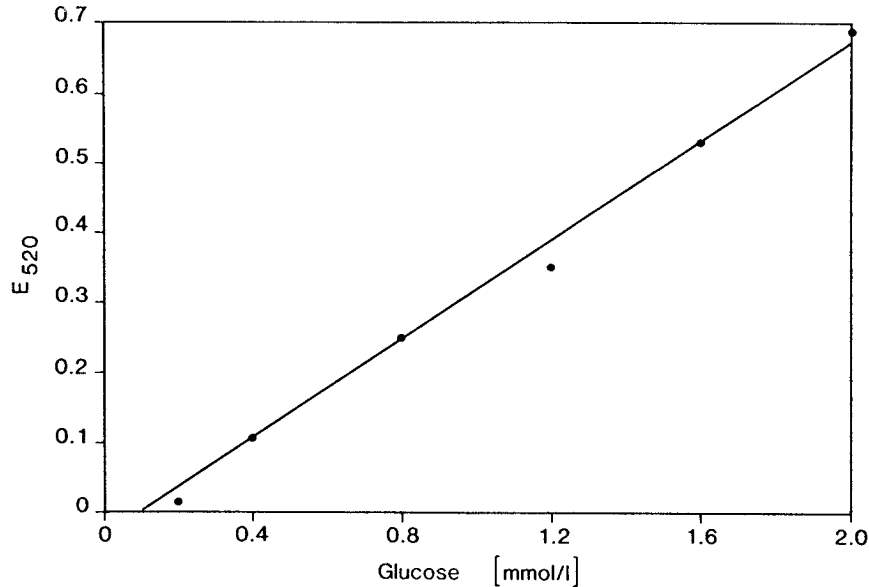
- 2 %-ige Stärkelösung in Phosphatpuffer

Testansatz:

- 1.9 ml Stärkelösung
- 0.1 ml Probe (BW: 0.1 ml Puffer)

Der Ansatz wird 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2 ml Nelson-Lösung (A+B) abgestoppt. Der Nachweis der freigesetzten Reduktionsäquivalente erfolgt nach der unter Abschnitt 4.2.1. beschriebenen Methode. Die Eichkurve (Figur 21) wird mit Glucoselösung erstellt. Eine

Enzymeinheit (U) katalysiert die Freisetzung von 1 μMol Reduktions-
 äquivalente pro Minute, bezogen auf Glucose.

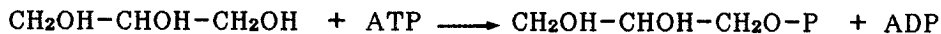


Figur 21: Eichkurve zur Ermittlung der α -Amylaseaktivität

4.3. Quantitative Glycerinbestimmung

Das im Kulturfiltrat enthaltene Glycerin wird in einer Kette enzymatischer Reaktionen unter NADH-Verbrauch nachgewiesen (Eggstein & Kuhlmann, 1974; Boehringer-Testvorschrift):

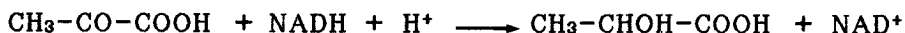
Glycerin wird in der durch Glycerokinase (GK) katalysierten enzymatischen Reaktion durch ATP zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert:



Mittels Pyruvat-Kinase (PK) wird das entstandene ADP durch Phosphoenolpyruvat unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt:



Das Pyruvat wird dann durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat hydriert, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wird:



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerinmenge äquivalent. NADH ist daher die Meßgröße und kann aufgrund seiner Extinktion bei 340 nm bestimmt werden.

Reagentien:

Puffer:

0.75 M Glycylglycin-Puffer, pH 7.4
0.01 M MgSO₄

Lösung 1:

NADH, 8.2 mmol/l
ATP, 33 mmol/l
Phosphoenolpyruvat, 46 mmol/l

Suspension 2:

Pyruvat-Kinase, 3 mg/ml
Lactat-Dehydrogenase, 1 mg/ml

Suspension 3:

Glycerokinase, 1 mg/ml

Testansatz (in 1 cm Quarz-Küvette pipettieren):

1.00 ml Puffer
0.10 ml Lösung 1
1.90 ml dest. H₂O
0.10 ml Probe (BW: 0.10 ml H₂O)
0.01 ml Suspension 2

Der Ansatz wird gemischt und die Extinktion E₁ nach Stillstand der Vorreaktion im Photometer bei 340 nm gemessen. Durch Zugabe der Suspension 3 und Mischen wird die eigentliche Glycerinreaktion gestartet. Dabei wird abhängig von der Glycerinkonzentration NADH zu NAD⁺ dehydriert. Die Abnahme der NADH-Konzentration im Testansatz wird photometrisch bei 340 nm gemessen. Nach Stillstand der Reaktion erhält man die Extinktion E₂. Für Leerwert- und Probenansatz werden die Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) gebildet. Die Extinktionsdifferenz des Leerwerts wird von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen:

$$\Delta E = \Delta E_P - \Delta E_L$$

Für die Berechnung der Glycerinkonzentration wurde für NADH ein Extinktionskoeffizient $\epsilon = 6.3 \text{ (l} \cdot \text{mMol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$ zugrundegelegt.

$$\text{Glycerin (g/l)} = \text{E} \cdot \text{V} \cdot \text{MG} / (\epsilon \cdot \text{d} \cdot \text{v} \cdot 1000)$$

mit V = Testvolumen (ml)

v = Probevolumen (ml)

MG= Molekulargewicht von Glycerin

d = Schichtdicke (cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient

4.4. Quantitative Proteinbestimmung

Der Proteingehalt im Kulturfiltrat wird nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Bradford-Reagenz:

100 mg Coomassie Blau G 250, in

50 ml 95 %igem Ethanol gelöst

100 ml 85 %ige H_3PO_4

ad 1000 ml dest. H_2O

Mikro-Ansatz (bis ca. 120 mg/l Protein):

0.2 ml Reagenz

0.9 ml dest. H_2O

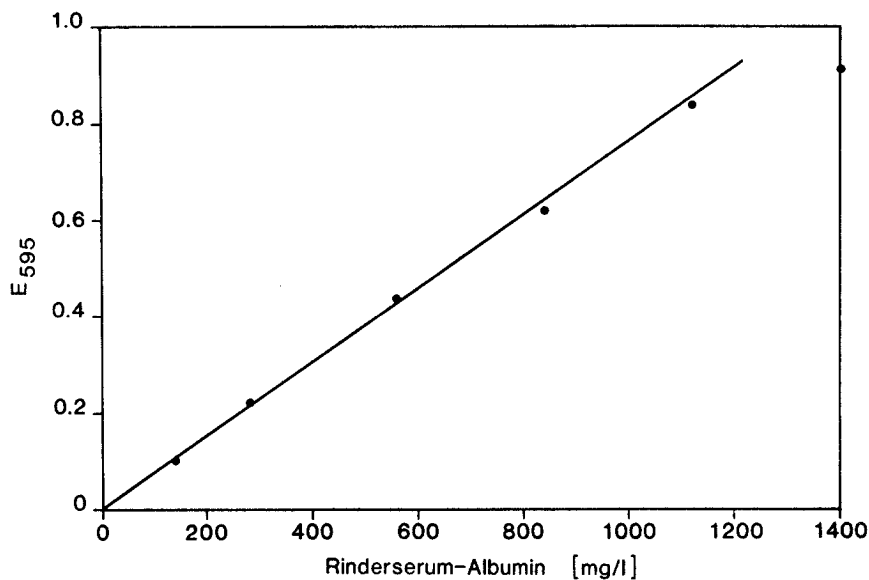
0.1 ml Probe

Makro-Ansatz (bis ca. 1200 mg/l Protein):

5.0 ml Reagenz (1:5 verd.)

0.1 ml Probe

Der Ansatz wird gemischt und die Extinktion nach genau 5 min bei 595 nm gemessen. Durch die Bindung des Coomassie Blau G 250 an das Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau). Über den Chemismus der Farbstoffbindung an das Protein gibt es in der Literatur keine befriedigenden Erklärungen. Die Eichgerade (Figur 22) wird mit Rinderserumalbumin erstellt.



Figur 22: Eichkurve für die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

4.5. Säureanionen-Analyse mittels Isotachophorese

Zur quantitativen Bestimmung von Säureanionen im Kulturfiltrat (speziell: Acetat, Succinat, Lactat und Formiat) werden die Proben mittels Kapillar-Isotachophorese (Everaerts et al., 1976) in einem Tachophor 2127 (Firma LKB) analysiert. Dabei werden die Anionen in einem elektrischen Feld innerhalb einer Kapillare nach ihrer Beweglichkeit getrennt und durch einen Leitfähigkeitsdetektor nachgewiesen.

Jeweils 4 μl der mit dest. H_2O 1:2 verdünnten Proben werden injiziert und bei einem stabilen Strom von 150 μA getrennt. Nach Erreichen einer Spannung von 12 kV schaltet der Tachophor automatisch auf eine Stromstärke von 100 μA und schließlich auf 50 μA um. Anhand der aufgezeichneten Leitfähigkeitsstufen ergibt sich, nach Vergleich mit Werten von Eichlösungen, aus der Höhe der Stufe die Art des Ions und aus der Länge der Stufe die Konzentration. Die Berechnung übernimmt ein Integrator SP 4270 der Firma Spectraphysics.

Der Meßbereich beträgt ca. 0.3 bis 30 mmol/l. Meßbar sind im Prinzip alle Ionen, die eine höhere Beweglichkeit als das Ion des Endelektrolyten und eine geringere Beweglichkeit als das Ion des Leitelektrolyten haben. Das Chromatogramm eines Eichgemisches von Acetat, Lactat, Formiat und Phosphat zeigt Figur 23.

Leitelektrolyt:

257.5 mg Diglycin

9.1 mg Cetyltrimethylammoniumbromid

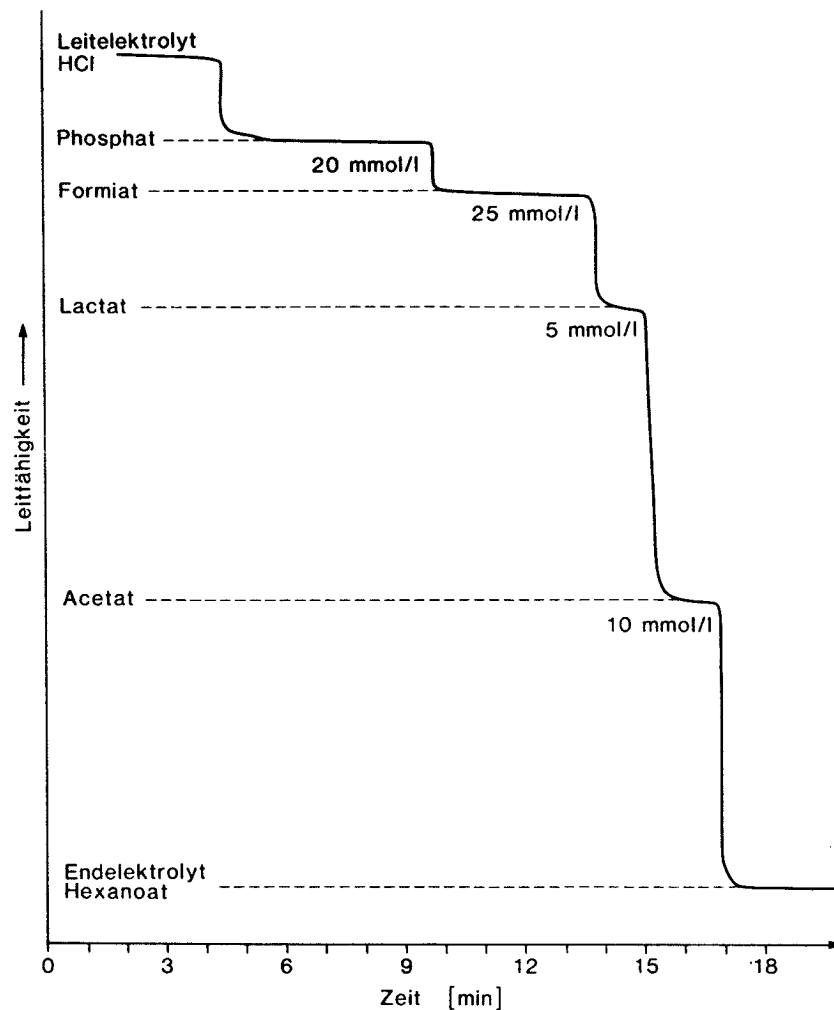
500.0 mg Triton X

75.0 ml einer 1 %igen Hydroxypropylmethylcellulose-Lösung

x ml 1 N HCl zum Einstellen auf pH 2.9

ad 250 ml mit dest.H₂O

und Stabilisierung der Lösung durch 0.002 % Chlorhexidinchlorid.

Endelektrolyt:157.5 µl Hexansäure in 250 ml dest.H₂O

Figur 23: Eichchromatogramm eines Gemisches von Phosphat, Formiat, Lactat und Acetat in der Isotachophorese

4.6. Gaschromatographische Bestimmungen

Flüchtige Fermentationsprodukte (Ethanol, Aceton, Acetoin und 2,3-Butandiol) sowie nach Ansäuern flüchtige Substanzen (Essigsäure) werden in einem Gaschromatographen Typ 5840 A der Firma Hewlett-Packard mit automatischer Probeaufgabeschleife und einem Flammenionisationsdetektor (FID) quantitativ nachgewiesen. Um eine sicherere qualitative und quantitative Analyse zu erreichen, werden die Proben mit unterschiedlichen Säulen (Carbopak und Poropak QS) zweimal analysiert.

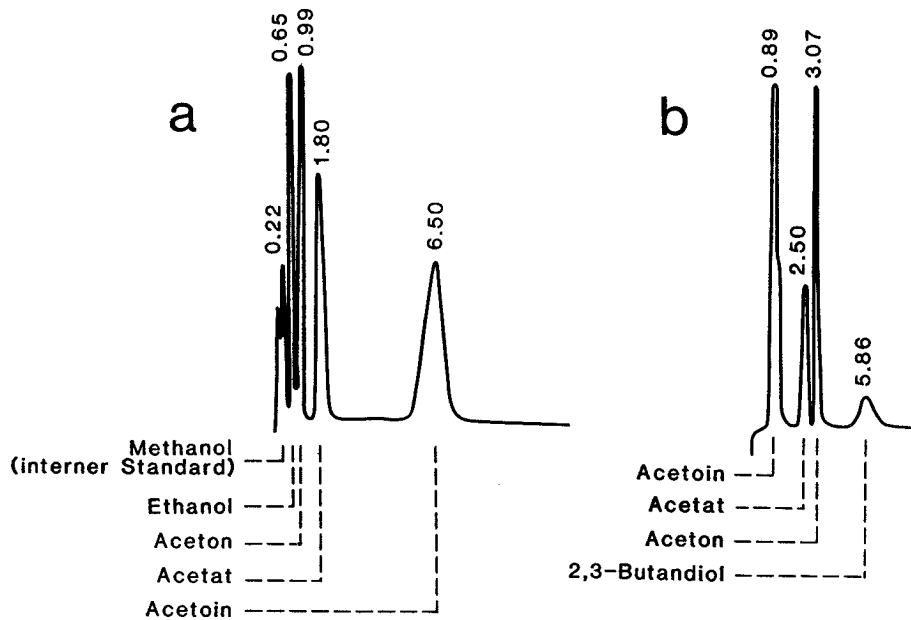
Die Analysenbedingungen mit der Carbopak-Säule sind:

Säule:	0.3% Carbowax 20M + 1% H ₃ PO ₄ auf Carbopak C 60/80 mesh (Firma WGA Griesheim) in Glassäule 0.2 · 180 cm
Säulentemperatur:	170 °C
Injektortemperatur:	240 °C
FID-Temperatur:	240 °C
Trägergas:	N ₂ mit Volumenstrom 30 ml/min
Probevolumen:	1 µl

Die Analysenbedingungen mit der Poropak QS-Säule sind:

Säule:	Poropak QS, 80 - 100 mesh (Firma Waters Ass.) in Glassäule ¼ inch · 91.5 cm
Säulentemperatur:	155 °C
Injektortemperatur:	250 °C
FID-Temperatur:	230 °C
Trägergas:	N ₂ mit Volumenstrom 30 ml/min
Probevolumen:	1 µl

Die Identifizierung der aufgezeichneten Peaks über die Retentionszeit und quantitative Auswertung über die Peakfläche geschieht anhand unter gleichen Bedingungen eingespritzter Eichsubstanzen. Eichchromatogramme von der Carbopak- und der Poropaksäule zeigt Figur 24.



Figur 24: Eichchromatogramme der Gaschromatographie
 Retentionszeit in (min), alle Konzentrationen 25 mmol/l
 a) Poropak-Säule, b) Carboxapak-Säule

4.7. Xylanhydrolyse und HPLC-Analytik der Abbauprodukte

Zur Charakterisierung des Xylans und der gewonnenen Xylanase wird eine Säure- und eine enzymatische Hydrolyse des Xylans durchgeführt (nach Conrad, 1983).

4.7.1. Säurehydrolyse

Ansatz:

100 mg Xylan
 5.0 ml 0.5 N H₂SO₄

Der Ansatz wird 8 Stunden im Kochbad inkubiert und anschließend mit BaCO₃ neutralisiert. Das ausfallende BaSO₄ und der nicht hydrolysierte Anteil des Xylans werden in einer Zentrifuge bei 15000 g abgetrennt. Der klare Überstand wird nochmals sterilfiltriert und dann mittels HPLC analysiert (vergl. Abschnitt 4.7.2)

4.7.2. Enzymatische Hydrolyse

Zur Untersuchung des enzymatischen Xylanabbaus wird eine Xylansuspension mit einer mittels Ultrafiltration aufkonzentrierten Kulturfiltratsprobe für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Reagentien und Inkubationsbedingungen entsprechen überwiegend den in Abschnitt 4.2.1. zum Xylanasetest beschriebenen.

Inkubationsansatz:

200 mg ultraschallbehandeltes Xylan, suspendiert in

8.8 ml 0.025 M Acetatpuffer pH 6.0

1.2 ml aufkonzentriertes Enzym (ca. 250 U/ml)

Der Ansatz wird in einem auf 40 °C temperierten Glasgefäß auf einem Magnetrührer mit ca. 250 Upm gerührt. Zu bestimmten Zeiten werden Proben von 0.5 ml aus dem Reaktionsgefäß entnommen und die enzymatische Reaktion durch kurzes Erhitzen auf 100 °C im Kochbad gestoppt. Nach Zentrifugation und Sterilfiltration wird die Probe im HPLC analysiert.

Die chromatographische Trennung findet mit zwei hintereinander montierten Aminex HPX-42 Säulen (300 · 0.78 mm, Bio-Rad) und einer Aminex Q 150 S Vorsäule (40 · 0.46 mm, Bio-Rad) in einem Hewlett-Packard 1084 B Flüssigchromatograph statt. Die Detektion der Peaks im Auslauf übernimmt ein auf 35 °C temperiertes Differential-Refraktometer der Firma Knauer.

Die analytischen Bedingungen der Trennung sind folgende:

Ofentemperatur : 80 °C

Elutionsmittel : entgastes Wasser, 80 °C

Fließrate : 0.5 ml/min

Laufzeit einer Probe : ca. 45 min

Die Identifizierung der aufgezeichneten Peaks über die Retentionszeit und quantitative Auswertung über die Peakfläche geschieht anhand unter gleichen Bedingungen aufgetragener Eichsubstanzen (vergl. Figur 29 auf Seite 79).

5. ORGANISMEN UND KULTUR- BEDINGUNGEN

5.1. Organismen

Folgende Organismen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Xylanase oder Xylosidase zu produzieren:

Bakterien:

Bacillus amyloliquefaciens DSM 7
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1061
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1062
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1063
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1064
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1065
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1066
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1067
Cellulomonas spec. DSM 20108

Schimmelpilze:

Trichoderma reesei QM 9414
Trichoderma harzianum 4
Trichoderma lignorum spec.
Trichoderma koningii IFGB 0302
Aspergillus niger CBS 110.42
Chaetomium cellulolyticum ATCC 32319

5.2. Stammhaltung

Zur Stammhaltung werden die Bakterien auf Agar-Platten, die mit Bacto-Nutrient-Agar (Difco) hergestellt werden, im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt und im Abstand einiger Wochen überimpft. Der Nutrient-Agar hat folgende Zusammensetzung:

3 g Fleischextrakt
 5 g Pepton
 15 g Agar

ad 1000 ml dest. H₂O

Die Schimmelpilzkulturen werden in Schrägagar-Röhrchen aufbewahrt und ebenfalls im Abstand einiger Wochen überimpft. Der verwendete Agar hat folgende Zusammensetzung:

20 g Malzextrakt
 20 g Glucose
 1 g Pepton
 1 g Hefeextrakt
 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 18 g Agar

ad 1000 ml dest. H_2O

5.3. Medienzusammensetzung und Kulturbedingungen

5.3.1. Schüttelkolbenkulturen und Vorkultur

Da die untersuchten Organismen (Schimmelpilze und Bakterien) unterschiedliche Nährstoffanforderungen haben, resultiert zunächst eine größere Zahl unterschiedlicher Nährmedien. Das Nährmedium zur Anzucht der Vorkultur und zur Durchführung anfänglicher Schüttelkolbenversuche mit *Bacillus amyloliquefaciens* hat folgende Zusammensetzung (nach Wicker, 1984):

20 g Glycerin (oder 20 g einer anderen C-Quelle)
 1 g Hefeextrakt
 2 g NaNO_3
 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$
 20 ml 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0

ad 1000 ml mit 0.05 M Tris-Maleat-Puffer pH 7.0

Da der ursprünglich allein verwendete Phosphatpuffer mit einer Konzentration im Medium von 0.02 mol/l eine zu geringe Pufferkapazität hat, eine größere Phosphatkonzentration aber wegen der Gefahr des Ausfallens von Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Phosphaten unerwünscht ist, wird zusätzlich zum Phosphatpuffer ein Tris-Maleat-Puffer folgender Zusammensetzung verwendet:

4.84 g TRIS (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)
 4.64 g Maleinsäure
 x ml 1 N NaOH für pH 7.0

ad 1000 ml dest. H₂O

Für die Schüttelkolbenversuche mit *Cellulomonas spec.* wird folgendes Medium verwendet (nach Schimz, 1983):

20.0 g Xylan aus Haferspelzen
 5.5 g KH₂PO₄
 4.0 g (NH₄)₂SO₄
 0.5 g NaCl
 0.5 g MgSO₄ · 7 H₂O
 10 mg Thiamin
 1 mg Biotin
 10 ml Wolfe's Mineralienlösung
 x ml NaOH für pH 6.8

ad 1000 ml dest.H₂O

Die Schüttelkolbenversuche mit den Schimmelpilz-Organismen (*Trichoderma*, *Aspergillus* und *Chaetomium*) werden mit folgendem Medium durchgeführt (nach Conrad, 1983; Fähnrich, 1983):

20.0 g Xylan aus Haferspelzen
 2.0 g KH₂PO₄
 2.0 g (NH₄)₂SO₄
 0.3 g MgSO₄ · 7 H₂O
 0.4 g CaCl₂
 0.3 g Harnstoff (nur *Chaetomium*)
 1.0 g Hefeextrakt
 5.0 mg FeSO₄ · 7 H₂O
 1.6 mg MnSO₄ · 1 H₂O
 1.4 mg ZnSO₄ · 7 H₂O
 3.7 mg CoCl₂
 x ml NaOH für pH 6.0

ad 1000 ml mit dest. H₂O

Für Schüttelkolbenversuche werden 100 ml Medium in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Einbuchtungen (Schikanen) und Wattestopfen 20 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Zur Vorkultur werden 200 ml Medium in speziellen 1000 ml-Erlenmeyerkolben mit Entnahmerohr und Anstechverbindung 20 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Eine CaCl₂-Lösung mit 7 g/l CaCl₂ wird getrennt autoklaviert und 1 ml / 100 ml Medium nach dem Erkalten dem sterilen Medium zugefügt.

Die sterilen Schüttelkolben werden mit 1 ml Zellsuspension aus einem vorangegangenen Schüttelkolben beimpft und bei 37 °C und 100 U/min auf einer Schüttelmaschine kultiviert.

5.3.2. Fermenterkultur

Da der pH-Wert der Kultur während der Fermentation durch die Regelung konstantgehalten wird, werden die im Vorkulturmedium verwendeten Puffer nicht gebraucht. Zur Stabilisierung der in den großen Voratsgefäßen teilweise über mehrere Tage gemeinsam enthaltenen Calcium-, Magnesium- und Phosphationen wird die schwach chelatisierende Zitronensäure zugegeben. Das Fermentationsmedium hat folgende Zusammensetzung:

20	g Glycerin
1	g Hefeextrakt
6	g (NH ₄) ₂ SO ₄
2.7	g KH ₂ PO ₄
1.7	g NaNO ₃
10	mg FeSO ₄ · 7 H ₂ O
5	mg MnSO ₄ · 1 H ₂ O

ad 900 ml dest. H₂O

getrennt:

0.5	g Mg(NO ₃) ₂ · 7 H ₂ O
0.5	g Zitronensäure
70	mg CaCl ₂ · 2 H ₂ O

ad 100 ml dest. H₂O

Bei den Versuchen zur Regelung des Redoxpotentials enthielt das Medium außerdem je 0.08 g/l der Antischaummittel Polypropylenglycol 2000 (Roth) und Silicon-Antischaum-Emulsion M 30 (Serva).

Das Medium wird entweder direkt im Fermenter durch dessen in-situ-Sterilisation, in 18 l fassenden Glasflaschen mit Gummistopfen im Autoklaven oder in einem 72 l fassenden Stahlrührkessel, durch dessen Doppelmantel Heißdampf geleitet wird, 60 min bei 121 °C sterilisiert. CaCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ und die Zitronensäure werden in kleineren Glasflaschen gesondert autoklaviert und nach dem Abkühlen mit einer Schlauchpumpe in die größeren Gefäße gepumpt.

Eine frische, in exponentiellem Wachstum befindliche Vorkultur wird mit einer Schlauchpumpe über eine Anstechverbindung aus dem Schüttelkolben in das sterile Medium des Fermenters gepumpt. Im Fermenter herrschen, wenn nicht anders angegeben, konstant folgende Kulturbedingungen:

Arbeitsvolumen : 4.0 l
Temperatur : 37 °C
pH-Wert : 6.0
Drehzahl : 0 min^{-1}
Belüftung : 6 l/min (1.5 VVm)
Innendruck : 0.2 bar Überdruck

Wird die Fermentation kontinuierlich betrieben, wird der Kultur entweder von Anfang an oder nach einer anfänglichen Batchphase mit konstantem Volumenstrom F (ml/h) frisches Medium zugeführt. Dazu wird das Substrat-Voratsgefäß über eine Anstechverbindung mit dem Fermenter verbunden und das Medium mit einer entweder geregelten oder ungeregelten Schlauchpumpe durch eine Sterilfalle in den Fermenter gepumpt. Die Niveau-Regelung des Fermenters sorgt durch einen entsprechend großen Ablauf von Kulturbrühe aus dem Fermenter für ein konstantes Arbeitsvolumen V (l).

6. ERGEBNISSE

6.1. Vorversuche

6.1.1. Organismenauswahl

Um einen geeigneten Organismenstamm zur fermentativen Produktion einer Xylanase und/oder einer Xylosidase zu finden, wurden zunächst eine Reihe im Institut für Biotechnologie (IBT) der KFA Jülich vorhandener Schimmelpilze und Bakterien untersucht, von denen bekannt war, daß sie xylanolytische Enzyme oder andere extrazelluläre Enzyme (z.B. Cellulasen oder Amylasen) produzieren. Zu diesen gehörten die in Abschnitt 5.1 genannten Schimmelpilze und Bakterien der Gattungen *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Cellulomonas* und *Bacillus*. Außerdem wurde ein aus der Stammsammlung des Instituts für Gärungsgewerbe Berlin (IFGB) stammender Stamm von *Trichoderma koningii*, der sich dort als guter Xylanaseproduzent erwiesen hatte (Görn, 1978), untersucht.

Kriterium für die Organismenauswahl war dabei nicht nur eine möglichst hohe Volumenaktivität (U/ml), sondern auch hohe Produktivitäten bzw. Raum-Zeit-Ausbeuten (U/(l·h)) für die Produktion der Enzyme zu erreichen.

Alle Organismen wurden zunächst in Schüttelkolben mit Haferspelzen-Xylan als C-Quelle kultiviert. Da von *Bacillus*-Stämmen bekannt ist, daß die Synthese verschiedener Exoenzyme (insbesondere Amylasen) konstitutiv sein kann (vergl. Abschnitt 2.2.2), wurde der Stamm von *Bacillus amyloliquefaciens* zusätzlich mit Glycerin als C-Quelle kultiviert.

Vor allem aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Organismen wurden die maximalen Xylanase- und Xylosidaseaktivitäten im Kulturfiltrat jeweils nach unterschiedlichen Zeiten erreicht. Tabelle 4 zeigt die maximal erreichten Enzymaktivitäten (U/ml) und die dazu benötigte Zeit t (h):

Organismus	Xylanase (U/ml)	bei t (h)	Xylosidase (U/ml)	bei t (h)
Pilze:				
<i>Trichoderma reesei</i>	16.0	144	0.06	144
<i>Trichoderma lignorum</i>	8.0	96	0.13	144
<i>Trichoderma harzianum</i>	3.5	120	0.10	144
<i>Trichoderma koningii</i>	4.3	144	n.b.	-
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	3.0	120	0	-
<i>Aspergillus niger</i>	16.5	120	0.35	120
Bakterien:				
<i>Cellulomonas spec.</i>	0.9	96	0	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4.6	72	0	-
Bac. amyl. auf Glycerin	5.8	24	0	-

Tabelle 4: Maximale Xylanase- und Xylosidaseaktivitäten (U/ml) zum Zeitpunkt t (h) (n.b.= "nicht bestimmt")

Die höchsten Xylanaseaktivitäten mit 16.5 U/ml und 16.0 U/ml wurden bei *Aspergillus niger* bzw. *Trichoderma reesei* gemessen. *Aspergillus niger* zeigte mit 0.35 U/ml auch die höchste Aktivität extrazellulärer Xylosidase.

Für beide Enzyme benötigte *Aspergillus niger* jedoch 120 Stunden um die maximalen Aktivitäten zu produzieren. Die Produktivität betrug demnach für die Xylanase 137.5 U/(l·h) und für die Xylosidase 2.9 U/(l·h). *Trichoderma reesei* benötigte sogar jeweils 144 Stunden um die maximalen Aktivitäten zu erreichen. Die Produktivitäten betragen 111 U/(l·h) und 0.4 U/(l·h) für Xylanase bzw. Xylosidase.

Bacillus amyloliquefaciens zeigte auf Xylan als C-Quelle nur eine vergleichsweise niedrige Xylanaseaktivität von 4.6 U/ml. Diese Aktivität wurde nach 72 Stunden erreicht, die Produktivität betrug demnach ca. 64 U/(l·h). Wurde *Bacillus amyloliquefaciens* dagegen auf Glycerin als C-Quelle kultiviert, konnte mit 5.8 U/ml gegenüber dem Wachstum auf Xylan eine höhere maximale Aktivität erreicht werden. Da diese in diesem Versuch bereits nach 24 Stunden vorlag, betrug die Raum-Zeit-Ausbeute 242 U/(l·h), was der höchste Wert im Vergleich der getesteten Organismen war. Bei *Aspergillus* und *Trichoderma* war zum Vergleich nach 24 Stunden noch keine Aktivität meßbar. Die Tatsache, daß *Bacillus amyloliquefaciens* auf Glycerin als einziger C-Quelle eine mindestens gleich gute Xylanaseproduktion aufweist, wie beim Wachstum auf Xylan, zeigt, daß die Xyla-

nasesynthese bei diesem Stamm konstitutiv ist, so wie es bei anderen Stämmen von *Bacillus amyloliquefaciens* für die Amylasebildung gezeigt wurde (vergl. Abschnitt 2.2.2).

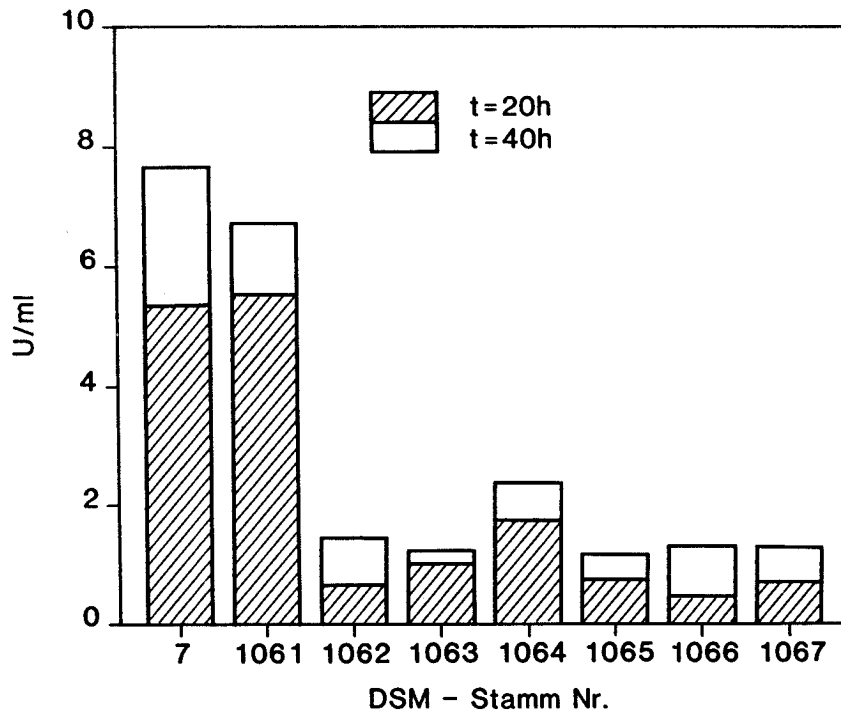
Eine extrazelluläre Xylosidaseaktivität (bezogen auf das Substrat pNPX) konnte im Kulturfiltrat von *Bacillus amyloliquefaciens* weder auf Xylan noch auf Glycerin festgestellt werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt, der bei der Auswahl des Systems Mikroorganismus/Substrat berücksichtigt werden sollte, war die Handhabung dieses Systems in der kontinuierlichen Kultur. Schimmelpilz-Kulturen führen aufgrund des dichten Mycels und der Neigung feste Pellets zu bilden, erfahrungsgemäß (Berke, 1983) zu Schwierigkeiten bei längeren kontinuierlichen Kulturen (Wandwachstum, Verstopfen von Leitungen, Empfindlichkeit gegen Scherkräfte). Weitere, nicht zu unterschätzenden Schwierigkeiten bereitet die Verwendung eines Feststoff-Substrats wie Xylan als C-Quelle und Enzyminduktor, das aufgrund der harten, kristallinen Struktur zu Abrasionen im Fermenter und zu Sedimentationen in den Substratleitungen führt (Berke, 1983).

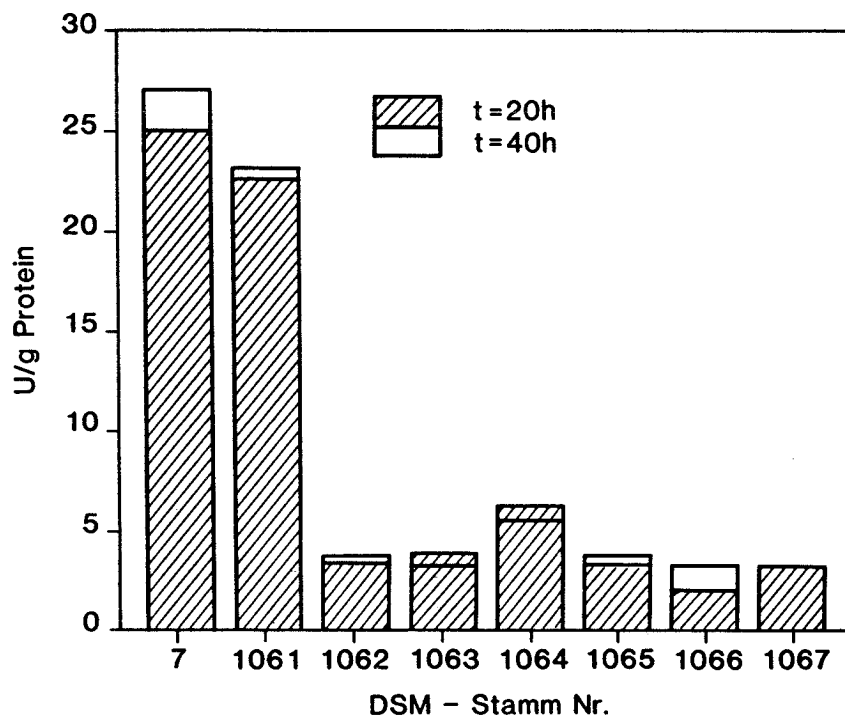
Bacillus-Stämme zeigen dagegen wie die meisten anderen Bakterien keine oder nur eine geringe Mycelbildung (Buchanan & Gibbons, 1974). Sie sind dadurch unempfindlicher gegen hohe Scherkräfte und zeigen im Vergleich zu vielen submersen Schimmelpilzkulturen bessere Eigenschaften bezüglich des Fließverhaltens der Kulturbrühe (Reuß, 1979a). Bei der Fermentation mit löslichen Substraten werden zudem die oben genannten Schwierigkeiten bei der Verwendung von Feststoff-Substraten vermieden.

Das System *Bacillus*/Glycerin schien daher unter den verglichenen Organismen neben dem Vorteil des schnelleren Wachstums und der höheren Raum-Zeit-Ausbeute für Xylanase auch unter dem Gesichtspunkt der unkomplizierten Handhabung die besten Voraussetzungen für eine kontinuierliche Xylanasefermentation zu bieten.

Ein Vergleich verschiedener bei der DSM bestellter *Bacillus amyloliquefaciens*-Stämme mit dem am IBT vorhandenen Stamm DSM 7 in Schüttelkolbenversuchen mit Glycerin als C-Quelle ergab für letzteren sowohl bezüglich der Volumenaktivität (U/ml) als auch der spezifischen Aktivität (U/g Protein) die besten Resultate (Figur 25 und 26).



Figur 25: Volumenaktivitäten der Xylanase im Kulturfiltrat verschiedener *Bacillus amyloliquefaciens*-Stämme nach 20 bzw. 40 Stunden



Figur 26: Spezifische Xylanaseaktivitäten bezogen auf das Gesamt-Protein im Kulturfiltrat verschiedener *Bacillus amyloliquefaciens*-Stämme nach 20 bzw. 40 Stunden

So erreichte Stamm DSM 7 eine Xylanaseaktivität von 5.4 U/ml nach 20 Stunden und von 7.7 U/ml nach 40 Stunden Inkubation. Die Gesamtproteinkonzentration im Kulturfiltrat betrug zu diesen Zeiten 215 µg/ml bzw. 283 µg/ml, sodaß die spezifische Xylanaseaktivität nach 20 Stunden 25 U/g Protein und nach 40 Stunden 27 U/g Protein betrug. Ähnlich gute Resultate bezüglich der Xylanase zeigte nur der Stamm DSM 1061 mit 5.5 U/ml bzw. 22.5 U/g Protein nach 20 Stunden und 6.7 U/ml bzw. 23 U/g Protein nach 40 Stunden Inkubation. Alle weiteren Versuche wurden daher mit *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 durchgeführt.

6.1.2. Optimierung des Mediums

6.1.2.1. Vergleich verschiedener C-Quellen

Aus der Literatur ist bekannt, daß bei *Bacillus* auch die konstitutive Produktion extrazellulärer Enzyme einer Katabolit-Repression unterliegen kann (vergl. Abschnitt 2.2.2). Der Grad der Katabolit-Repression sollte in solchen Fällen von der verwendeten C-Quelle abhängig sein.

In einer Testreihe wurde daher die Xylanaseproduktion von *Bacillus amyloliquefaciens* bei Verwendung weiterer löslicher C-Quellen wie Glucose, Lactose, Xylose oder löslicher Stärke im Vergleich zu Glycerin untersucht. Um eine bessere Bewertung zu ermöglichen, wurden die Enzymaktivitäten auf die gleichzeitig bestimmte Biotrockenmassekonzentration (gTS/l) bezogen. Tabelle 5 zeigt die Xylanaseaktivitäten und Biomassekonzentrationen nach 24 Stunden Kultivierung in Schüttelkolben mit 20 g/l der genannten C-Quellen.

C-Quelle	Biomasse g/l	Xylanase U/ml	spez. Aktivität U/gTS
Glycerin	3.15	9.7	3.08
Glucose	3.40	9.7	2.86
Lactose	3.30	14.7	4.45
Xylose	0.33	6.5	19.70
lösl. Stärke	n.b.	8.2	-

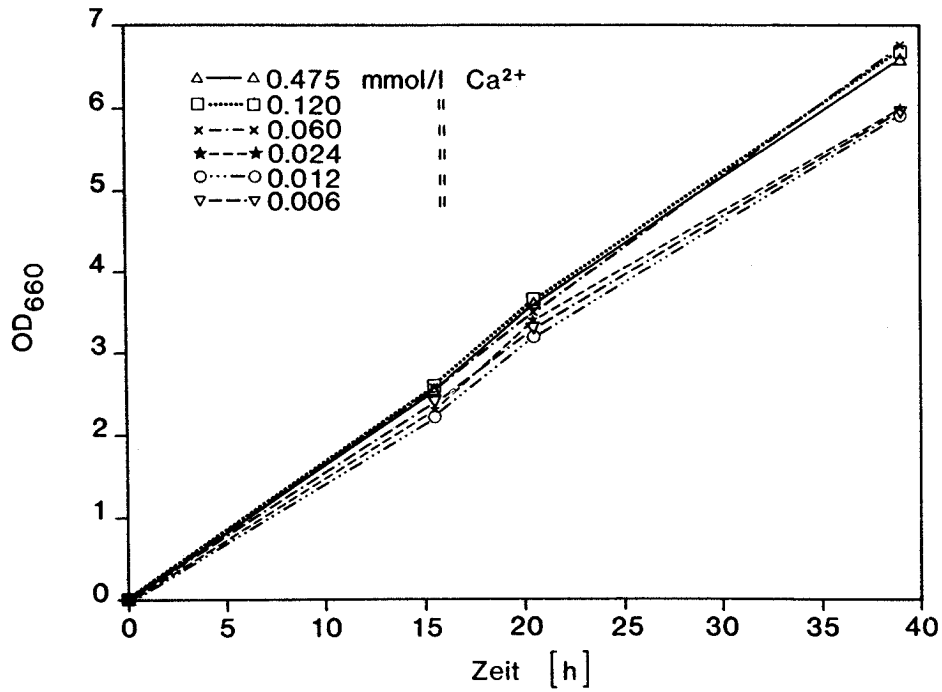
Tabelle 5: Biomasse- und Xylanaseproduktion bei verschiedenen C-Quellen

Während die Verwendung von Glucose zu etwa gleichen Ergebnissen in Bezug auf Biomasse- und Xylanasebildung wie bei Verwendung von Glycerin führte (3.08 bzw. 2.86 U/gTS), zeigte sich mit Lactose als C-Quelle bei gleicher Biomasse eine deutlich erhöhte Xylanaseaktivität (4.45 U/gTS). Bei Xylose als C-Quelle fand nur ein sehr schwaches Wachstum statt, bezogen auf die Biomasse war die Xylanaseaktivität jedoch die höchste der Testreihe (19.7 U/gTS). Die Enzymaktivitäten mit Stärke als C-Quelle lagen im Rahmen der anderen Ergebnisse, eine Messung der opt. Dichte fand aufgrund der Eigenextinktion des Mediums nicht statt.

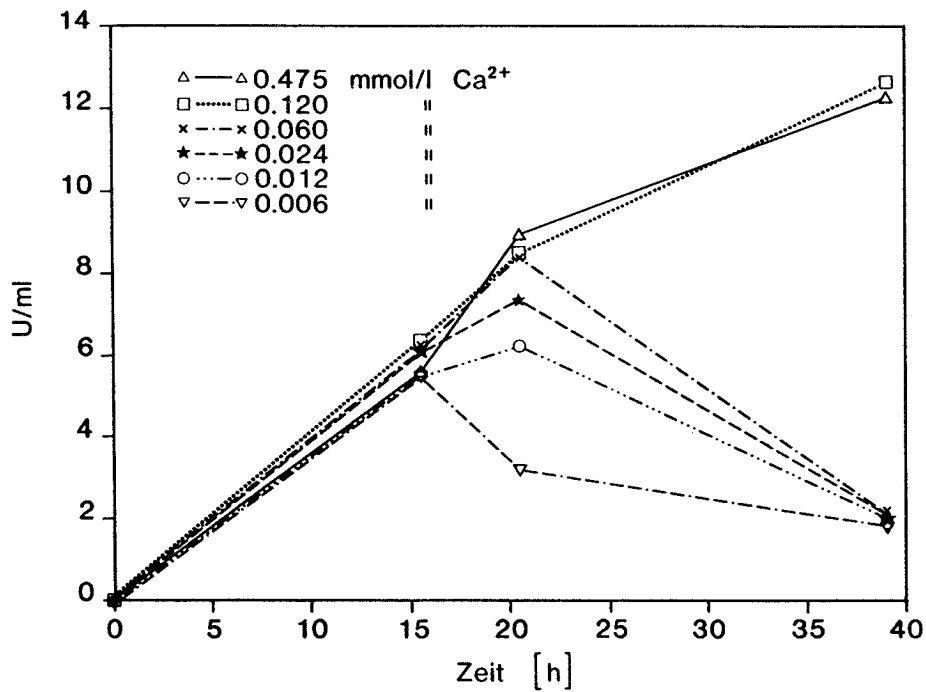
Diese Ergebnisse zeigen deutlich eine Abhängigkeit der Xylanaseproduktion von der verwendeten C-Quelle. Obwohl mit Lactose und Xylose höhere Biomasse-spezifische Xylanaseaktivitäten erreicht wurden, wurde die Verwendung von Glycerin als C-Quelle beibehalten. Gegen die Verwendung von Sacchariden als C-Quelle in dieser Arbeit sprachen vor allem praktische Gründe. So haben diese reduzierenden Substanzen einen störenden Einfluß auf den Xylanasetest, wo sie zu stark erhöhten Blindwerten führen.

6.1.2.2 Stabilisierung des Mediums

Das in ersten Versuchen verwendete Medium (nach Wicker, 1984) für *Bacillus amyloliquefaciens* unterschied sich von dem in Abschnitt 6.3. beschriebenen Medium durch Verwendung eines 0.05 M anstatt des 0.02 M Kaliumphosphat-Puffers im Schüttelkolben, sowie der entsprechend größeren Menge (6.75 g/l) KH_2PO_4 im Fermentationsmedium. Durch die höheren Phosphatkonzentrationen kam es wiederholt zum Ausfallen von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Phosphaten, insbesondere im Fermenter, wo durch Rühren und Belüften bevorzugte Kristallisationspunkte existieren. Die Rolle des Magnesiums und Phosphats für den Energiestoffwechsel der Organismen ist bekannt (Magnesium ist Cofaktor für Phosphohydrolasen und Phosphotransferasen, ATP und ADP liegen in der Zelle als Mg^{2+} -Komplexe vor (Lehninger, 1979)), die Rolle des Calciums im Stoffwechsel von *Bacillus* war jedoch unklar. Es wurden daher Versuche durchgeführt, die zeigen sollten, wie weit die Ca^{2+} -Konzentration im Medium zurückgenommen werden konnte. Eine Schüttelkolbenreihe mit Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 0.006 und 0.475 mmol/l CaCl_2 im Medium zeigte, daß das Wachstum von *Bacillus amyloliquefaciens* unbeeinflusst von der Ca^{2+} -Konzentration ist, während die Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat eine deutliche Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration zeigt (Figur 27 und 28).



Figur 27: Biomassewachstum in Abhängigkeit von verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen im Medium



Figur 28: Xylanaseproduktion in Abhängigkeit von verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen im Medium

Wie Figur 28 zeigt, ist die Xylanaseaktivität noch bis zum Zeitpunkt $t = 15$ h mit ca. 6 U/ml für alle Ca^{2+} -Konzentrationen im Medium gleich. Im Zeitraum zwischen $t = 15$ h und $t = 20$ h dagegen nimmt die Xylanaseaktivität bei 0.006 mmol/l CaCl_2 bereits ab und bei 0.012 und 0.024 mmol/l CaCl_2 verlangsamt sich die Xylanaseproduktion deutlich. Nach $t = 20$ h wird weitere Xylanase nur noch in den Kolben mit 0.120 und 0.475 mmol/l CaCl_2 produziert, während bei allen niedrigeren Konzentrationen die Xylanaseaktivität bis auf einen Minimalwert zurückgeht.

Dieses Ergebnis ermöglichte jedoch noch keine Aussage darüber, ob Calciummangel die Produktion der Xylanase verhindert, oder ob Xylanase zwar produziert wird, aber nur in Gegenwart von oder in Verbindung mit Calcium Aktivität zeigt. In einem ergänzenden Versuch wurde daher die Xylanaseaktivität einer Kultur mit 0.475 mmol/l CaCl_2 im Medium verglichen mit der Xylanaseaktivität einer Kultur ohne CaCl_2 im Medium, wobei dem Inkubationsansatz des Xylanasetests wiederum unterschiedliche CaCl_2 -Konzentrationen beigelegt wurden. Dabei zeigte sich bei zu zwei unterschiedlichen Zeiten ($t = 19$ h und $t = 24$ h) genommenen Proben bei beiden Schüttelkolben keine Abhängigkeit der gemessenen Aktivität von der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsansatz, während sich der im ersten Versuch beobachtete Effekt wiederholte (Tabelle 6):

Kolben 1:			
0.475 mmol/l CaCl_2 im Medium		t= 19 h .	t= 24 h
0.475 mmol/l CaCl_2	im Ansatz	6.7 U/ml	8.0 U/ml
0.240	" "	6.6 "	8.0 "
0.080	" "	6.8 "	8.2 "
0.020	" "	6.9 "	8.1 "
0.000	" "	6.8 "	7.9 "
Kolben 2:			
0.000 mmol/l CaCl_2 im Medium		t= 19 h	t= 24 h
0.475 mmol/l CaCl_2	im Ansatz	4.8 "	1.6 "
0.240	" "	5.0 "	1.5 "
0.080	" "	4.7 "	1.7 "
0.020	" "	5.2 "	1.4 "
0.000	" "	5.0 "	1.7 "

Tabelle 6: Unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen im Inkubationsansatz.

Aus diesen Ergebnissen geht deutlich hervor, daß zur Produktion von Xylanase mindestens Ca^{2+} -Konzentrationen von 0.12 mmol/l im Medium vorhanden sein müssen. Zur Lösung des Problems ausfallender Phosphate wurde daher nicht die Calcium- und Magnesiumkonzentration (0.475 bzw. 2.03 mmol/l) erniedrigt, sondern die Phosphatkonzentration von 0.05 M auf 0.02 M gesenkt. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß der Phosphoranteil in der Bakterientrockenmasse ca. 3% beträgt (Schlegel, 1985). Bei einer C-Quellenkonzentration von 20 g/l und einer angenommenen Ausbeute von 0.5 g Biomasse pro g C-Quelle ($Y_{X/S} = 0.5$) ist mit einer Bakterientrockenmasse von nicht mehr als 10 g/l zu rechnen, in der 300 mg (bzw. 10 mmol) Phosphor enthalten sind. Eine Phosphatkonzentration von 20 mmol/l ist zur Versorgung der Organismen folglich noch voll ausreichend.

Durch das Absenken der Phosphatkonzentration, flankiert durch den Zusatz schwach chelatisierend wirkender Zitronensäure (0.5 g/l), konnte das Ausfallen von Phosphaten im Nährmedium weitgehend verhindert werden.

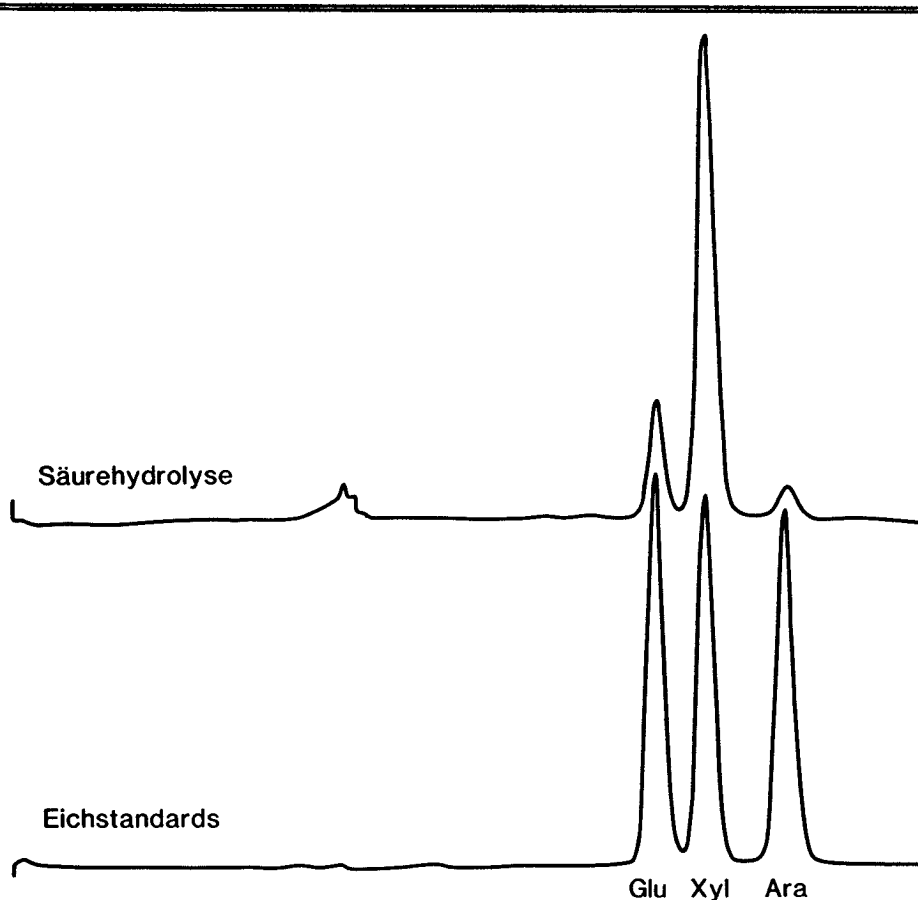
6.1.3. Charakterisierung der gewonnenen Xylanase am Substrat Xylan

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Xylanase und dem Substrat Xylan wurden zum einen die enzymatische Hydrolyse des Xylans und zum anderen der Einfluß der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität untersucht.

6.1.3.1. Saure und enzymatische Xylanhydrolyse

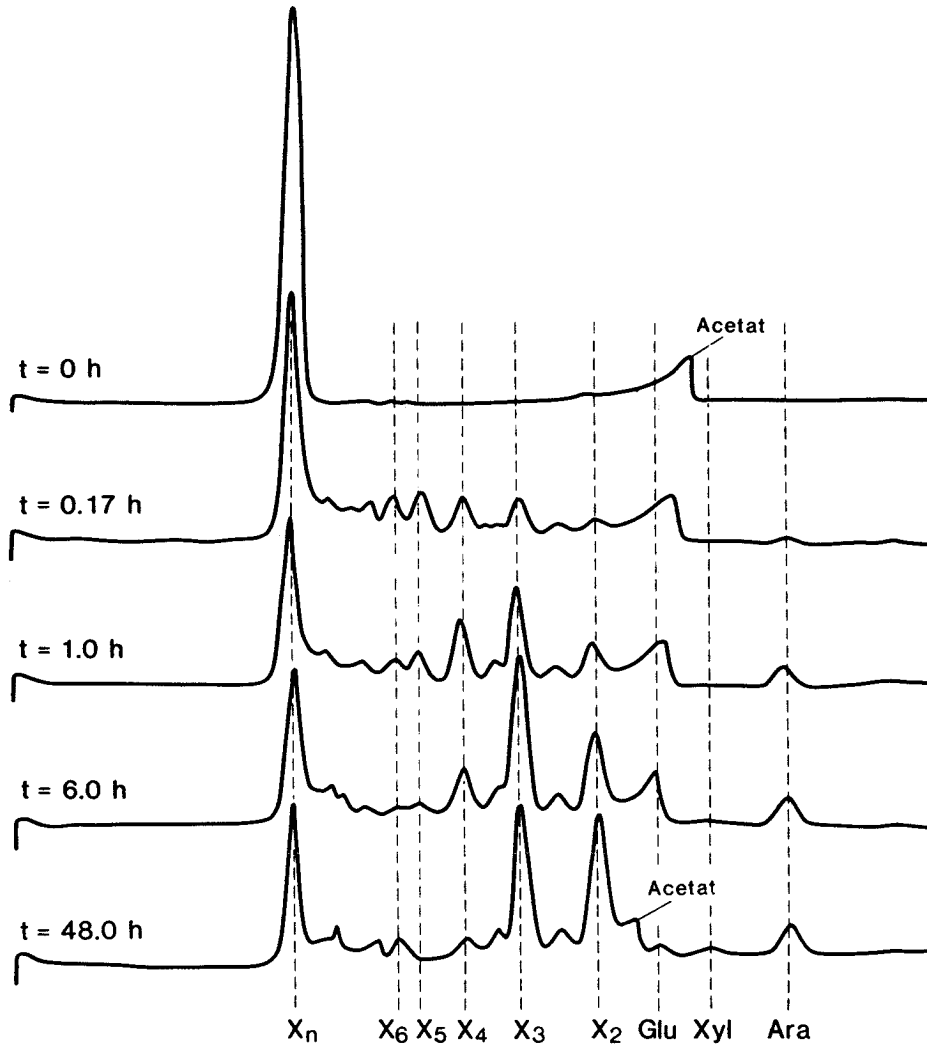
Um zu untersuchen aus welchen Komponenten zu welchen Anteilen das Xylan aufgebaut ist, wurde vor der enzymatischen Xylanhydrolyse eine Säurehydrolyse des verwendeten Haferspelzenxylans durchgeführt. Dabei ergab sich folgende Zusammensetzung (Figur 29):

Xylose.....	66.1%
Glucose.....	16.0%
Arabinose.....	8.1%
Wasser.....	4.1%
nicht hydrolysierbar:	5.7%



Figur 29: Chromatogramm der Produkte der Säurehydrolyse des Xylans, Vergleich mit Eichstandards von Glucose, Xylose und Arabinose

Da Xylane i.a. keine Glucose enthalten, rührt der sehr hohe Glucoseanteil wahrscheinlich von einer im Xylanpräparat enthaltenen Verunreinigung (Stärke oder Glucan) her.



Figur 30: Chromatogramme der Produkte der enzymatischen Hydrolyse des Xylans nach unterschiedlichen Inkubationsdauern

Figur 30 zeigt die HPLC-Chromatogramme des löslichen Anteils der Abbauprodukte der enzymatischen Hydrolyse des Haferspelzenxylans. Die Proben wurden dem Inkubationsansatz zu den Zeitpunkten $t = 10$ min, 1 h, 6 h und 48 h entnommen. Zum Vergleich ist das Chromatogramm des in Acetat-Puffer suspendierten Xylans vor der Inkubation ($t = 0$) dargestellt. Deutlich ist das rasche Entstehen von Xylooligomeren bis zum Polymerisationsgrad von drei ($X_3 =$ Xylotriose) sowie das frühe Auftauchen der Arabinose zu erkennen. Nach 10 min (0.17 Stunden) ist dagegen nur wenig Xylobiose und gar keine Xylose vorhanden. Nach 6 Stunden liegt der größte Teil der löslichen Abbauprodukte entweder in Form nicht

weiter abbaubarer Grenzpolymere oder als Xylotriase vor. Nur außerordentlich langsam entsteht neben der Xylotriase die Xylobiose. Da gleichzeitig nur sehr geringe Mengen Xylose entstehen und auch die Xylo-tetraose nur langsam abgebaut wird, ist es wahrscheinlich, daß die Xylanase von *Bacillus amyloliquefaciens* Xylotriase und -tetraose nicht direkt spalten kann, sondern komplizierte Umwege über kombinierte Auf- und Abbaureaktionen beschreiten muß. Dieser Befund entspricht auch dem von Panbangred et al. (1983) beschriebenen Mechanismus des Xylanabbaus mit einer Xylanase aus *Bacillus pumilis* (vergl. Abschnitt 2.5.2). Entsprechend der Einteilung von Reilly (1981) läßt sich die hier untersuchte Xylanase eindeutig als Endoxylanase charakterisieren (vergl. Abschnitt 2.5.2).

Während die bei der Säurehydrolyse freigesetzte Arabinosemenge etwa in gleicher Größenordnung auch bei der enzymatischen Hydrolyse freigesetzt wird, ist das für den bei der Säurehydrolyse freigesetzten Glucoseanteil nicht der Fall. Da bekannt war, daß in dem verwendeten Enzympräparat auch gleichzeitig eine Amylase enthalten war, dürfte es sich bei der Verunreinigung nicht um eine Stärke, sondern eher um ein von der Amylase nicht abbaubares Glucan handeln.

Nach 48 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt war noch nichtmal die Hälfte der zwischendurch angereicherten Xylotriase abgebaut worden. Der Anteil des nicht abgebauten und noch als Feststoff vorliegenden Xylans betrug nach 48 Stunden noch etwa 48% der ursprünglich eingesetzten Menge, was wahrscheinlich zum einen an der mit der Zeit nachlassenden Enzymaktivität lag, zum anderen daran, daß nach Abbau der leichter hydrolysierbaren Partien die kristallinen Bereiche des Xylanmoleküls übriggebliebenen waren.

6.1.3.2. Abhängigkeit der Xylanaseaktivität von der Substratkonzentration

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten soll im allgemeinen bei Substratkonzentrationen erfolgen, die groß genug sind, um eine Substratsättigung des Enzyms zu gewährleisten. Nach der von Michaelis und Menten (1913) postulierten Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit V enzymkatalysierter Reaktionen von der Substratkonzentration S gilt:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_M + S} \quad [\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})] \quad (\text{Gl. 31})$$

Nur bei Substratsättigung ($S \gg K_M$) ist die enzymatische Reaktion unabhängig von der Substratkonzentration (Reaktion nullter Ordnung) und erreicht ihre maximale Enzymaktivität V_{\max} (Bisswanger, 1979). Nach

einer Faustformel liegt Substratsättigung vor, wenn die Substratkonzentration mindestens den zehnfachen Wert der Michaelis-Menten-Konstanten K_M (g/l) aufweist.

Da das Substrat Xylan als suspendierter Feststoff nur eine verhältnismäßig kleine spezifische Oberfläche hat, ist nicht sichergestellt, daß es sich in einem, bezogen auf die Xylanase, erforderlichen Überschuß befindet. Eine erhebliche Abhängigkeit der meßbaren Xylanaseaktivität vom verwendeten Substrat und vor allem auch von der Enzymverdünnung wird auch von Khan et al. (1986) beschrieben.

Zur Ermittlung der reaktionskinetischen Konstanten V_{max} und k_M des Systems Xylan/Xylanase wurde zunächst ein Xylanasetest mit einer Kulturfiltratprobe mit unterschiedlichen Xylankonzentrationen zwischen 5 und 50 mg/ml im Testansatz durchgeführt. Dabei war für jeweils steigende Xylankonzentrationen ein Anstieg der freigesetzten reduzierenden Zucker zu beobachten (Tabelle 7). Eine Xylankonzentration von 50 mg/ml reichte daher zum Einstellen der Substratsättigung offensichtlich noch nicht aus. Da sich höherkonzentrierte Xylansuspensionen aufgrund der stark steigenden Viskosität jedoch nicht herstellen lassen, wurde zu dem "Trick" gegriffen, die Substratsättigung des Enzyms nicht durch Erhöhung der Substratkonzentration sondern durch Verringerung der im Test eingesetzten Enzymmenge bei gleichbleibender Substratkonzentration zu erreichen. Durch diese Verfahrensweise lassen sich auch solche Substrat/Enzym-Verhältnisse einstellen, die durch die begrenzte Suspendierbarkeit des Xylans nicht erreichbar sind.

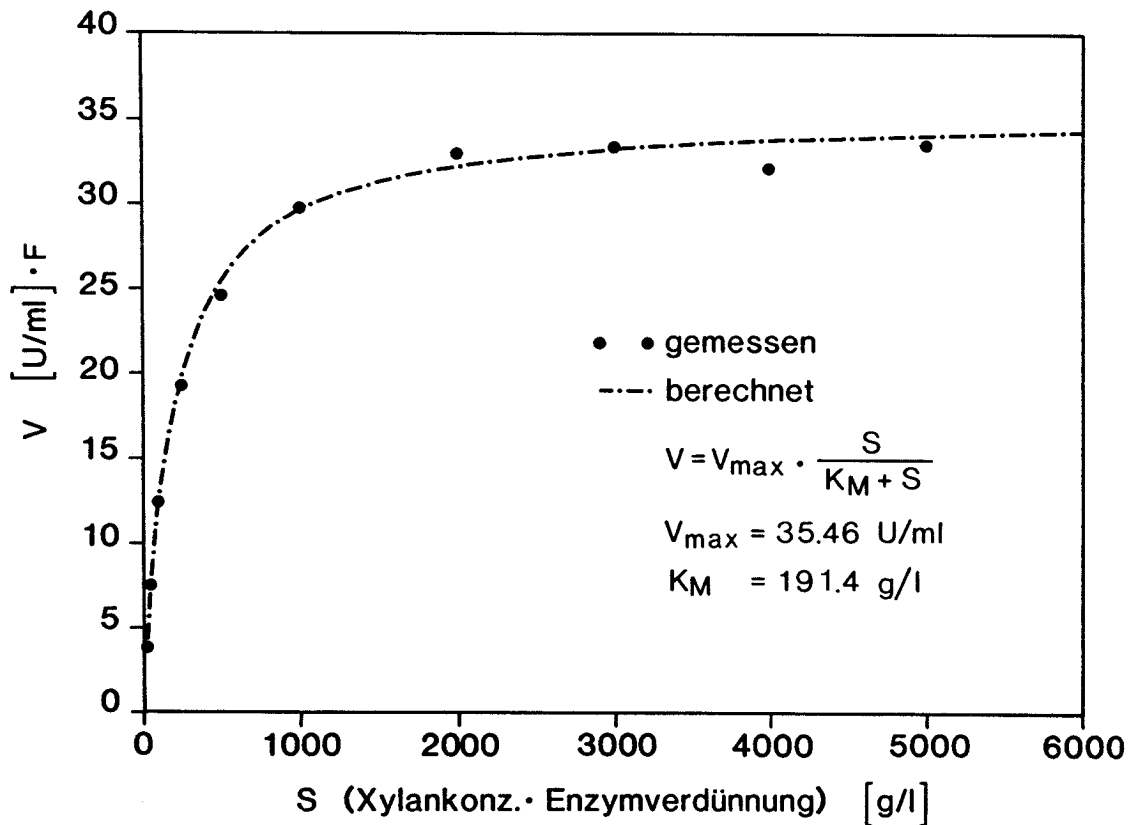
Xylan (g/l):	5	15	25	50
Xylose (mmol/l):	0.387	0.899	1.315	1.921
Aktivität (U/ml):	3.9	9.0	13	19

Tabelle 7: Konzentrationen freigesetzter reduzierender Zucker (als Xylose) und resultierende Xylanaseaktivitäten bei unterschiedlichen Xylankonzentrationen im Testansatz nach 20 min Inkubation

Es wurde daher eine zweite Testreihe durchgeführt, bei der die Xylankonzentration im Test jeweils 25 mg/ml betrug und die Enzymprobe zwischen unverdünnt und 1:200 verdünnt eingesetzt wurde. Multipliziert man die nach 20 min Inkubation erhaltenen Enzymaktivitäten und die Xylankonzentration von 25 mg/ml mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor F , so erhält man die Enzymaktivitäten für eine Testreihe mit simulierten Xylankonzentrationen von 25 bis 5000 mg/ml (Tabelle 8):

Enzym- Verdünnung		simulierte Xylankonz. (25 mg/ml)·F	gemessene Aktivität U/ml	Xylanaseaktivität bez. auf Originalverd. (U/ml)·F
1:F	%			
1:1	100	25	3.874	3.9
1:2	50	50	3.782	7.6
1:4	25	100	3.128	12.5
1:10	10	250	1.934	19.3
1:20	5	500	1.234	24.7
1:40	2.5	1000	0.746	29.8
1:80	1.25	2000	0.412	33.0
1:120	0.83	3000	0.279	33.5
1:160	0.63	4000	0.201	32.2
1:200	0.50	5000	0.168	33.6

Tabelle 8: Abhängigkeit der Xylanaseaktivität von der Probenverdünnung, Xylankonz. im Test 25 mg/ml



Figur 31: Abhängigkeit der auf Originalverdünnung bezogenen Xylanaseaktivität von der simulierten Substratkonzentration, Meßwerte und berechnete Kurve

Eine Auftragung der auf die Originalverdünnung bezogenen Xylanaseaktivitäten gegen die simulierte Xylankonzentration läßt sich hervorragend durch die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 31) beschreiben (Figur 31). Für die kinetischen Konstanten K_M und V_{max} ergaben sich durch nichtlineare Regression nach Nelder-Mead folgende Werte:

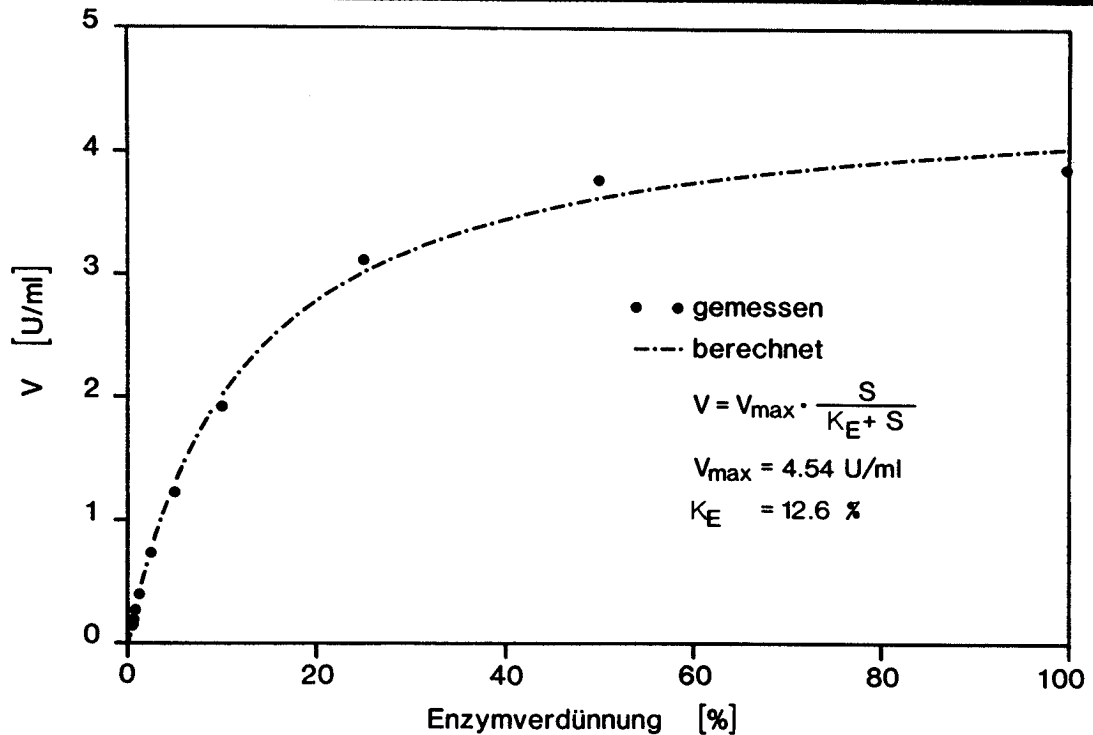
$$\begin{aligned}V_{max} &: 35.46 \text{ U/ml} \\K_M &: 191.4 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

Die V_{max} -Angabe von 35.46 U/ml ist somit die echte Aktivität der verwendeten Enzymprobe, für die unter normalen Xylanasetestbedingungen mit einer Probeverdünnung von 1:10 und einer Xylankonzentration von 20 mg/ml nur eine Aktivität von 15.4 U/ml ermittelt wurde.

Trägt man in einer weiteren Darstellung die gemessene Xylanaseaktivität über die Enzymverdünnung (%) auf (Figur 32), so wird zusätzlich deutlich, daß die Xylanase bei geringen Enzymverdünnungen (100 und 50 %) bereits ihrerseits in einer Sättigung gegenüber dem Substrat vorliegt. Durch nichtlineare Regression nach Nelder-Mead ergeben sich bei einer Substratkonzentration von 25 mg/ml für V_{max} und die Enzymsättigungskonstante K_E folgende Werte:

$$\begin{aligned}V_{max} &: 4.54 \text{ U/ml} \\K_E &: 12.6 \% (= \text{Verdünnung } 1 : 7.9)\end{aligned}$$

Die Werte der Sättigungskonstanten K_M und K_E entsprechen sich dabei deutlich: Eine Enzymverdünnung von 1 : 7.9 ($\approx K_E$) entspricht nach Tabelle 8 einer simulierten Xylankonzentration von 197.5 mg/ml, der berechnete Wert von K_M beträgt 191.4 mg/ml.



Figur 32: Abhängigkeit der gemessenen Xylanaseaktivität von der Enzymverdünnung, Meßwerte und berechnete Kurve

Die aufgezeigten Zusammenhänge verdeutlichen ein grundlegendes Problem des Xylanase-Tests: Wendet man die Faustformel an, daß für den Zustand der Substratsättigung die Substratkonzentration mindestens den zehnfachen Wert von K_M haben soll, so müßte man für den Xylanase-Test, wollte man die Probe unverdünnt einsetzen, theoretisch mindestens 2000 mg/ml Xylan suspendieren. Die Alternative wäre, die Enzymproben für den Test mindestens 1:100 zu verdünnen (siehe Tabelle 8), was einer Substratkonzentration von 2000 mg/ml entsprechen würde. Die Erfahrung zeigte jedoch, daß man bei dieser Verdünnung gerade bei von Probe zu Probe sehr unterschiedlichen Enzymaktivitäten leicht in den Bereich der unteren Nachweisgrenze (ca. 20 µg/ml) der Zuckerbestimmung nach Nelson & Somogyi gerät.

Als Kompromiß wurde daher eine allgemeine Probenverdünnung von 1:10 beibehalten. Da man sich dabei nicht im Bereich der Substratsättigung befindet, sind die Aktivitätsangaben für Proben mit geringer Xylanaseaktivität relativ höher, als die Aktivitätsangaben für Proben mit hoher Xylanaseaktivität.

6.2. Batchfermentation

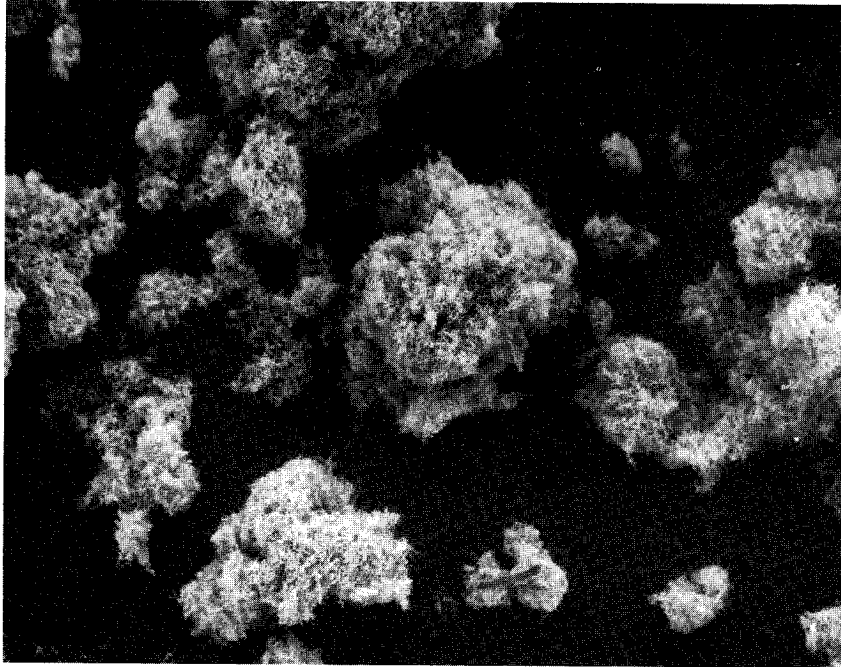
In einer Serie von Batchfermentationen sollte untersucht werden, an welche Wachstumsphase die Produktion der Xylanase gebunden ist.

Bei diesen Batchfermentationen trat jedoch häufig das Problem auf, daß das Wachstum der Kultur bei hohen Rührerdrehzahlen im Fermenter nur sehr gering war, sodaß die Biomassekonzentration nach einer anfänglichen Zunahme auf ca. 1 g/l stagnierte. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist möglicherweise darin zu finden, daß die Organismen in der Batchkultur stets eine ausgesprochene Neigung zur Bildung langer Ketten und dichter Flocken zeigten (Figur 33). In den ersten Stunden der Batchfermentation war im mikroskopischen Bild fast ausschließlich Wachstum in Flocken zu beobachten, im späteren Verlauf der Kultur ließ die Flockenbildung allmählich nach, sodaß der Anteil einzelner Zellen zunahm. Durch starkes Rühren wurden die Zellverbände innerhalb der Flocken und Ketten wahrscheinlich mechanisch geschädigt, sodaß nur schwaches Wachstum resultierte.

Gutes Wachstum der Organismen konnte dagegen stets beobachtet werden, wenn die Kultur nicht durch das Rührwerk, sondern durch starke Belüftung (6 l/min = 1.5 VVM) durchmischt wurde. Alle weiteren Batchfermentationen wurden daher unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die Folge dieses Verfahrens ist jedoch ein trotz des großen Luftdurchsatzes sehr schlechter Sauerstoffeintrag OTR aus der Gasphase in die Flüssigkeit. Das hat wiederum zur Folge, daß der in der Kulturflüssigkeit gelöste Sauerstoff pO_2 sehr schnell abnahm, da der Sauerstoffverbrauch Q_{O_2} der Kultur mit wachsender Biomasse größer wurde, als der ohne Rühren zu erzielende Sauerstoffeintrag OTR. Nach wenigen Stunden war dadurch die Konzentration des gelösten Sauerstoffs praktisch Null, sodaß das Wachstum der Organismen durch Sauerstoffmangel limitiert wurde, lange bevor die C-Quelle Glycerin oder andere Mediumsbestandteile aufgebraucht waren.

Auch die N-Quelle $(NH_4)_2SO_4$ konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgebraucht sein. Zwar wurde keine quantitative Bestimmung durchgeführt, bei einem Stickstoffanteil in der bakteriellen Trockenmasse von ca. 10% (Schlegel, 1976) sollten 6 g/l $(NH_4)_2SO_4$ jedoch für ca. 13 g/l Biotrockenmasse reichen. Zum Zeitpunkt der Beendigung des exponentiellen Wachstums betrug die Biomassekonzentration dagegen nur ca. 1 g/l, sodaß eine N-Limitierung ausgeschlossen werden kann.

a)



b)

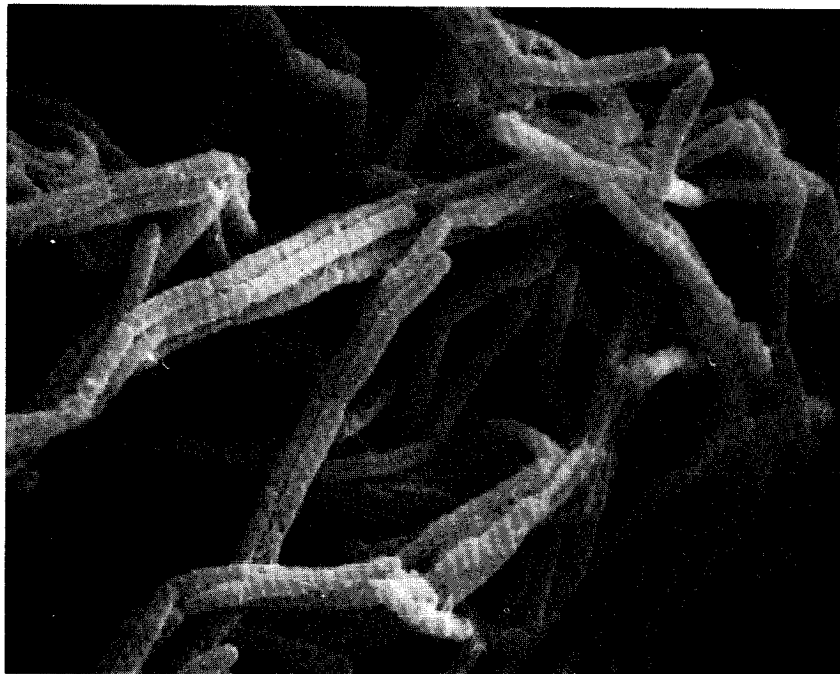
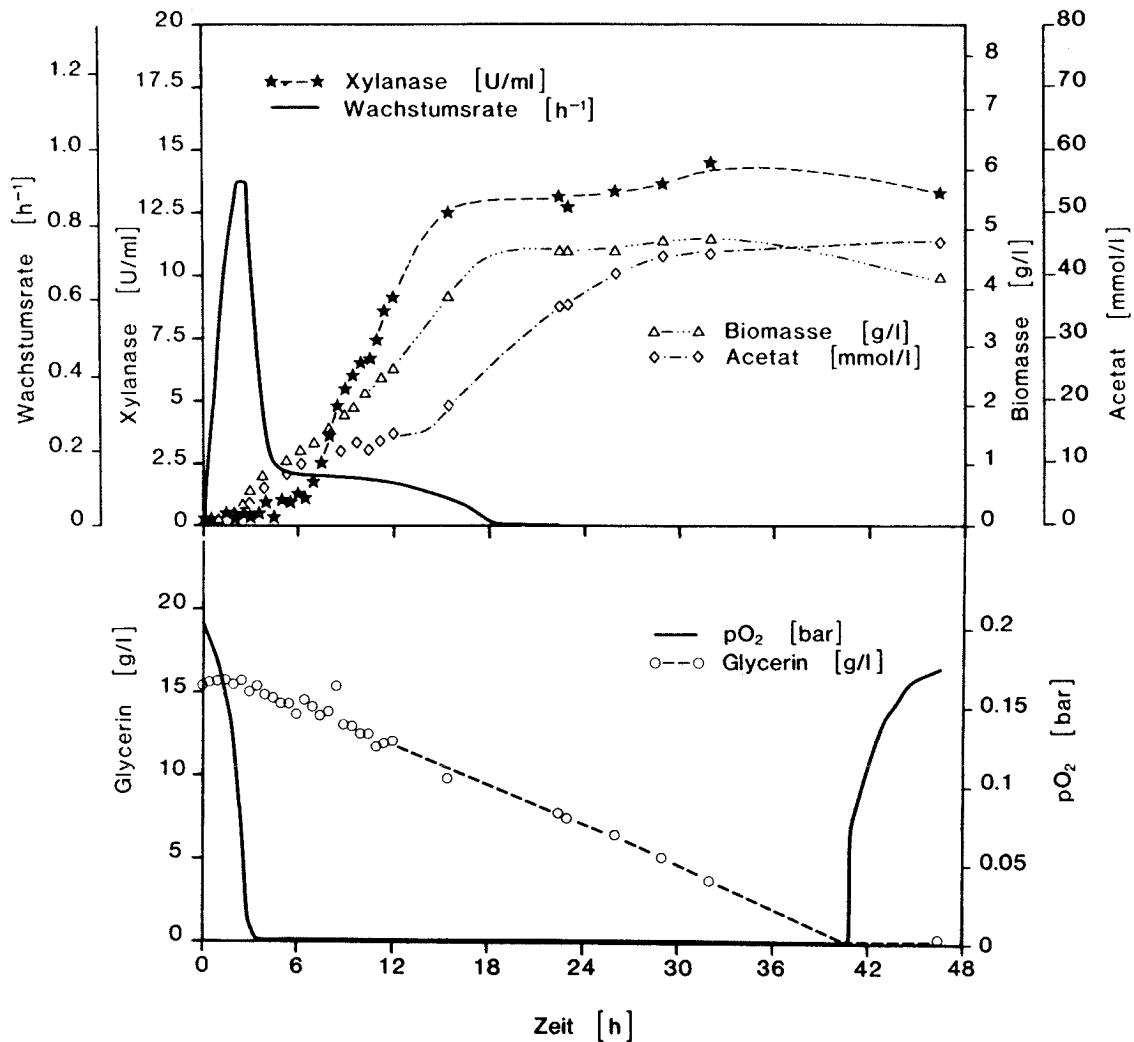


Abbildung 33: Raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Bacillus amyloliquefaciens* Stamm DSM 7 bei Wachstum mit Ketten- und Flockenbildung. Vergrößerung a: ca. 50-fach, b: ca. 5000-fach

Das Beispiel einer Batch-Fermentation zeigt Figur 34. Dargestellt sind die Konzentrationen der beiden Substrate Gelöst-Sauerstoff und Glycerin, sowie der Produkte Biomasse, Xylanase und Acetat über der Zeit. Zusätzlich ist der zeitliche Verlauf der Wachstumsrate der Kultur aufgezeigt.



Figur 34: Batchfermentation: Substratabnahme und Produktbildung unter Fermentationsbedingungen ohne Rühren

Während die Glycerinkonzentration nur langsam und annähernd linear sinkt und die C-Quelle erst nach 41 Stunden aufgebraucht ist, nimmt der Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit innerhalb von 3 Stunden bis auf Null ab und bleibt so niedrig, bis die C- und Energiequelle Glycerin verbraucht ist. Die Biomassekonzentration steigt während der ersten drei Stunden der Fermentation fast ohne Lagphase exponentiell und während der darauffolgenden 15 Stunden etwa linear an. Der Übergang vom

exponentiellen zum linearen Biomassewachstum fällt deutlich mit dem Zeitpunkt zusammen, an dem der Sauerstoffpartialdruck auf Null abgesunken ist. Die Wachstumsrate sinkt während dieses Übergangs von ihrem Maximalwert von 0.9 h^{-1} auf $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ ab. Danach ist die Kultur sauerstofflimitiert und die Zelldichte nimmt zunächst nur noch linear mit dem konstanten Sauerstoffeintrag der Belüftung zu. Nach etwa 15 Stunden verlangsamt sich die Zunahme der Biomasse und hört nach 18 Stunden ganz auf, die Wachstumsrate sinkt entsprechend auf Null.

Die Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat nimmt nicht parallel mit der Biomassekonzentration zu. Die Xylanaseproduktion beginnt erst nach etwa 6 Stunden, nachdem das exponentielle Biomassewachstum aufgrund der Sauerstofflimitierung schon beendet ist, und endet nach 15 Stunden Fermentationszeit gleichzeitig mit dem Ende der Biomassezunahme.

Schon vor dem Beginn der Sauerstofflimitierung setzt eine Akkumulation von Essigsäure im Kulturfiltrat ein, die allerdings zwischen 6 und 15 Stunden nahezu auf einem niedrigen Plateau von ca. 12 mmol/l verbleibt. Mit Abschluß von Biomasse- und Xylanaseproduktion nimmt die Essigsäurebildung dann wieder stärker zu und erreicht am Ende eine Konzentration von 45.2 mmol/l . Essigsäure ist zwischen 15 und 30 Stunden das einzige Fermentationsprodukt das weiter zunimmt.

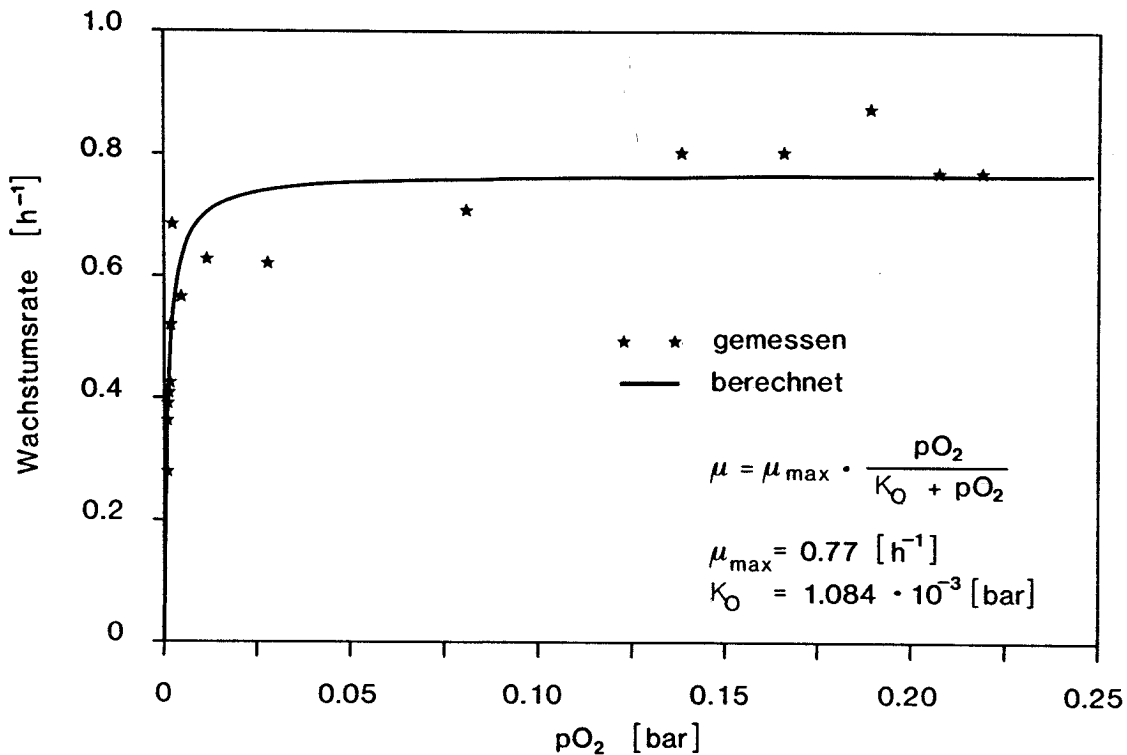
Nach diesen Ergebnissen lassen sich klar drei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen der Batch-Fermentation unterscheiden:

In der ersten Phase ist die Organismenkultur weder durch einen Mangel an Glycerin, noch an Sauerstoff limitiert und kann daher exponentiell zunehmen. Eine Xylanaseproduktion ist während des exponentiellen Wachstums nicht zu beobachten.

In der zweiten Phase ist die Kultur sauerstofflimitiert, ein exponentielles Wachstum ist daher nicht mehr möglich. Gleichzeitig setzt die Xylanaseproduktion ein, während nur eine geringe Produktion von Essigsäure stattfindet.

In der dritten Phase endet sowohl die Biomasse- als auch die Xylanaseproduktion, stattdessen findet eine verstärkte Bildung von Essigsäure statt.

Da die Produktion der Xylanase deutlich erst nach Beendigung des exponentiellen Wachstums einsetzt, ist sie eindeutig als Idiophase-Produkt gekennzeichnet, das vermutlich einer Katabolit-Repression unterliegt (vergl. Abschnitt 2.2.2).



Figur 35: Abhängigkeit der Wachstumsrate μ der Organismen vom Sauerstoffpartialdruck pO_2 in der Kulturflüssigkeit

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate vom Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit zeigt Figur 35. Dargestellt sind die aus der Biomassezunahme berechneten Wachstumsraten über den jeweils gleichzeitig gemessenen pO_2 -Werten. Außerdem ist die mit der Monod-Kinetik (vergl. Gl.12) berechnete theoretische Kurve der Sauerstoffabhängigkeit der Wachstumsrate eingetragen. Die kinetischen Konstanten μ_{\max} und K_0 wurden durch nichtlineare Regression nach Nelder-Mead aus den Meßwerten berechnet:

$$\begin{aligned}\mu_{\max} &= 0.77 \text{ h}^{-1} \\ K_0 &= 1.084 \cdot 10^{-3} \text{ bar}\end{aligned}$$

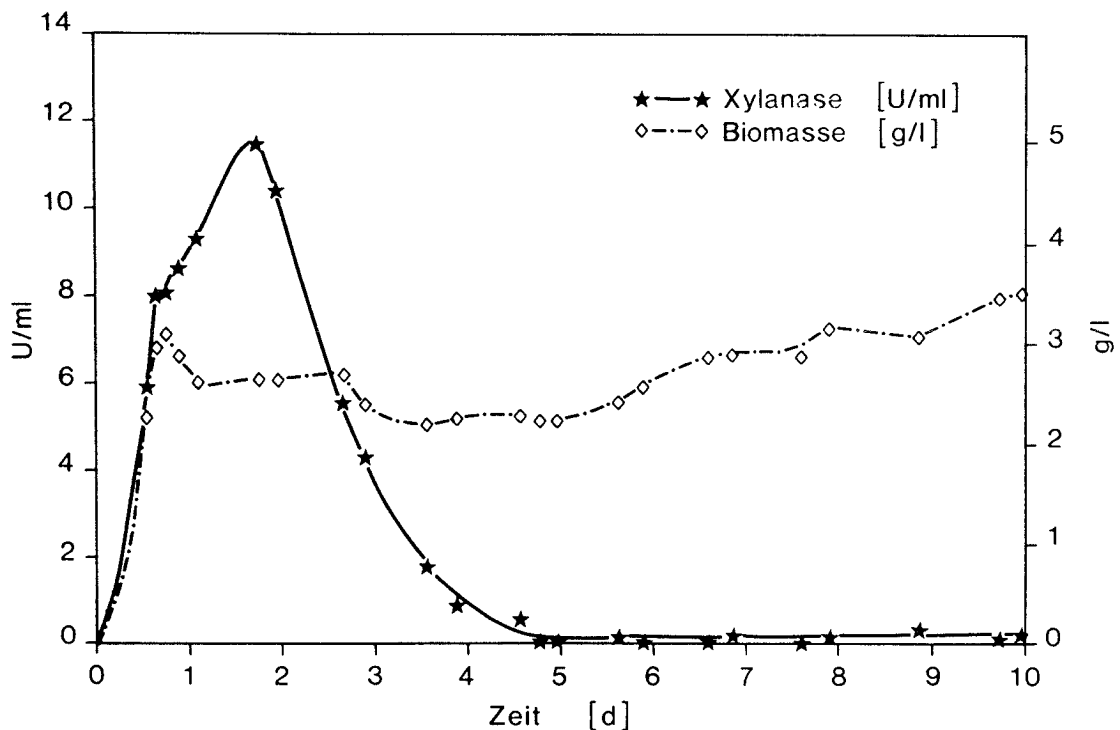
Der Wert von K_0 entspricht nach Gl. 24 bei einem Fermenter-Innendruck von 1.0 bar etwa einer Sauerstoffsättigung von 0.5%. Geht man davon aus, daß 100% pO_2 unter diesen Bedingungen ca. 7 mg/l Sauerstoff entsprechen (vergl. Abschnitt 2.4.2), dann entspricht der K_0 -Wert einer Sauerstoffkonzentration von 0.036 mg/l.

Die Sauerstofflimitierung setzt etwa bei dem zehnfachen Wert von K_0 ein, also bei ca. 5% Sättigung oder einem Partialdruck von 0.01 bar.

6.3. Kontinuierliche Fermentation mit chemostatischer Betriebsweise

Zunächst wurden alle kontinuierlichen Fermentationen im chemostatischen Betrieb bei einem konstanten pH-Wert von 6.0 und Verweilzeiten τ zwischen 10 und 20 Stunden durchgeführt. Dabei zeigte sich stets folgendes Phänomen:

Wird eine Batchfermentation, die so wie im vorigen Abschnitt beschrieben durchgeführt wurde, auf chemostatischen Betrieb umgestellt, indem mit konstantem Zu- und Ablauf eine bestimmte Verweilzeit im Fermenter erzeugt wird, so stellt sich relativ schnell eine etwa konstante Biomassekonzentration ein. Die Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat nimmt dagegen nach einer anfänglichen Phase mit hoher Xylanaseproduktion ab, sodaß nach ca. 5 bis 6 Verweilzeiten praktisch keine Xylanaseaktivität mehr nachgewiesen werden kann.



Figur 36: Kontinuierliche Fermentation im chemostatischen Betrieb bei pH 6.0, $\tau = 19$ h, (Konti-Betrieb ab $t = 16$ h (≈ 0.67 d))

Figur 36 zeigt als Beispiel eine Fermentation, die nach 16 Stunden Batchbetrieb auf kontinuierlichen Betrieb mit einer Verweilzeit von 19 Stunden umgestellt wurde. Dargestellt sind die Biomassekonzentration und die Xylanaseaktivität über der Zeit. Nach anfänglich starkem Wachstum

ging die Kultur mit Beginn des kontinuierlichen Betriebs in einen Steady-state der Biomasse über. Die während des anfänglichen Batchbetriebs beobachteten Ketten- und Flockenverbände der Organismen verschwanden während des kontinuierlichen Betriebs allmählich, sodaß nach etwa 60 Stunden praktisch nur noch einzelne Zellen vorlagen. Die Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat erreichte ihr Maximum mit 11.5 U/ml nach ca. 42 Stunden und ging danach stetig zurück, bis nach ca. 110 Stunden und der darauf folgenden Zeit nur noch etwa 0.1 U/ml meßbar waren.

Das Meßsignal der Sauerstoffelektrode in der Kulturbrühe (nicht dargestellt) war während des gesamten Zeitraums des kontinuierlichen Betriebs Null, sodaß die Kultur folglich während dieser Zeit einer Sauerstofflimitierung unterlag. Obwohl in der Literatur beschrieben ist, daß die Produktion extrazellulärer Enzyme, die einer Katabolit-Repression unterliegen, im Verlauf der kontinuierlichen Fermentation zurückgeht, überraschte das Nachlassen der Xylanaseproduktion in diesem Fall, da sich in der Batchfermentation gezeigt hatte, daß die Katabolit-Repression aufgehoben wird, sobald eine Sauerstofflimitierung der Kultur einsetzt. In den kontinuierlichen Fermentationen ließ die Xylanaseproduktion jedoch stets nach, obwohl die Organismen einer Sauerstofflimitierung unterlagen.

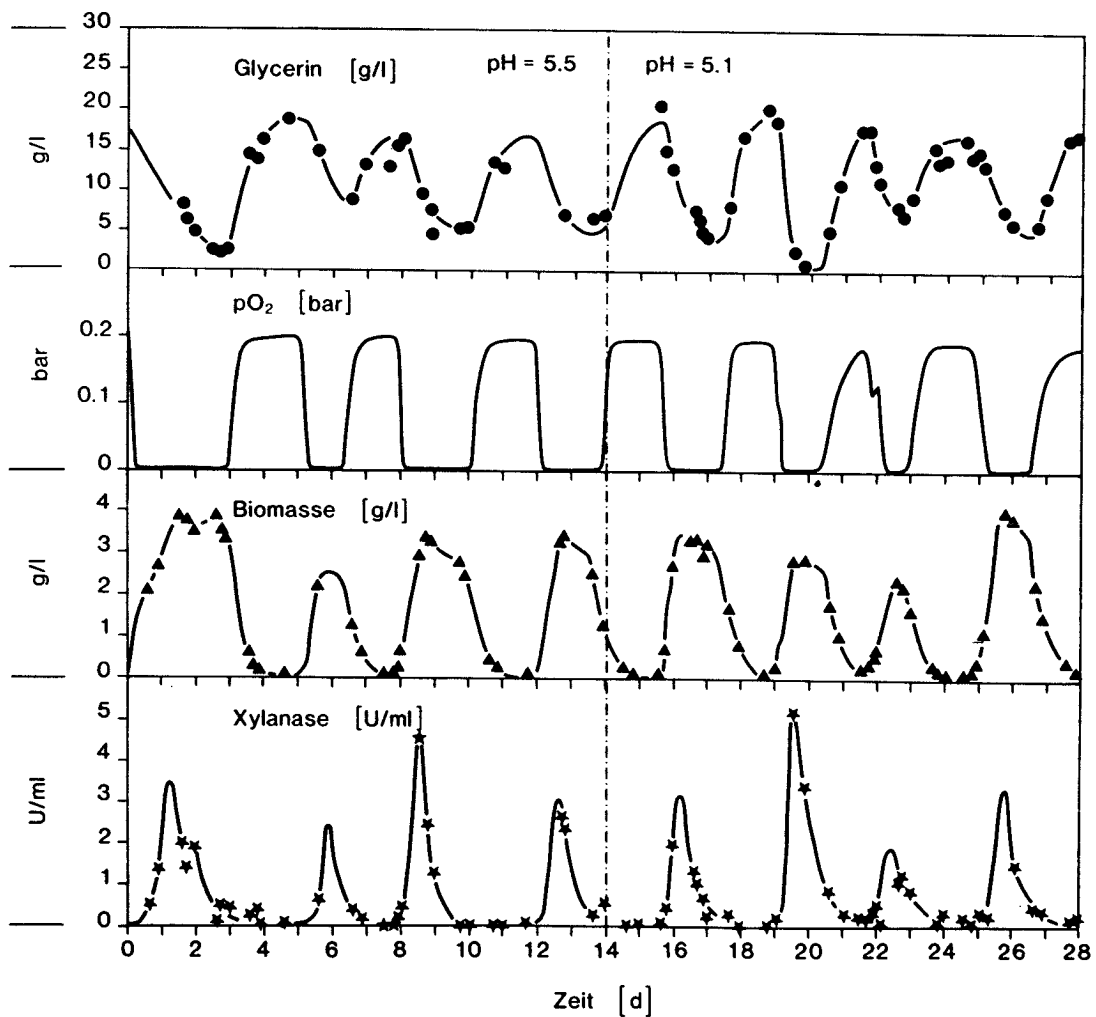
Aufgrund der offensichtlichen zeitlichen Übereinstimmung zwischen dem Verschwinden der Flockenverbände der Bakterien und dem Nachlassen der Xylanaseproduktion wurde daher zunächst ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen angenommen. Möglich war ein gleichzeitiger genetischer Verlust der Fähigkeit zur Xylanaseproduktion, verbunden mit einem Überwachsen des produktiven Stammes durch den unproduktiven Stamm im kontinuierlichen System. Einen solchen Vorgang hatten Heineken & O'Connor (1972) für die Protease- und Amylaseproduktion mit *Bacillus subtilis* in der kontinuierlichen Fermentation beobachtet.

Weitere Versuche zeigten jedoch, daß ein genetischer Verlust der Xylanaseproduktion auszuschließen war.

6.4. Kontinuierliche Fermentation mit oszillierenden Kulturen

6.4.1. Chemostat mit pH-Werten von pH 5.5 und pH 5.1.

Bei einer kontinuierlichen Fermentation, die zunächst mit einem konstanten pH-Wert von 5.5 und später mit pH 5.1 durchgeführt wurde, kam es überraschenderweise zu stabilen Oszillationen der Biomassekonzentration. Figur 37 zeigt den zeitlichen Verlauf dieses Versuchs mit der Biomasse- und Glycerinkonzentration, dem Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit und der Volumenaktivität der gebildeten Xylanase.



Figur 37: Kontinuierliche Fermentation im chemostatischen Betrieb bei pH 5.5 bzw. pH 5.1, $\tau = 11$ h

Die Fermentation war die ersten 15 Stunden im Batchbetrieb gelaufen und danach auf kontinuierlichen Betrieb mit 11 Stunden Verweilzeit umgestellt worden. Nach anfänglicher Zunahme der Biomassekonzentration und beginnendem Einschwingen der Kultur in einen Steady-state mit einer Biomassekonzentration von ca. 3.8 g/l kam es zu einer raschen Abnahme der Biomassekonzentration, sodaß nach etwa 110 Stunden (≈ 4.6 Tagen in der Darstellung) die Biomassekonzentration nur noch 0.03 g/l betrug. Wenige Stunden später setzte jedoch wieder eine starke Biomassezunahme ein, sodaß bei $t = 135$ h (≈ 5.6 Tage) bereits wieder eine Biomassekonzentration von 2.5 g/l vorhanden war. Dieser Zyklus aus Biomassezunahme und -abnahme setzte sich über den gesamten Fermentationsverlauf fort und wurde auch nicht gestört, als der pH-Wert nach 336 Stunden (≈ 14 Tagen) auf pH 5.1 abgesenkt wurde. Die "Wellenlänge" der Biomasseschwingungen betrug dabei etwa 80 Stunden, ein Nachlassen der Schwingungen (Einschwingen) trat nicht auf.

Die Glycerinkonzentration verhielt sich gegenläufig zu der Biomassekonzentration, erreichte dabei aber nie den Wert Null. Ebenfalls gegenläufig zur Biomasseschwingung verhielt sich der Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit. Im Gegensatz zur Glycerinkonzentration nahm dieser jedoch jeweils innerhalb weniger Stunden bis auf Null ab und verweilte dort bis zum Beginn des Auswaschens der Biomasse.

Das wichtigste Ergebnis dieses Versuchs war die Tatsache, daß jede Biomassezunahme der oszillierenden Kultur von einer Phase erneuter Xylanaseproduktion begleitet war. Dabei konnten jeweils maximale Xylanaseaktivitäten zwischen 3 und 5 U/ml gemessen werden. Über die gesamte Versuchszeit gerechnet betrug die biomassespezifische Produktivität der Xylanase ca. 32 U/(gTS·h).

Ein genetischer Verlust der Fähigkeit zur Xylanaseproduktion konnte aus diesem Grund nicht stattgefunden haben. Auch in diesem Versuch ging jedoch die Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat bereits wieder zurück, lange bevor das Auswaschen der Biomasse und ein Ansteigen des Sauerstoffpartialdrucks einsetzte.

Die Möglichkeit, mit Hilfe schwingender Kulturen eine quasikontinuierliche Xylanaseproduktion zu erreichen, war jedoch so interessant, daß sie zunächst weiter untersucht wurde.

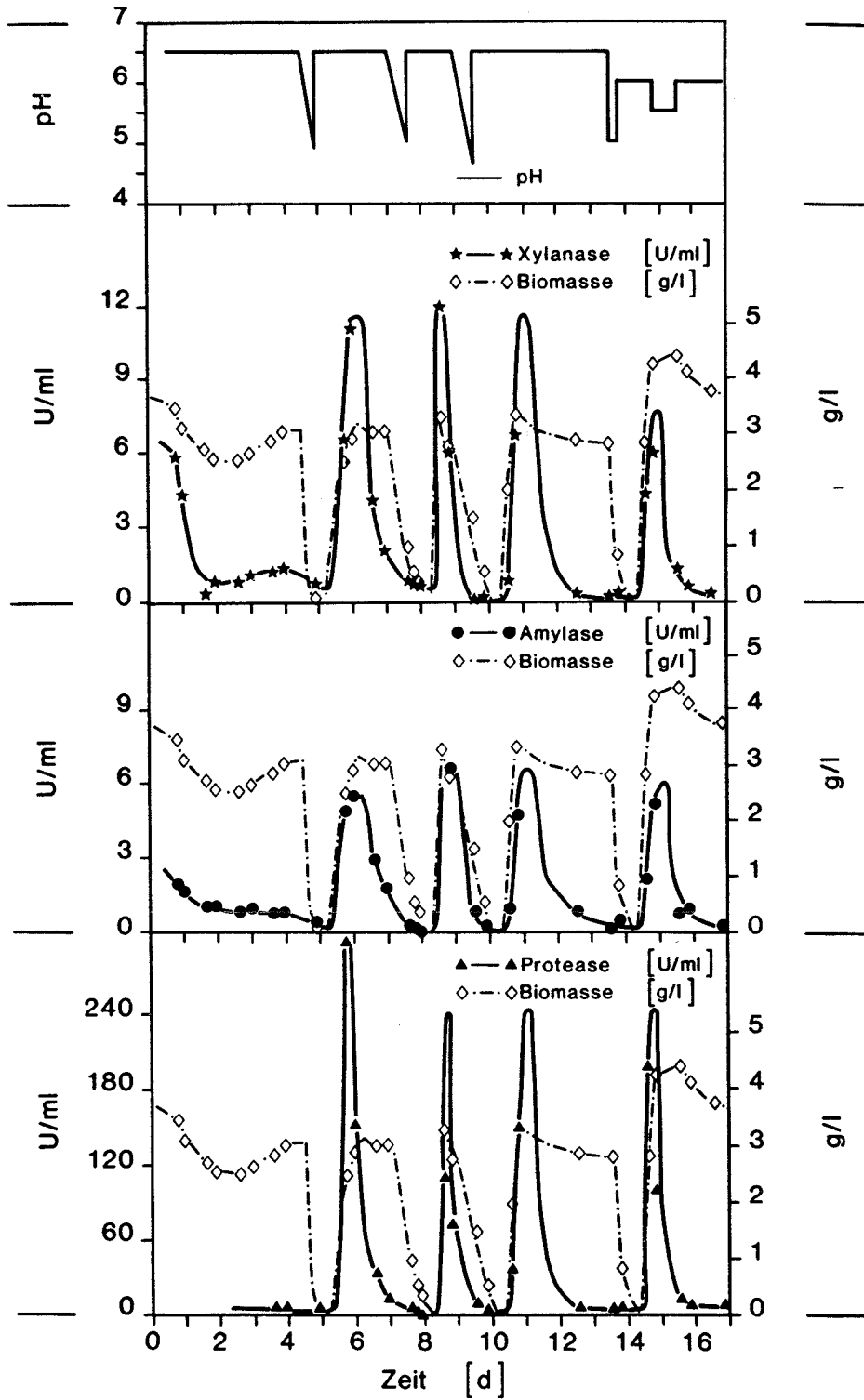
6.4.2. Induzierte Biomasseschwingungen

Oszillationen der Biomasse lassen sich nicht nur in Form von Eigenschwingungen bei niedrigen pH-Werten erzeugen. Eine andere Möglichkeit ist es, den steady-state der Biomasse im Chemostaten bei neutralen pH-Werten zwischen pH 6 und 7 so zu stören, daß es ebenfalls zu einer nachhaltigen Abnahme der Biomassekonzentration kommt, die, wie bei den Eigenschwingungen, von einem raschen Wiederanstieg der Biomasse gefolgt ist. Eine solche Störung des Steady-states läßt sich z.B. erreichen, indem der pH-Wert der Kultur für einige Zeit auf pH 5 abgesenkt und anschließend wieder auf pH 6 angehoben wird. Der steile Wiederanstieg der Biomassekonzentration ist auch bei diesen induzierten Biomasseschwingung von einer Phase erneuter Xylanaseproduktion begleitet. Andere Methoden, den Steady-state in der gewünschten Weise zu stören, sind, wie sich in verschiedenen Versuchen zeigte, eine kurzfristige Temperaturerhöhung auf 60 °C oder eine plötzliche starke Veränderung der Durchflußrate.

Figur 38 zeigt einen Ausschnitt aus einer kontinuierlichen Fermentation mit einer Verweilzeit von 10 Stunden. Dargestellt sind pH-Wert, Biomassekonzentration und die Aktivitäten der extrazellulären Enzyme Xylanase, Amylase und Protease über der Zeit.

Ausgehend von einem geregelten pH-Wert von 6.5 wurde der pH-Wert dreimal ($t = 107 \text{ h}$, 168 h , 215 h ; $\approx 4.5 \text{ d}$, 7.0 d , 9.0 d) durch Abschalten der pH-Regelung und dem aus dem Zulauf sauren Mediums folgendem Ansäuern der Kultur auf pH 5.0 bis 4.7 abgesenkt und nach 10 bis 15 Stunden durch erneutes Einschalten der pH-Regelung wieder auf pH 6.5 angehoben. Zu einem späteren Zeitpunkt ($t = 325 \text{ h}$, $\approx 13.5 \text{ d}$) wurde der pH-Wert aktiv durch Verstellen des Sollwerts am Regler von pH 6.5 auf pH 5 und nach 6 Stunden auf pH 6.0 gesetzt. Weitere 24 Stunden später ($t = 349 \text{ h}$, $\approx 14.5 \text{ d}$) wurde der pH-Wert in gleicher Weise für 20 Stunden von pH 6 auf pH 5.5 und zurück auf pH 6 gestellt.

Die ersten vier genannten pH-Absenkungen riefen jeweils die beschriebenen Biomasseschwingungen hervor, bei der letzten pH-Absenkung wurde dagegen kein Auswaschen der Biomasse beobachtet. Dies konnte entweder darauf zurückgeführt werden, daß die Absenkung um nur $\frac{1}{2}$ pH-Wert zu gering war, oder darauf, daß die Absenkung zu früh, nämlich fast noch während des Wiederanstiegs der Biomasse, erfolgte.



Figur 38: Induzierte Biomassenschwingungen mittels periodischer pH-Wertabsenkung und dadurch wiederangeregte Produktion der Enzyme Xylanase, Protease und Amylase, $\tau = 10$ h

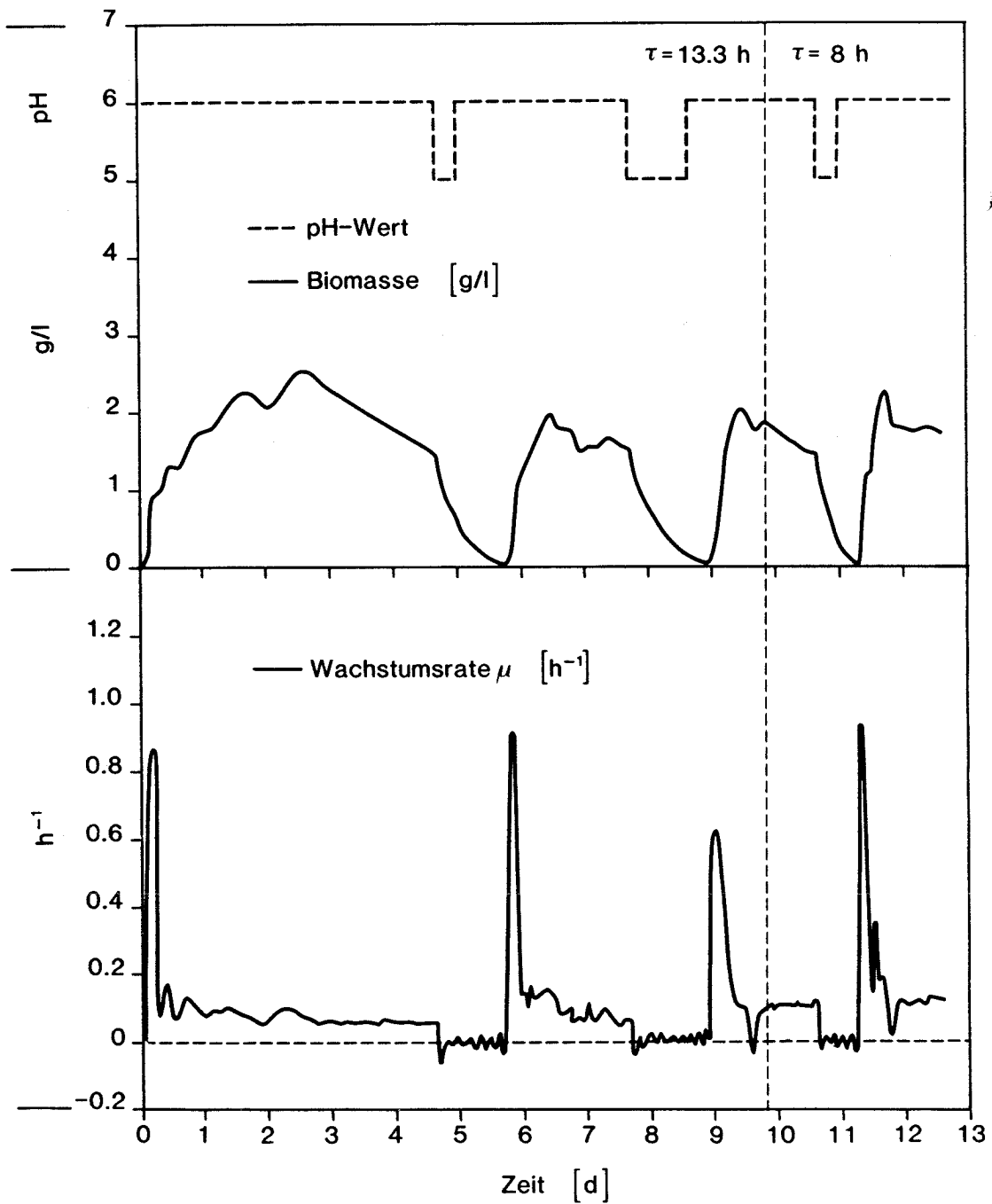
Infolge der Biomasseschwingungen setzte jeweils die Produktion der Xylanase wieder ein. Bei zusätzlicher Messung weiterer von *Bacillus amyloliquefaciens* ausgeschiedener extrazellulärer Enzyme, wie Protease und Amylase, zeigte sich, daß die Produktion dieser Enzyme ebenso wie die der Xylanase im Steady-state der Kultur nachläßt, durch die Oszillation der Biomasse aber genauso wieder angeregt werden kann.

Deutlich ist, daß sowohl die Zeitpunkte des Einsetzens der Enzymproduktion kurz nach dem Biomasseanstieg, als auch die Zeitpunkte des Nachlassens der Enzymproduktion für alle drei beobachteten Exoenzyme übereinstimmten. Daraus kann geschlossen werden, daß diese drei Enzyme sowohl für den Beginn, als auch für das Ende ihrer Produktion jeweils gleichen Regulationsmechanismen unterliegen. Der für den Produktionsbeginn verantwortliche Mechanismus ist, wie am Beispiel der Batchfermentation gezeigt, eine Katabolitrepression. Der für das gemeinsame Nachlassen der Produktion verantwortliche Mechanismus blieb zu diesem Zeitpunkt jedoch noch ungeklärt.

Durch das Verfahren der induzierten Schwingungen kann der Effekt der wiederanregbaren Xylanaseproduktion bei oszillierenden Biomassekonzentrationen mit dem Vorteil der höheren Aktivitäten bei neutralen pH-Werten verbunden werden. So betrug bei der Fermentation mit freischwingender Biomasse bei pH 5.5 und 5.1 die maximal gemessene Xylanaseaktivität 5.2 U/ml, während im Versuch mit induzierten Schwingungen maximale Xylanaseaktivitäten um 12 U/ml gemessen wurden, was auf die Tatsache zurückgeführt wurde, daß die Phase der Enzymproduktion stets auf pH-Werte von 6.0 oder 6.5 traf.

Zusätzlich besteht mit dem Verfahren der induzierten Biomasseschwingungen die Möglichkeit, durch gezieltes Wählen einer optimalen Dauer der Phase mit niedrigem pH-Wert ("Streß-Phase") und der Phase mit normalen pH-Wert ("Erholungsphase") die für eine über das zeitliche Mittel maximale Xylanaseproduktion besten Bedingungen einstellen zu können.

Wie verschiedene Versuche zeigten, ist jedoch weder die Tatsache noch der Zeitpunkt des Wiederanstiegs der Biomasse abhängig von der Länge der Streß-Phase. Figur 39 zeigt als Beispiel eine Fermentation, die für die ersten 236 Stunden (≈ 9.8 Tage) mit einer Verweilzeit von 13.3 Stunden und danach mit einer Verweilzeit von 8 Stunden betrieben wurde. Dargestellt sind der pH-Wert, die kontinuierlich gemessene Biomassekonzentration und die aus der Biomassekonzentration errechnete Wachstumsrate μ über der Versuchszeit.



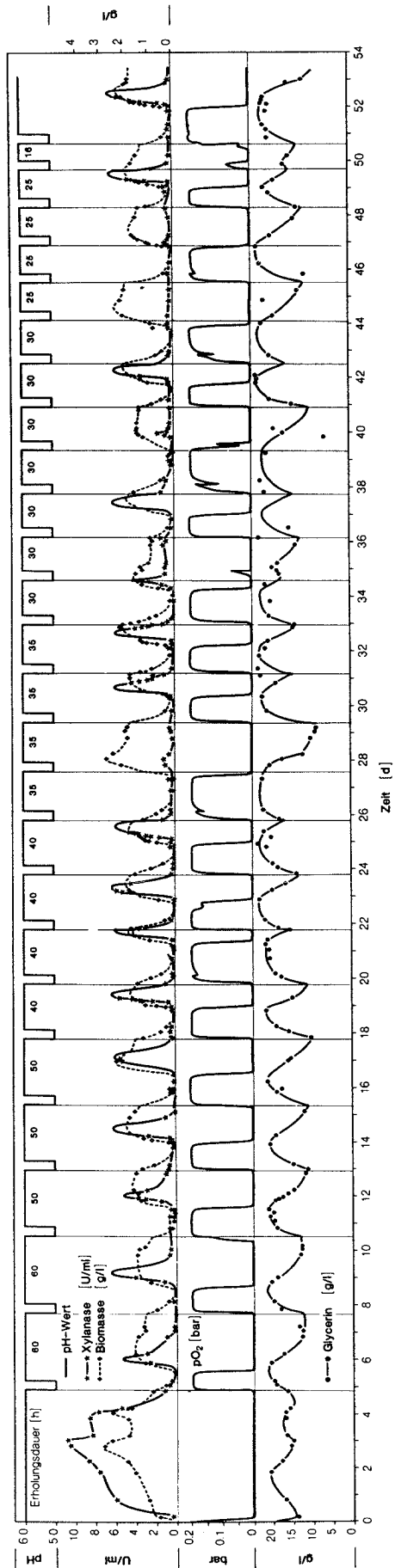
Figur 39: Abhängigkeit der Auswaschdauer von der Länge der pH-Absenkung und von der Verweilzeit, $\tau = 13.3 \text{ h}$ bzw. 8 h

Aufgrund der kontinuierlichen Messung der Biomassekonzentration und der Möglichkeit, daraus den zeitlichen Verlauf der Wachstumsrate zu ermitteln (vergl. Abschnitt 3.1.11), läßt sich besonders gut das dynamische Verhalten der Biomasse während der erzwungenen Schwingungen erkennen. So sinkt die Wachstumsrate der Organismen innerhalb weniger Minuten nach der pH-Absenkung auf Null, es findet also kein Wachstum mehr statt, und die Biomasse wird wie eine Suspension toter Partikel entsprechend der Funktion $dX/dt = -D \cdot X$ ausgewaschen.

Während des Zeitraums mit niedrigem pH-Wert und auch nach der erneuten pH-Wert-Anhebung bleibt die Wachstumsrate zunächst noch bei Null. Es findet also keine allmähliche Erholung der Organismen statt, stattdessen setzt das Wachstum erst zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder ein und die Wachstumsrate steigt meist innerhalb nur einer Stunde auf ihren maximalen Wert an. Sobald der Sauerstoffpartialdruck (nicht dargestellt) in der Kulturflüssigkeit aufgrund der steigenden Biomassekonzentration auf Null abgesunken ist, geht die Wachstumsrate wieder zurück und pendelt sich auf Werte nahe dem Wert der momentanen Durchflußrate ein ($\mu = D \approx \text{Steady-state}$).

In der hier dargestellten Fermentation wurde der pH-Wert bei einer anfänglichen Verweilzeit von 13.3 Stunden zum Zeitpunkt $t = 112 \text{ h}$ ($\approx 4.7 \text{ d}$) für 8 Stunden und zum Zeitpunkt $t = 184 \text{ h}$ ($\approx 7.7 \text{ d}$) für 24 Stunden auf pH 5 abgesenkt. In beiden Fällen setzte das Auswaschen der Biomasse genau in dem Moment ein, in dem der pH-Wert abgesenkt wurde und dauerte noch weiter an, nachdem der pH-Wert wieder auf pH 6 angehoben worden war. In beiden Fällen betrug die Gesamt-Auswaschzeit vom Beginn des Auswaschvorgangs bis zum Beginn des Wiederanstiegs der Biomasse ca. 30 Stunden. Nachdem dagegen ab $t = 236 \text{ h}$ ($\approx 9.8 \text{ d}$) die Verweilzeit auf 8 Stunden verkürzt worden war betrug die Gesamtauswaschzeit bei einer Streßphase von 8 Stunden nur ca. 16 Stunden. Die Dauer des in Bezug auf Xylanasebildung unproduktiven Auswaschvorgangs ist demnach nicht von der Dauer der Streß-Phase, sondern nur von der Verweilzeit der kontinuierlichen Fermentation abhängig. Wie weitere Versuche zeigten, kann die Dauer der Streß-Phase sogar auf unter $\frac{1}{2}$ Stunde gesenkt werden um den Auswaschvorgang einzuleiten.

Um zu untersuchen, wie kurz bei einer festen Verweilzeit die "Erholungszeit" zwischen zwei pH-Absenkungen sein kann, ohne daß es zu Störungen im Ablauf der Biomasseschwingungen und der anschließenden Phase der Xylanaseproduktion kommt, wurde eine kontinuierliche Fermentation durchgeführt, bei der im Laufe der Versuchszeit die Erholungsphase zwischen zwei Streßphasen immer weiter verkürzt wurde. Dazu wurde von einem dem pH-Regler übergeordneten Mikroprozessor der pH-Wert in definierten Abständen auf pH 5 abgesenkt und wieder auf pH 6 angehoben.



Figur 40: Abhängigkeit des Schwingungsverhaltens und der Xylanaseproduktion von der Länge der Erholungsdauer (h) zwischen den pH-Wert-Absenkenungen

In Figur 40 sind die pH-Wert-Phasen, die Biomasse- und Glycerinkonzentration, die Xylanaseaktivität sowie der Sauerstoffpartialdruck in der Kulturbrühe über der Fermentationszeit dargestellt. Die Verweilzeit der Fermentation betrug 8.3 Stunden, die Länge der Streß-Phase jeweils 8 Stunden. Die Länge der Erholungsphase (h) ist jeweils zwischen den pH-Absenkungen eingetragen.

Nach einer einleitenden Phase von 117 Stunden (≈ 4.9 Tage) Dauer betrug die Erholungsphase anfangs mehrmals 60 Stunden und wurde dann schrittweise bis auf 15 Stunden verkürzt. Dabei zeigte sich, daß bei der gewählten Verweilzeit von 8.3 Stunden die optimale Länge der Erholungsphase ca. 40 Stunden beträgt. Bei längeren Erholungsphasen ist die Xylanaseproduktion bereits seit jeweils mehreren Stunden abgeklungen, ehe die nächste Streßphase die Biomasse zum Auswaschen bringt. Dadurch sind die unproduktiven Zeitabschnitte, in denen keine Xylanase gebildet wird, länger als nötig. Bei kürzeren Erholungsphasen als 40 Stunden kann es dagegen vorkommen, daß die pH-Absenkung zeitlich genau mit der Wiederzunahme der Biomasse zusammenfällt (zum ersten Mal bei $t = 662$ h, ≈ 27.6 d). In solchen Fällen erfolgte kein Auswaschen der Biomasse, so daß auch keine Xylanaseproduktion resultierte. Die Kultur lief dagegen in einen Steady-state und wurde erst durch die nächste pH-Absenkung wieder zum Auswaschen gebracht. Bei einer Erholungsphasenlänge von 25 Stunden ergab sich dabei genau eine Schwingung der Biomasse mit 50 Stunden Schwingungsdauer, das heißt mit halber Frequenz der pH-Absenkungen. Ein Auswaschen der Biomasse durch die pH-Absenkung kann offensichtlich nur erreicht werden, wenn sich die Kultur bereits in einem Steady-state befindet.

Die Glycerinkonzentration nahm in diesem Versuch, wie in den vorangegangenen Fermentationen, nie bis auf Null ab, sie sank bei der relativ kurzen Verweilzeit sogar nur einmal unter 10 g/l. Der Sauerstoffpartialdruck in der Kulturbrühe sank dagegen beim periodischen Zunehmen der Biomassekonzentration jeweils innerhalb von drei bis vier Stunden vom Zustand der Sauerstoffsättigung auf Null ab, sodaß die Kultur sich jeweils von diesem Zeitpunkt an im Zustand der Sauerstofflimitierung befand.

Deutlich wirkte sich die Länge der Erholungsphase auch auf die biomassenspezifische Produktivität aus. Tabelle 9 zeigt die ermittelten biomassenspezifischen Produktivitäten jeweils für den Zeitraum mit einer bestimmten Erholungsdauer.

Erholungsdauer (h)	Produktivität (U/(gTS·h))
60	94
50	98
40	110
35	65
30	52
25	22

Tabelle 9: Abhängigkeit der biomassespezifischen Produktivität von der Erholungsdauer bei einer Verweilzeit von 8.3 Stunden

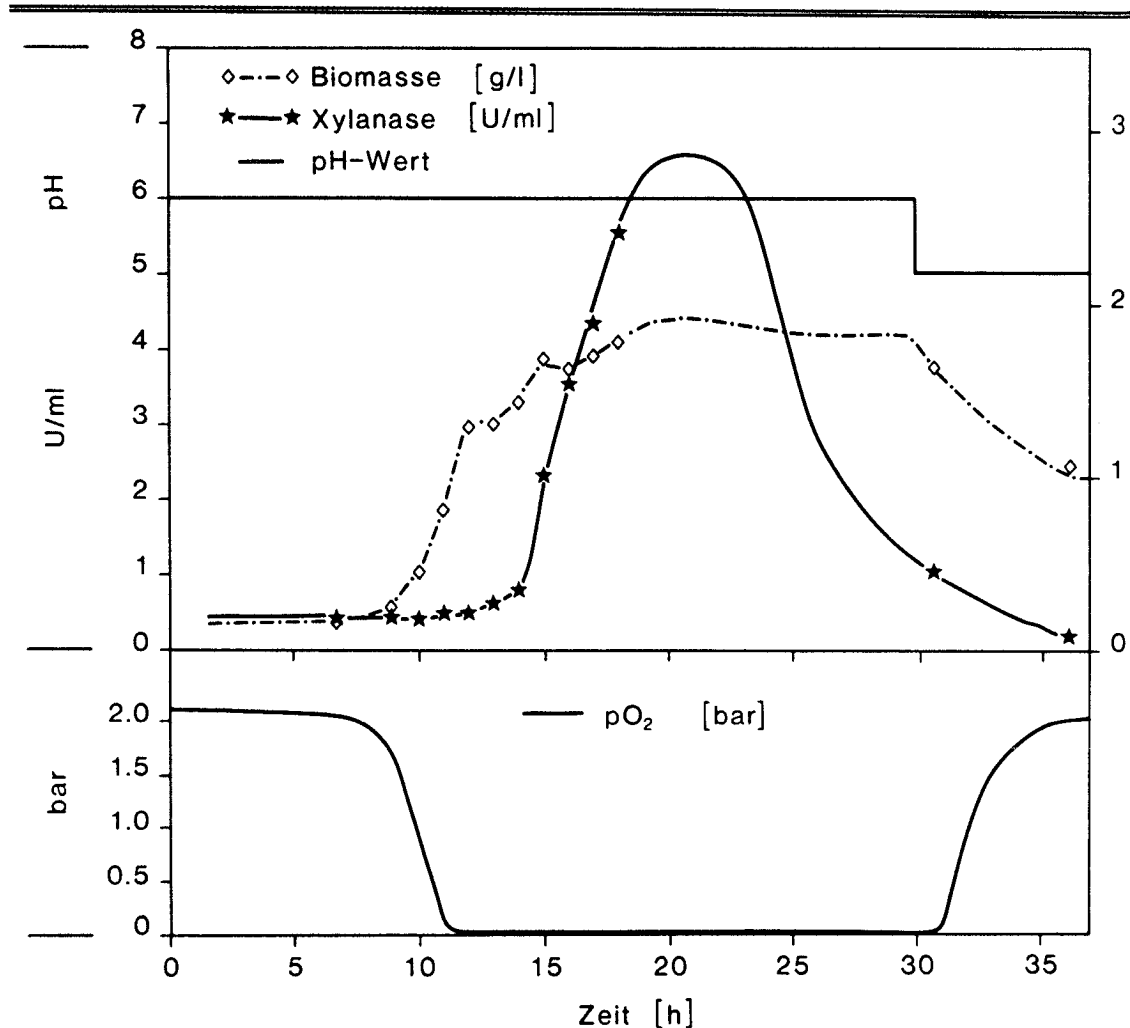
Während die freie Biomasseschwingung bei pH-Werten um pH 5 eine feste Wellenlänge hat, kann die Schwingungsdauer mit diesem Verfahren auf die optimale Länge gebracht werden. So betrug bei der in Abschnitt 6.4.1. beschriebenen Fermentation die Schwingungsdauer bei einer Verweilzeit von 11 Stunden ca. 80 Stunden und die biomassespezifische Produktivität lag bei 32 U/(gTS·h). In dem hier geschilderten Versuch mit einer Verweilzeit von 8.3 Stunden betrug die optimale Schwingungsdauer dagegen ca. 48 Stunden (40 + 8 Stunden) und für die biomassespezifische Produktivität wurden hier 110 U/(gTS·h) ermittelt.

Dieses Ergebnis konnte jedoch vor allem unter ökonomischen Gesichtspunkten noch in keiner Weise befriedigen. So ist die Dauer der Xylanase-Produktionsphase innerhalb einer Schwingung sehr unterschiedlich (in diesem Versuch zwischen 6 und 10 Stunden), sodaß sie selbst bei einer optimalen Schwingdauer von 48 Stunden nur ca. 20 % derselben ausmachte. In der übrigen Zeit lief das Medium ungenutzt durch den Fermenter hindurch.

Die zeitliche Abfolge von Biomassewachstum, Sauerstoffabnahme und Beginn der Xylanaseproduktion ist in Figur 41 anhand eines Ausschnitts aus der in Figur 40 dargestellten Fermentation noch einmal gezeigt. Dargestellt ist eine einzelne Schwingung, hervorgerufen durch eine vorangegangene pH-Steßphase.

Man erkennt hier deutlich die zeitliche Entkopplung der Xylanaseproduktion von dem Biomassewachstum. Nach Einsetzen des erneuten Wachstums nahm die Biomasse solange exponentiell zu, wie die Konzentration des gelösten Sauerstoffs größer als Null war. Mit Beginn der Sauerstofflimitierung endete das exponentielle Wachstum und die Kultur ging in einen Steady-state über. Gleichzeitig setzte die Bildung der

Xylanase ein. Die Sauerstofflimitierung und der Steady-state hielten bis zum Zeitpunkt $t = 31$ h an, zu dem der pH-Wert erneut abgesenkt wurde. Die Xylanaseproduktion endete dagegen trotz anhaltender Sauerstofflimitierung etwa zum Zeitpunkt $t = 20$ h, sodaß die im Kulturfiltrat enthaltene Xylanaseaktivität im kontinuierlichen Fluß ausgewaschen wurde.

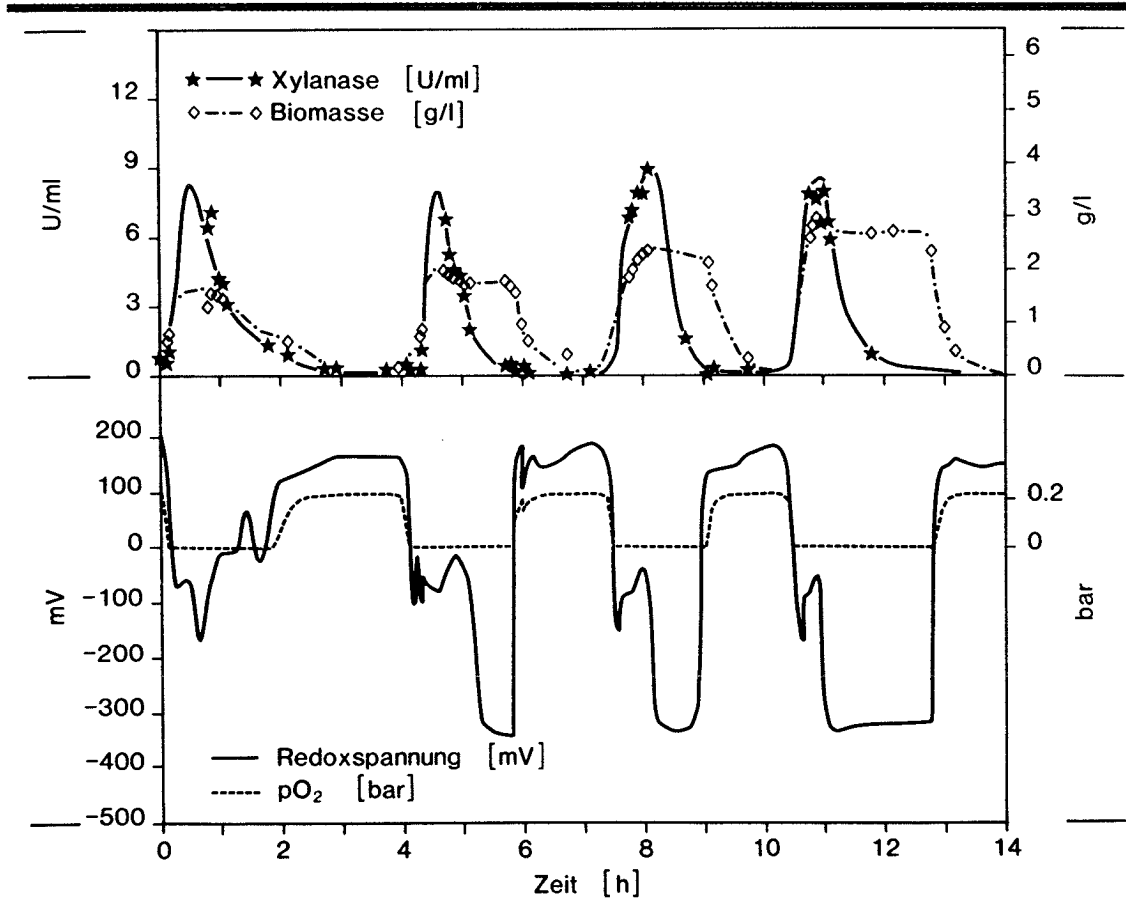


Figur 41: Start der Xylanaseproduktion mit dem Beginn der Sauerstofflimitierung, $\tau = 8.3$ h

Welche Einflüsse für das Ende der Xylanaseproduktion verantwortlich sind, ließ sich mit den bis dahin aufgenommenen Meßsignalen nicht feststellen. Es wurde daher ein zusätzliches Meßsignal gesucht, das einen besseren Aufschluß über die Mechanismen gibt, die für den Start und das Ende der Xylanaseproduktion verantwortlich sind. Als geeignet erwies sich dabei die Messung des Redoxpotentials in der Kulturflüssigkeit mit einer Platinelektrode.

6.5. Messung des Redoxpotentials

Da erkannt wurde, daß eine differenzierte Messung der Schlüsselgröße pO_2 mit der polarographischen Sauerstoffelektrode im Bereich der Sauerstoffpartialdrücke, die zu einer Limitierung der Organismen führen ($pO_2 \approx 0$), nicht möglich ist, wurde eine parallele Messung des Redoxpotentials der Kulturflüssigkeit durchgeführt.



Figur 42: Biomasse und Xylanaseaktivität in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck und vom Redoxpotential, $\tau = 10$ h

Figur 42 zeigt die kontinuierliche Fermentation mit einer Verweilzeit von 10 Stunden und mit durch pH-Absenkungen hervorgerufenen Schwingungen der Biomasse. Dargestellt ist neben der Biomassekonzentration und der Xylanaseaktivität der Sauerstoffpartialdruck und das Redoxpotential der Platinelektrode. (Es sei noch mal daran erinnert, daß zum Erhalt absoluter Werte das Standardpotential von 198 mV zu den Meßwerten zuaddiert werden muß (vergl. Abschnitte 2.4.1 und 3.1.8))

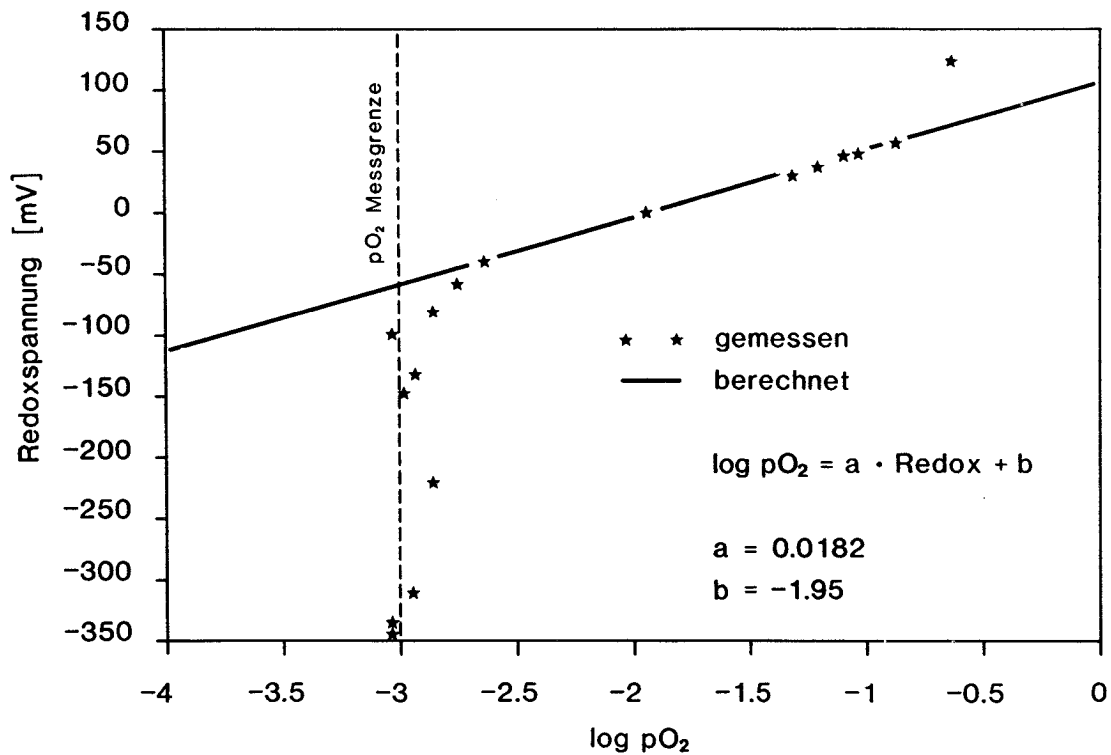
Dabei zeigt sich für Biomasse, Xylanase und Sauerstoffpartialdruck der bekannte Verlauf während der Schwingungen. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf des pO_2 -Signals mit dem Verlauf des Redoxpotentials, so ist während der Phasen, in denen der Sauerstoffpartialdruck größer als Null ist eine deutliche Parallelität zwischen den beiden Meßsignalen zu erkennen. In den Bereichen jedoch, in denen die pO_2 -Messung den Meßwert Null anzeigt, weicht die Meßkurve des Redoxpotentials deutlich von der des pO_2 ab.

Das Redoxpotential sank dabei jeweils zunächst auf Werte um -100 mV ab, wo es mit einer leichten Schwingung für einige Stunden verweilte. Danach fiel das Potential sehr plötzlich auf Spannungen um -350 mV ab. Diese Spannungen blieben erhalten, bis der pH-Wert das nächste Mal abgesenkt wurde. Als Folge der pH-Absenkung stieg das Redoxpotential innerhalb weniger Minuten wieder auf positive Werte an. Der Anstieg resultierte zum Teil aus der direkten pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials, zum anderen zeigte sich auch hier wieder eine deutliche Parallelität zu dem gleichzeitig ansteigenden Sauerstoffpartialdruck.

Vergleicht man die Zeitabschnitte, in denen Xylanase produziert wird, bezüglich des dort vorliegenden Redoxpotentials, ist jeweils eine deutliche Korrelation zwischen der Xylanase-Produktionsphase und der Phase, in der das Redoxpotential für einige Stunden im Bereich mäßig negativer Spannungen um -100 mV liegt, erkennbar. Sowohl bei positiven, als auch bei stark negativen Redox-Werten findet keine Xylanaseproduktion statt.

Eine Gegenüberstellung gleichzeitig in einer kontinuierlichen Fermentation gemessener Werte des Redoxpotentials und des Sauerstoffpartialdrucks ergibt eine deutliche Korrelation zwischen beiden Meßsignalen.

Figur 43 zeigt eine Auftragung des Redoxpotentials über dem Logarithmus der pO_2 -Werte. Dabei ist eine über weite Bereiche lineare Abhängigkeit des Redoxpotentials (mV) vom Logarithmus der Partialdrucks des gelösten Sauerstoffs (bar) erkennbar. Aufgrund dieses Resultats und aufgrund des in Abschnitt 2.4.3. erwähnten Zusammenhangs zwischen dem Redoxpotential und der Austauschstromdichte in verdünnten wässrigen Fermentationslösungen kann davon ausgegangen werden, daß das gemessene Redoxpotential der Kulturbrühe unter den vorliegenden Randbedingungen der Fermentationen (konstante Temperatur, konstanter pH-Wert) in erster Linie eine Funktion des Sauerstoffgehalts darstellt. Bei einem Sauerstoffpartialdruck von ca. 10^{-3} bar (bei einem Fermenter-Innendruck von 1.2 bar entspricht das etwa einem pO_2 von 0.4 %) ist jedoch die Nachweisgrenze der polarographischen Sauerstoffelektrode erreicht.

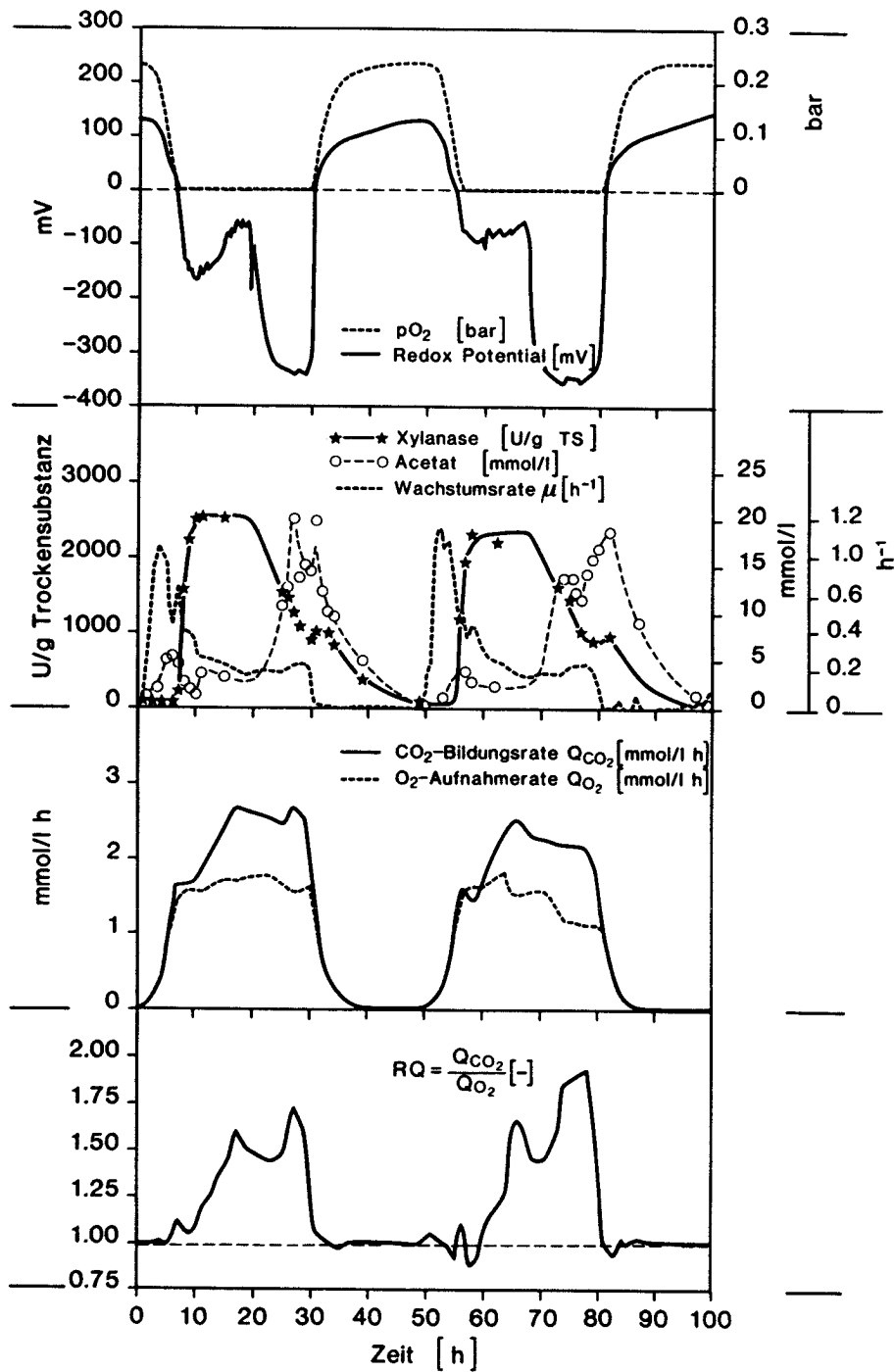


Figur 43: Zusammenhang zwischen den Meßwerten des Redoxpotentials und dem Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit

Nach dem in Figur 43 dargestellten Zusammenhang

$$\log_{10}(pO_2) = 0.0182 \cdot \text{Redox} - 1.95 \quad (\text{Gl. 32})$$

beträgt das Redoxpotential im Bereich der Nachweisgrenze der pO₂-Elektrode ca. -60 mV. Dies entspricht ziemlich genau dem Bereich des Redoxpotentials, in dem die Xylanaseproduktion stattfindet. Unter Bedingungen der Sauerstofflimitierung wird Xylanase demnach von *Bacillus amyloliquefaciens* nur bei Sauerstoffpartialdrücken um 10⁻³ bar produziert. Bei höheren Partialdrücken sind die Organismen nicht limitiert und die Xylanasesynthese unterliegt der Katabolit-Repression. Sinkt der Sauerstoffgehalt in der Kulturbrühe deutlich unter 10⁻³ bar (z.B. Redoxpotential -350 mV) ist die Xylanasesynthese gleichfalls unterdrückt. Die Tatsache, daß bei 10⁻³ bar gerade der Meßbereich der pO₂-Elektrode endet (Meßsignal ≈ Null), erklärt, weshalb mit dem pO₂-Signal zwar der Beginn, nicht aber das Ende der Xylanase-Produktionsphase erkennbar war.



Figur 44: Zeitliche Abfolge der Produktbildung in Abhängigkeit vom Redoxpotential und pO_2 , $\tau = 5$ h

Das Redoxpotential ist somit nicht im eigentlichen Sinne eine neue Meßgröße, es ermöglicht jedoch eine gegenüber dem pO_2 -Meßsignal bedeutend exaktere Messung des Sauerstoffgehalts der Kulturbrühe in dem Bereich, der einen wesentlichen Einfluß auf die Repression und Derepression der Xylanasesynthese hat.

6.5.1. Abhängigkeit der Produktbildung vom Redoxpotential

Figur 44 zeigt anhand eines Ausschnitts aus einer kontinuierlichen Fermentation ($\tau = 5$ h) die zeitliche Folge der Bildung verschiedener Produkte in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Kulturflüssigkeit. Dargestellt sind das Redoxpotential und der Sauerstoffpartialdruck, die Wachstumsrate der Organismen, die biomassespezifische Xylanaseaktivität (U/gTS), die Essigsäurekonzentration und die aus den Daten der Abgasanalyse errechneten Größen Q_{O_2} (mmol/(l·h)), Q_{CO_2} (mmol/(l·h)) und RQ (-).

Für die Produktion von Biomasse, Xylanase und Essigsäure ist deutlich eine zeitliche Aufeinanderfolge zu erkennen, die sich gut den einzelnen Stufen im Verlauf des Redoxpotentials zuordnen läßt. Während das Maximum der Wachstumsrate in den Bereich positiver Redox-Werte fällt, die Xylanaseproduktion wie geschildert im Bereich von Redox-Werten um -100 mV stattfindet, fällt das Maximum der Essigsäurebildung zeitlich mit den stark negativen Redoxspannungen um -350 mV zusammen.

Für den Respirationsquotienten RQ ist ebenfalls eine deutliche Korrelation zum Redoxpotential zu erkennen. So sind die Raten der Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} und CO_2 -Produktion Q_{CO_2} vor dem Beginn der Sauerstofflimitierung praktisch gleich ($RQ = 1$). Danach übersteigt die CO_2 -Produktion die Sauerstoffaufnahme, sodaß sich Werte für RQ von 1.5 bis 1.9 ergeben. Dabei erreicht der RQ jeweils ein erstes Maximum kurz vor dem Abfallen des Redoxpotentials auf den negativsten Bereich und ein zweites, höheres Maximum im Bereich der Redox-Werte um -350 mV.

Die Konzentrationen einer Reihe weiterer Produkte über den Verlauf der ersten Schwingung ($t = 0$ bis 30 h) in Figur 44 zeigt Tabelle 10. In Tabelle 11 sind darüberhinaus für den gleichen Zeitraum die Kohlenstoffbilanzen in den drei Phasen unterschiedlichen Redoxpotentials dargestellt. Die Bilanzbildung ist aufgrund der stark instationären Zustände in dem betrachteten Zeitraum nur mit Schwierigkeiten möglich. Hierin ist auch der Grund für die unterschiedlichen prozentualen Bilanzausbeuten zwischen 74 und 100 % zu suchen.

Zeit h	Acetoin mmol/l	Butandiol mmol/l	Ethanol mmol/l	Lactat mmol/l	Succinat mmol/l	Formiat mmol/l
2.0	1.53	0	1.85	0.41	0.03	2.49
6.0	1.62	0	2.29	0.46	0.27	2.66
15.0	3.96	0.63	0.55	0.84	0.61	0.38
25.0	5.08	5.75	2.64	1.12	2.89	1.39
27.0	n.b.	n.b.	n.b.	0.42	5.64	9.19
30.0	10.66	2.02	1.53	0.11	2.97	4.07

Tabelle 10: Konzentrationen von Acetoin, 2,3-Butandiol, Ethanol, Lactat, Succinat und Formiat zu verschiedenen Zeiten in Figur 44

Zeitraum (h)	t= 2-6		t= 11-15		t= 25-30	
	mmolC/(l·h)	%	mmolC/(l·h)	%	mmolC/(l·h)	%
Substrat:						
Glycerin	-280	100.0	-740	100.0	-820	100.0
Produkt:						
Biomasse	130	46.4	320	43.2	290	35.4
Protein (extrazell.)	15	5.4	108	14.6	0	0
CO ₂	8	2.9	22	3.0	30	3.7
Acetat	28	10.0	28	3.8	108	13.2
Acetoin	20	7.1	52	7.0	114	13.9
Formiat	9	3.2	0	0	115	14.0
Succinat	4	1.4	8	1.1	109	13.3
Butandiol	0	0	11	1.5	55	6.7
Σ Produkt	214	76.4%	549	74.2%	821	100%

Tabelle 11: C-Bilanzen (%) der Produktbildung (mmolC/(l·h)) bezogen auf den Glycerinverbrauch (mmolC/(l·h)) in drei unterschiedlichen Zeiträumen in Figur 44

Deutlich ist in den Tabellen 10 und 11 die gesteigerte Produktion von Acetat, Acetoin, Formiat, Succinat und Butandiol in dem Zeitraum zwischen $t = 25$ h und $t = 30$ h zu erkennen, in dem das Redoxpotential bei Werten um -350 mV liegt. Die Proteinbildung hat dagegen eindeutig ihr Maximum in dem Zeitraum zwischen $t = 10$ h und $t = 20$ h.

Dieser Befund deutet darauf hin, daß mit dem Absinken des Redoxpotentials auf stark negative Werte eine Umstellung des Energiestoffwechsels vom aeroben auf einen Gärungsstoffwechsel einhergeht. Dabei ist der Zeitraum, in dem das Redoxpotential ein Plateau von ca. -100 mV hält, als Übergangsphase der Stoffwechselumstellung zu werten, in welcher die Organismen zwar bereits sauerstofflimitiert sind, ihren Stoffwechsel jedoch noch nicht auf Gärung umgestellt haben. In dem in Figur 44 dargestellten Fermentationsausschnitt beträgt diese Übergangsphase ca. 12 Stunden.

Aus den in Figur 44 dargestellten Werten der Abgasanalytik läßt sich nebenbei gut der $k_L \cdot a$ -Wert des Sauerstoffeintrags unter den Fermentationsbedingungen ohne Rühren ermitteln. So wurde während des Steady-states der Biomasse (z.B. $t = 20$ h) eine Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} von ca. 1.9 mmol/(l·h) errechnet. Der Wert des Q_{O_2} entspricht nach Gl. 13:

$$dC_{O_2}/dt = OTR - Q_{O_2}$$

unter stationären Bedingungen ($dC_{O_2}/dt = 0$) dem Wert der Sauerstoffeintragsrate OTR. Während des Steady-states der Biomasse liegt die Konzentration des gelösten Sauerstoffs C_{O_2} nahe bei 0 mmol/l. Die Sättigungskonzentration des Sauerstoffs $C_{O_2}^*$ kann als 7 mg/l bzw. 0.22 mmol/l angenommen werden (vergl. Abschnitt 2.4.2). Löst man Gl. 15 nach $k_L \cdot a$ auf, so ergibt sich:

$$k_L \cdot a = OTR / (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad \text{und}$$

$$k_L \cdot a = 1.9 / (0.22 - 0) = 8.2 \text{ h}^{-1}$$

Größenordnungsmäßig kann für $k_L \cdot a$ unter den beschriebenen Bedingungen also ein Wert von ca. 10 h^{-1} angenommen werden.

6.6. Versuche zur Regelung des Redoxpotentials

Die exakte quantitative Messung des Sauerstoffgehalts durch das Redoxpotential macht es möglich, diesen mittels einer geeigneten Methode zu regeln. Ziel einer solchen Regelung sollte dabei sein, ein Abstürzen des Redoxpotentials auf stark negative Werte zu verhindern und den Sauerstoffgehalt in dem Bereich festzuhalten, der einer maximalen Xylanaseproduktion entspricht.

Folgende Methoden zur Beeinflussung des Redoxpotentials wurden in Betracht gezogen:

1. Variation der Verweilzeit
2. Variation des Sauerstoffeintrags OTR
Rührerdrehzahl
Belüftungsrate
unterschiedliche Gaszusammensetzung
3. Variation des pH-Wertes
4. elektrochemische Methoden

Mit den beiden letztgenannten Methoden kann zwar das Redoxpotential im Sinne einer Regelung beeinflusst werden, sie berücksichtigen jedoch nicht den Zusammenhang des Redoxpotentials mit dem Sauerstoffgehalt in der Kulturbrühe und wurden daher als ungeeignet verworfen.

Dieser Zusammenhang ist dagegen bei den ersten beiden Methoden gegeben. Der Einfluß der Verweilzeit τ bzw. der Durchflußrate D auf die stationäre Sauerstoffkonzentration $C_{O_2,stat}$ ist in Gl. 20 theoretisch dargestellt:

$$C_{O_2,stat} = \frac{K_o \cdot D}{\mu_{max} - D} \quad [\text{mmol/l}]$$

Wie Gl. 20 zeigt, steigt die stationäre Sauerstoffkonzentration mit steigender Durchflußrate an und sinkt umgekehrt mit kleiner werdender Durchflußrate. Die Reaktion des Redoxpotentials auf eine Verweilzeitänderung wird dabei vermutlich relativ träge sein.

Eine spontanere Änderung des Redoxpotentials ist dagegen von einer Änderung des Sauerstoffeintrags OTR zu erwarten (Gl. 13):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - Q_{O_2} \quad [\text{mmol}/(l \cdot h)]$$

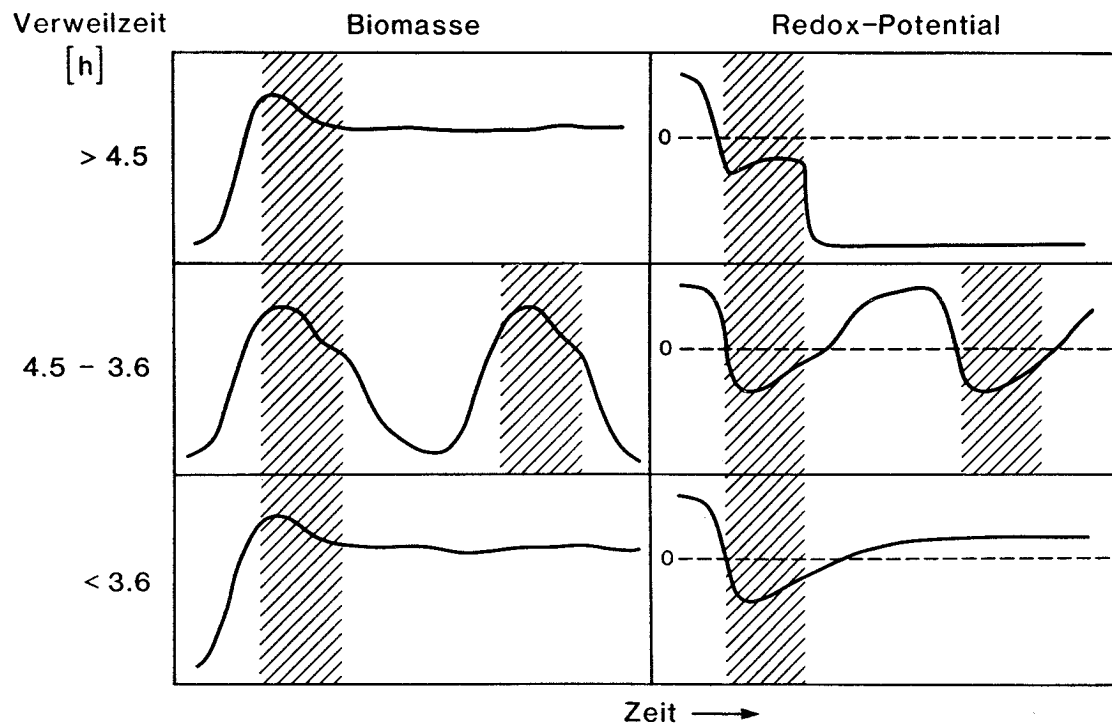
Eine Vergrößerung des Sauerstoffeintrags OTR hat demnach eine direkte Steigerung des Sauerstoffgehalts in der Kulturbrühe zur Folge. Im

Gegensatz zur Variation der Verweilzeit ändert eine Variation des OTR jedoch nicht die stationäre Sauerstoffkonzentration.

In einer Reihe von Versuchen sollte daher zunächst der Versuch gemacht werden, den Sauerstoffgehalt bzw. das Redoxpotential in der Kulturflüssigkeit über die Verweilzeit zu beeinflussen.

6.6.1. Versuch der Beeinflussung des Redoxpotentials über die Verweilzeit

Zunächst wurden kontinuierliche Fermentationen durchgeführt, bei denen das zeitliche Verhalten der Kultur und des Redoxpotentials bei verschiedenen konstanten Verweilzeiten untersucht wurde. Dazu wurden erneut gezielt pH-Streßphasen eingesetzt, mit denen der Steady-state der Kultur immer wieder gestört werden und dadurch jedesmal erneut das "Anfahrverhalten" aus der Sauerstoffsättigung in die Sauerstofflimitierung durchlaufen werden konnte.



Figur 45: Schematische Darstellung des zeitlichen Verhaltens von Biomasse und Redoxpotential in unterschiedlichen Verweilzeitbereichen der chemostatischen Fermentation.

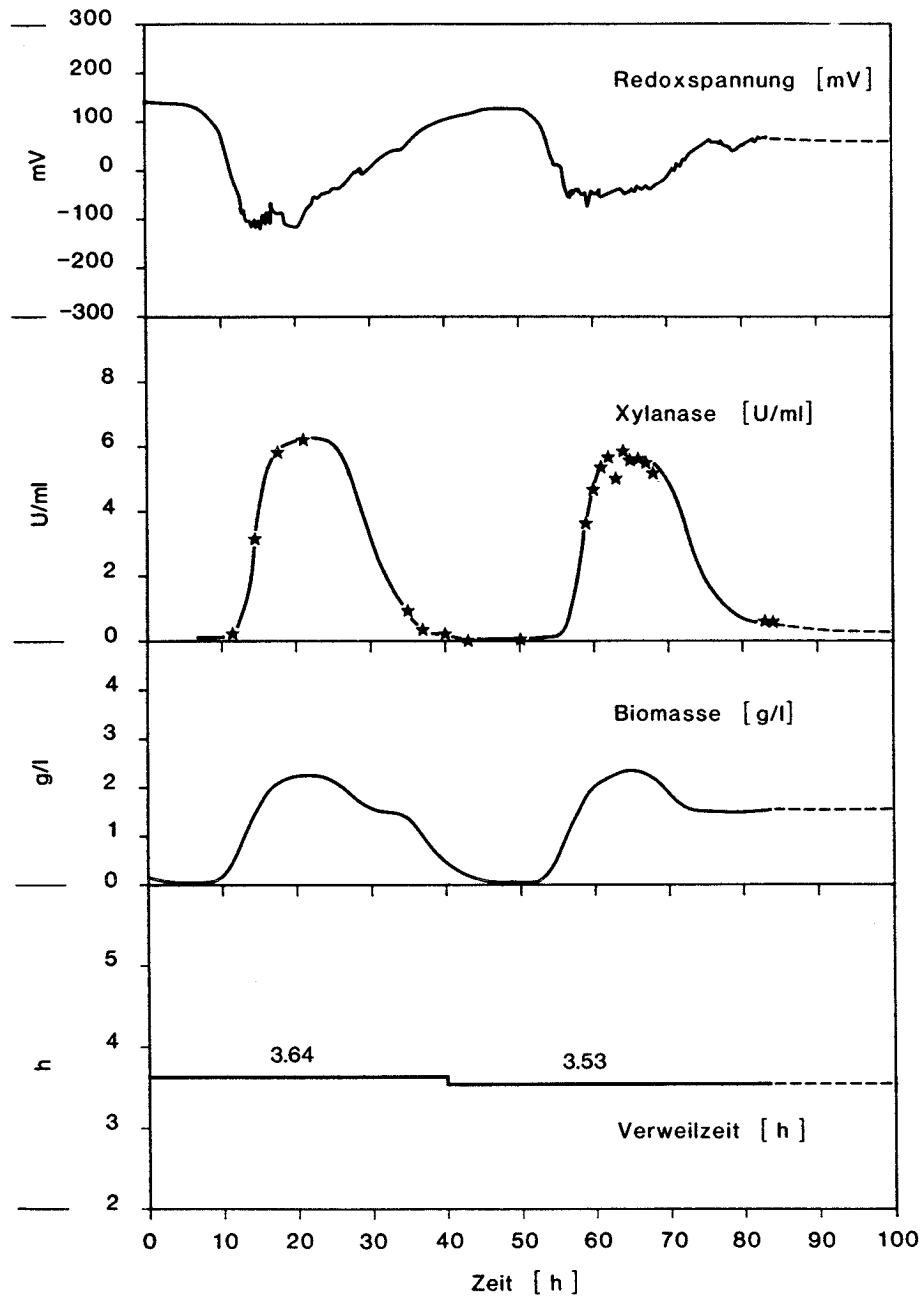
Zeiträume mit Xylanaseproduktion sind schraffiert dargestellt

In Figur 45 sind zusammenfassend die "Anfahrvorgänge" für Biomassekonzentration und Redoxpotential bei unterschiedlichen konstanten Verweilzeiten dargestellt. Dabei zeigt sich zwar einerseits eine deutliche Abhängigkeit des stationären Redoxpotentials von der Verweilzeit. Die Änderung des stationären Redoxpotentials mit der Verweilzeit ist dabei jedoch nicht stetig, wie nach Gl. 20 zu erwarten ist, sondern es zeigen sich drei scharf voneinander abgegrenzte Verweilzeitbereiche, in denen sich das Redoxpotential grundsätzlich unterschiedlich verhält.

Bei Verweilzeiten, die größer als 4.5 Stunden sind, ist das von den bisherigen Fermentationen bekannte Bild mit anfangs stark steigender und dann in einen Steady-state einlaufender Biomasse und dem stufenförmigen Absinken des Redoxpotentials gültig.

Auch bei Verweilzeiten kleiner 3.6 Stunden erreicht die Biomasse nach einer Anfangsphase einen Steady-state. Das Redoxpotential sinkt zunächst ebenfalls auf negative Werte ab, fällt dann aber im Gegensatz zu den längeren Verweilzeiten nicht auf stark negative Werte ab. In diesem Verweilzeitbereich kann also offensichtlich die in Abschnitt 6.5.1. dargestellte Stoffwechselumstellung auf Gärung verhindert werden. Gärungsprodukte wie Ethanol, Butandiol oder Lactat sind in diesem Verweilzeitbereich nicht zu beobachten, wohl dagegen Acetat und Acetoin, die auch unter aeroben Bedingungen gebildet werden. Das Redoxpotential bleibt jedoch nicht dauerhaft in dem mäßig negativen Bereich, sondern steigt langsam wieder auf Werte um oder leicht über 0 mV an. Eine Xylanaseproduktion findet, wie im Fall längerer Verweilzeiten, nur im Bereich der mäßig negativen Redoxwerte statt.

Aufgrund dieses in Bezug auf das Redoxpotential konträren Verhaltens lag die Vermutung nahe, daß in dem Bereich zwischen 3.6 und 4.5 Stunden Verweilzeiten existieren, bei denen das Redoxpotential weder ins Negative abstürzt, noch ins Positive ansteigt sondern auf den mäßig negativen Werten verbleibt, bei denen die Xylanaseproduktion stattfindet. Diese Erwartung erfüllte sich jedoch nicht, stattdessen durchläuft die Kultur in diesem Verweilzeitbereich stabile Eigenschwingungen, in deren Verlauf das Redoxpotential ebenfalls stark zwischen positiven und negativen Werten schwankt. Xylanaseproduktion findet dabei jeweils beim Durchlaufen der Bereiche leicht negativer Redoxwerte statt.



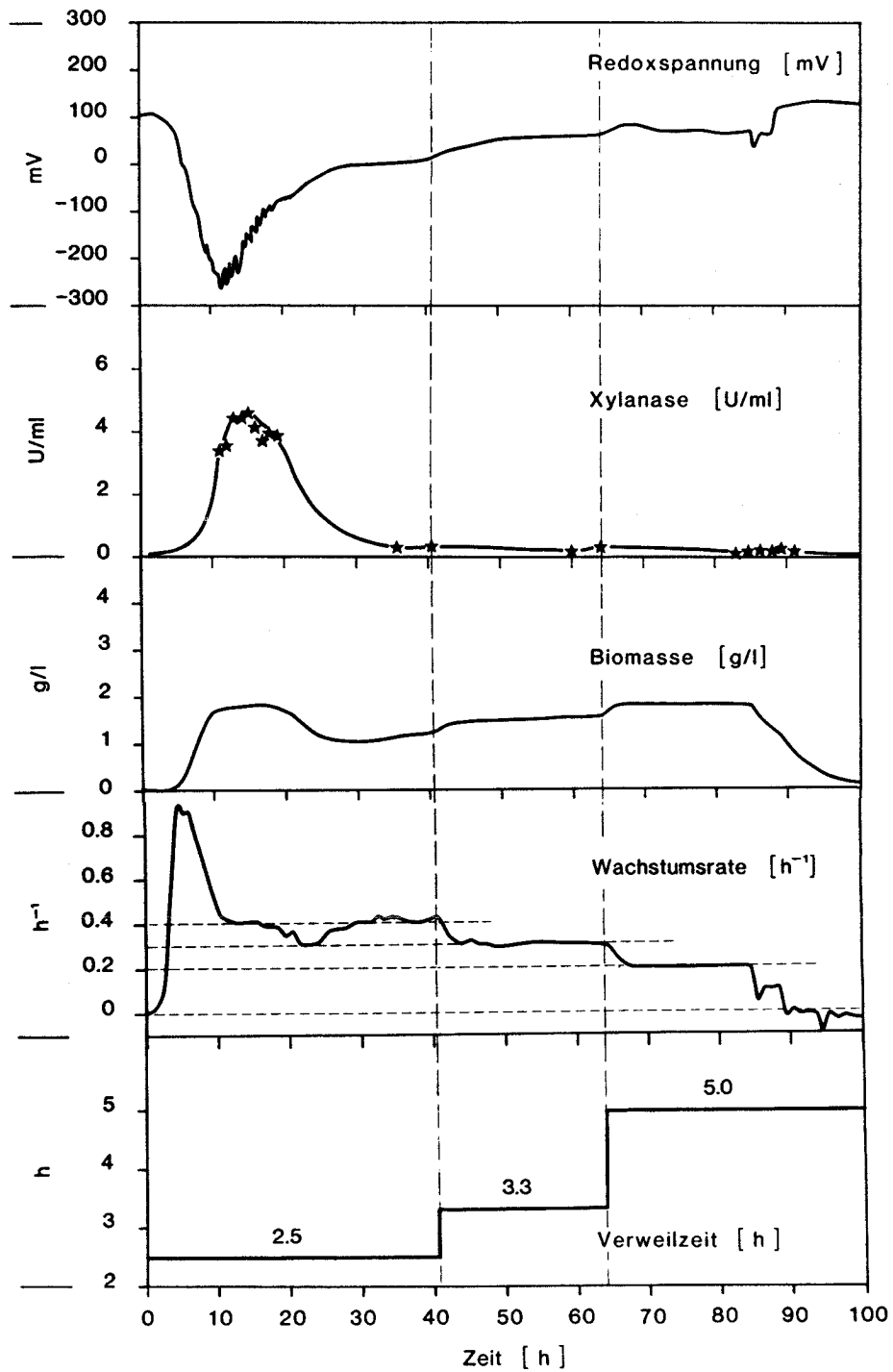
Figur 46: Unterschiedliches Verhalten der Kultur bei Verweilzeitverkürzung von 3.64 auf 3.53 Stunden

Ein Beispiel für die scharfe Grenze zwischen dem unteren und dem mittleren Verweilzeitbereich zeigt Figur 46. Dargestellt sind Redoxpotential, Xylanaseaktivität, Biomassekonzentration und die Verweilzeit der Fermentation über der Zeit. Während der ersten 40 Stunden des Ausschnitts beträgt die Verweilzeit 3.64 Stunden. Die Kultur erreicht nach dem Hochwachsen der Biomasse keinen Steady-state, sondern wäscht nach kurzer Zeit wieder aus. Wäre die Verweilzeit im Folgenden bei konstant 3.64 Stunden belassen worden, hätte eine stabile Schwingung der Biomasse resultiert. Im zweiten Teil des gezeigten Ausschnitts wurde die Verweilzeit jedoch um nur 0.11 Stunden auf 3.53 Stunden verkürzt. In diesem Fall läuft die Biomasse in einen Steady-state ein. Das Redoxpotential verhält sich in beiden Fällen, wie in Figur 45 angegeben.

In weiteren Ansätzen wurde versucht, das Redoxpotential durch gezielte Veränderungen der Verweilzeit daran zu hindern, auf stark negative Werte abzusinken oder auf positive Werte anzusteigen. Figur 47 zeigt einen weiteren Ausschnitt aus der gleichen kontinuierlichen Fermentation. Dargestellt sind wieder Redoxpotential, Xylanaseaktivität, Biomassekonzentration und Verweilzeit. Zusätzlich ist die Wachstumsrate der Organismen angegeben.

Begonnen wurde dieser Abschnitt mit einer kurzen Verweilzeit von 2.5 Stunden. Die Verweilzeit lag damit unterhalb der o.g. Grenze von 3.6 Stunden. Die Biomasse erreichte analog dem Schema in Figur 45 einen Steady-state, während das Redoxpotential nach Durchlaufen negativer Werte wieder auf Werte um 0 mV anstieg. Um den Anstieg des Redoxpotentials zu stoppen, wurde die Verweilzeit daher nach 40 Stunden auf 3.3 Stunden verlängert. Die Biomasse stieg durch diese Maßnahme zwar von ca. 1.1 g/l auf 1.5 g/l, ein Absinken des Redoxpotentials konnte dadurch jedoch nicht erreicht werden. Auch eine weitere Verlängerung der Verweilzeit auf 5 Stunden und damit in den Verweilzeitbereich über 4.5 Stunden, in dem es sonst zum Abfallen des Redoxpotentials auf stark negative Werte kommt, führte zu keiner Erniedrigung des Redoxpotentials, obwohl die Biomassekonzentration auf ca. 1.9 g/l anstieg.

Der Grund für dieses zunächst überraschende Verhalten ist wahrscheinlich darin zu sehen, daß eine Beeinflussung des Redoxpotentials durch die Verweilzeit nach dem Übergang in einen Steady-state mit entweder stark negativen oder aber positiven Redoxwerten nur über eine grundlegende Änderung des Energiestoffwechsels (aerob \rightarrow Gärung) erreichbar ist. Solche Stoffwechseländerungen vollziehen sich jedoch nur mit vergleichsweise langen Totzeiten. Die Art des Stoffwechsels und damit die Frage, ob das stationäre Redoxpotential im positiven oder stark negativen



Figur 47: Versuch der Beeinflussung des Redoxpotentials durch Verlängern der Verweilzeit

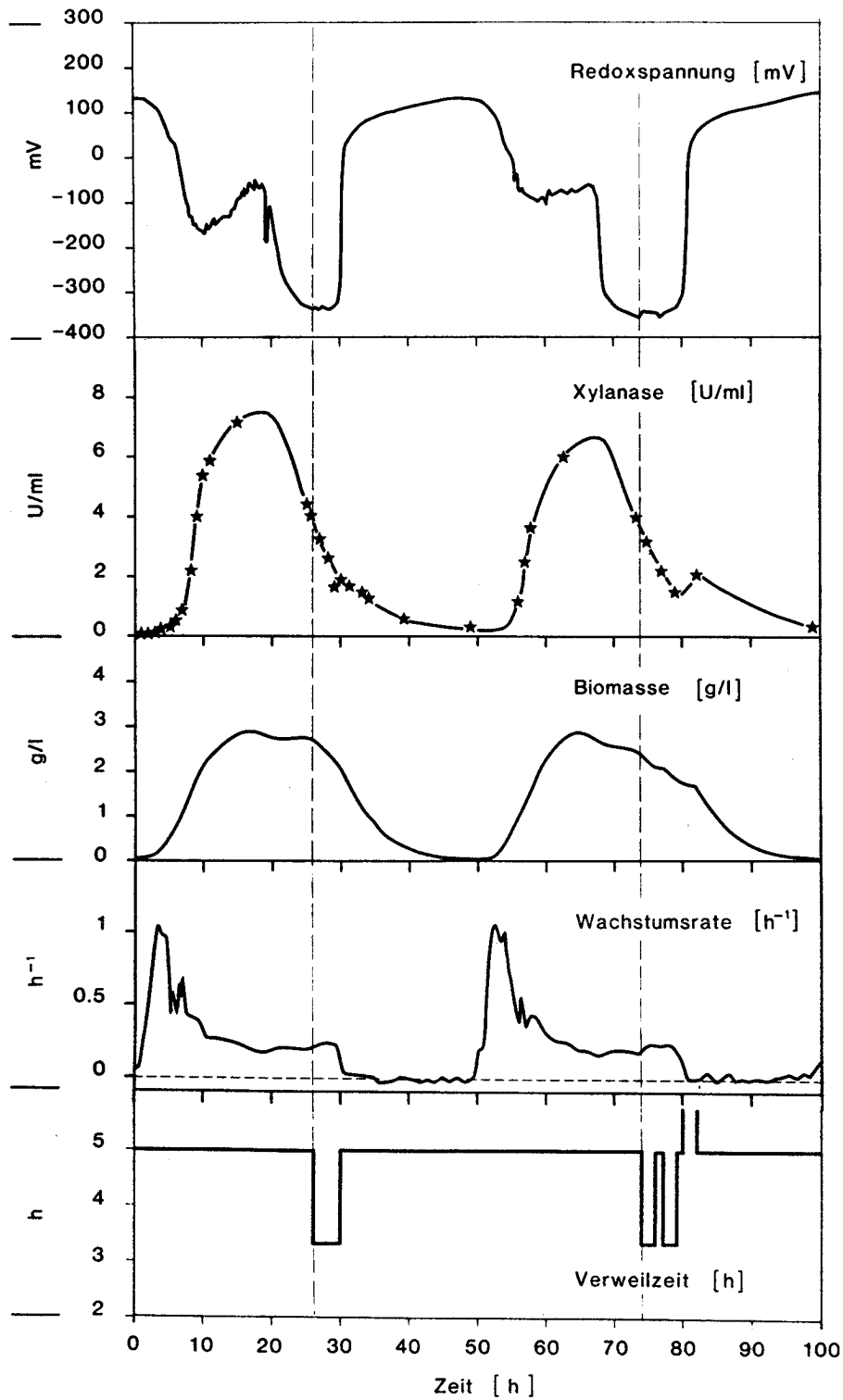
Bereich liegt, entscheidet sich dabei offensichtlich nach den Bedingungen, die in jenen ersten Stunden nach dem Einlaufen der Organismen in einen sauerstofflimitierten Steady-state vorliegen, in denen das Redoxpotential vorübergehend mäßig negative Werte hat und in welchen auch die Xylanaseproduktion stattfindet.

Diese Interpretation bestätigte sich auch im folgenden Versuch, in dem umgekehrt versucht wurde, ausgehend von einer langen Verweilzeit das Absinken des Redoxpotentials auf stark negative Werte durch gezieltes Verkürzen der Verweilzeit zu verhindern.

Figur 48 zeigt einen weiteren Ausschnitt aus der gleichen kontinuierlichen Fermentation, beginnend mit einer Verweilzeit von 5 Stunden. Die Fermentation befindet sich daher im Verweilzeitbereich von über 4.5 Stunden, sodaß die Biomasse in einen Steady-state einläuft und das Redoxpotential den typischen stufenförmigen Verlauf zeigt. Nachdem das Redoxpotential auf stark negative Werte um -350 mV abgesunken war, wurde die Verweilzeit für 4 Stunden auf 3.3 Stunden verkürzt. Dadurch kam es erwartungsgemäß zu einer Abnahme der Biomasse, die Wirkung auf das Redoxpotential war jedoch nur gering. Nach 4 Stunden wurde die Verweilzeit daher wieder auf 5 Stunden verlängert. Die Kultur kehrte darauf jedoch nicht auf ihren alten Steady-state zurück, sondern stellte ihr Wachstum ganz ein. Das hatte zur Folge, daß die Kultur auswusch und das Redoxpotential schlagartig auf positive Werte anstieg.

Nachdem die Biomasse nach dem Auswaschvorgang wieder zugenommen hatte, wurde ein zweiter Versuch gemacht. Wieder wurde die Verweilzeit nach dem Absinken des Redoxpotentials auf ca. -350 mV für insgesamt 4 Stunden von 5 auf 3.3 Stunden verkürzt. Die kürzere Verweilzeit wurde jedoch "pulsartig" auf zweimal 2 Stunden mit einer Zwischenzeit von einer Stunde Dauer verteilt. Auch in diesem Versuch kam es während der kürzeren Verweilzeit jeweils zu einer Abnahme der Biomassekonzentration, der beabsichtigte Anstieg des Redoxpotentials war jedoch zunächst nur gering. Während des zweiten "Puls" mit 3.3 Stunden Verweilzeit kam es dann plötzlich zu einem raschen Ansteigen des Redoxpotentials. Um ein Überschwingen auf positive Werte zu verhindern, wurde die Verweilzeit sofort wieder auf 5 Stunden verlängert und nach 0.7 weiteren Stunden der kontinuierliche Betrieb für 2 Stunden ganz gestoppt (Batch). Die Kultur hatte ihr Wachstum zu dieser Zeit jedoch bereits eingestellt, sodaß die Organismen bei erneutem kontinuierlichem Betrieb ausgewaschen wurden.

Auch an diesem Beispiel wird deutlich, daß eine gezielte Beeinflussung des Redoxpotentials praktisch unmöglich ist, nachdem das Redoxpotential den Bereich mäßig negativer Werte verlassen hat.



Figur 48: Versuch der Beeinflussung des Redoxpotentials durch Verkürzen der Verweilzeit

Anhand der hier aufgeführten Ergebnisse läßt sich zusammenfassend feststellen:

Die kontinuierliche Kultur zeigt in scharf voneinander abgrenzbaren, unterschiedlichen Verweilzeitbereichen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich des sich einstellenden Redoxpotentials. Bei langen Verweilzeiten bildet sich im Steady-state ein stark negatives Redoxpotential aus, bei kurzen Verweilzeiten steigt das Redoxpotential während des Steady-states wieder auf positive Werte an. Dazwischen existiert ein Bereich mit Biomasseschwingungen.

Ein stationäres Verweilen des Redoxpotentials auf Werten, bei denen eine Xylanaseproduktion stattfindet, konnte bei keiner Verweilzeit beobachtet werden. Diese mäßig negativen Redoxpotentiale traten stets nur in instationären Übergangsphasen auf, in denen sich der Stoffwechsel auf einen Steady-state umstellt.

Die Verweilzeitbereiche sind mit unterschiedlichen Wegen des Energiestoffwechsels im Steady-state verbunden. So zeigen die Organismen bei langen Verweilzeiten einen Gärungsstoffwechsel mit 2,3-Butandiol, Lactat, Succinat und Ethanol als Produkten. Bei kurzen Verweilzeiten liegt dagegen ein aerober Stoffwechsel vor, bei dem allenfalls Acetat und Acetoin als Produkte auftreten (vergl. Abschnitt 2.3).

Der Übergang von dem einen Stoffwechsel auf den anderen ist mit erheblichen Totzeiten verbunden, starkes Verlängern oder Verkürzen der Verweilzeit kann dabei sogar zum Auswaschen der Kultur führen. Diese Totzeiten machen ein regelndes Wirken auf das Redoxpotential unmöglich, sobald sich die Kultur in einem Steady-state befindet. Eine Regelung muß daher in den Prozeß eingreifen ehe sich ein endgültiges Redoxpotential in einem Steady-state eingestellt hat.

Da eine Variation der Verweilzeit auch bei rechtzeitigem Eingreifen nur eine sehr träge Reaktion auf das sich ändernde Redoxpotential ermöglicht, ist mit dieser Methode eine gezielte Beeinflussung und damit Regelung des Redoxpotentials nicht möglich.

6.6.2. Regelung des Redoxpotentials durch Variation der Rührerdrehzahl

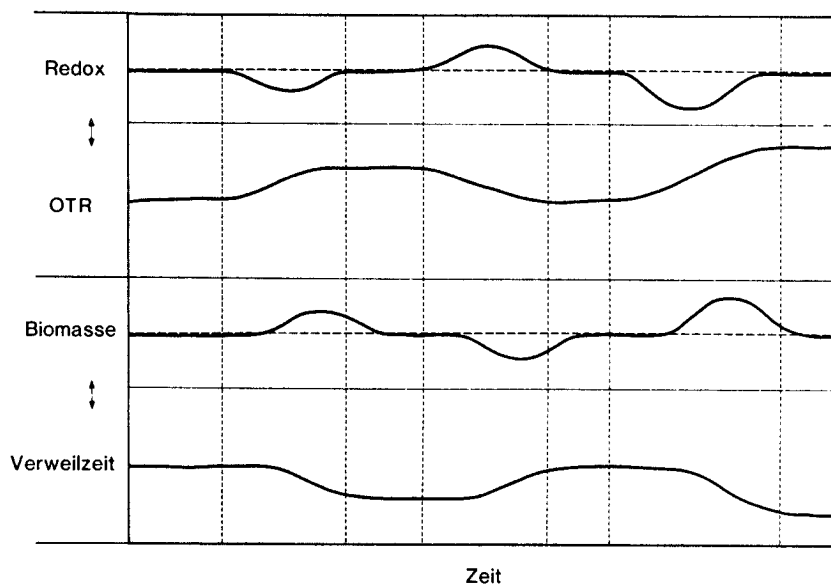
Da das Redoxpotential unter den gegebenen Fermentationsbedingungen in erster Linie vom Sauerstoffgehalt in der Kulturbrühe abhängig ist, ist, wie eingangs anhand Gl. 13 gezeigt, eine direkte Beeinflussung durch eine gezielte Variation des Sauerstoffeintrags OTR in die Flüssigkeit möglich. Dies kann nach Gl. 15 vor allem durch eine Veränderung von $k_L \cdot a$ und hier vor allem durch Veränderung der volumenbezogenen Phasengrenzfläche a (m^{-1}) erreicht werden. Die Größe von a ist bei einem konstanten Gasstrom in erster Linie von der Rührerdrehzahl n (min^{-1}) abhängig (Gl. 16 und 17). Von den eingangs genannten Möglichkeiten wurde daher das Verfahren der Variation der Rührerdrehzahl gewählt.

Als Vorteil dieses Verfahrens zur Beeinflussung des Redoxpotentials wurde dabei die spontane Reaktion des Redoxpotentials auf eine Änderung des Sauerstoffeintrags angesehen, während sich eine Verweilzeitänderung nur langsam auf den Sauerstoffgehalt bzw. das Redoxpotential auswirken kann. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, den in Abschnitt 6.6.1. dargestellten Totzeiten von Stoffwechselumstellungen Rechnung zu tragen, die eine Beeinflussung des Redoxpotentials unmöglich machen, wenn sich erst einmal stationäre Zustände eingestellt haben.

Vorab wurde zu diesem Verfahren folgende theoretische Überlegung angestellt (Figur 49): Soll das Redoxpotential durch Variation des Sauerstoffeintrags $OTR = f(n)$ auf seinem Sollwert (in der Darstellung: gestrichelte Linie) gehalten werden, so muß der Sauerstoffeintrag gesteigert werden, wenn das Redoxpotential die Tendenz hat zu sinken. Umgekehrt muß auf ein tendenziell steigendes Redoxpotential mit einer Verringerung des Sauerstoffeintrags reagiert werden. Da die Organismen in der Kultur aber sauerstofflimitiert sind, die Wachstumsrate μ der Organismen nach Gl. 12 also direkt von der Sauerstoffkonzentration in der Kulturflüssigkeit abhängig ist, hat z.B. eine Steigerung des Sauerstoffeintrags eine Erhöhung der Biomassekonzentration zur Folge. Bei konstanter Verweilzeit und durch die Regelung konstantbleibender Sauerstoffkonzentration würde die vergrößerte Biomasse einen vergrößerten Sauerstoffbedarf $Q_{O_2} = q_{O_2} \cdot X$ haben. Das Redoxpotential würde dadurch weiterhin die Tendenz haben zu sinken und der Sauerstoffeintrag OTR müßte weiter erhöht werden.

Dieses System wäre nicht stabil und würde seine Grenze z.B. in der maximalen Rührerdrehzahl des Fermenters oder der einsetzenden Limitierung durch ein anderes Substrat als Sauerstoff haben. Im umgekehrten Fall, wenn das Redoxpotential die Tendenz hat zu steigen, würde die Biomassekonzentration sinken und die Regelung hätte ihre Grenze in der Rührerdrehzahl Null. Um dieses instabile Regelverhalten zu vermeiden, muß daher neben der ersten Regelung des Redoxpotentials durch die

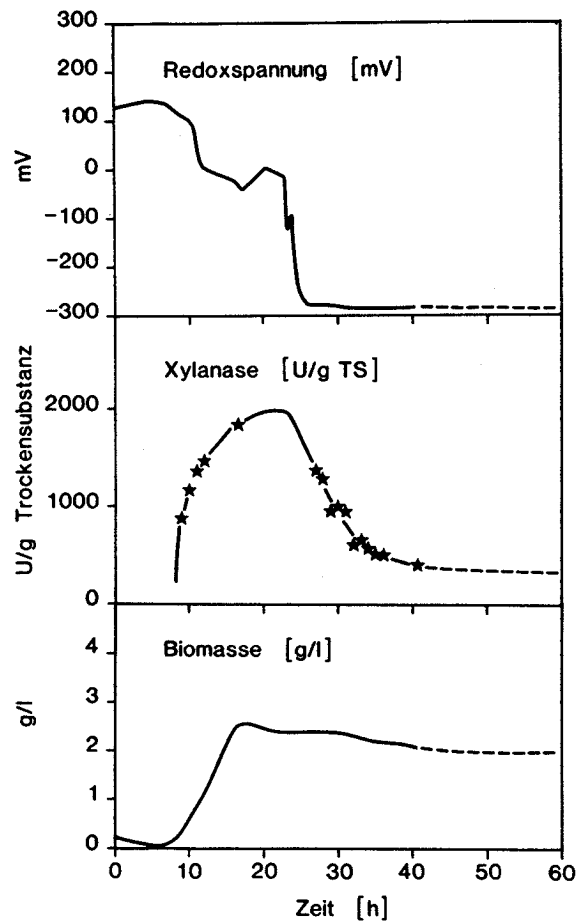
Rührerdrehzahl die Biomassekonzentration mit einer simultanen zweiten Regelung durch Variation der Verweilzeit konstant gehalten werden.



Figur 49: Theoretische Überlegung zur Regelung des Redoxpotentials durch den Sauerstoffeintrag OTR und zur Regelung der Biomassekonzentration durch die Verweilzeit

Da im Zuge dieser Regelung und im Gegensatz zu den meisten vorangegangenen Fermentationen, bei denen nicht gerührt wurde, mit verstärkter Schaumbildung im Fermenter zu rechnen war, wurden dem zulaufenden Medium die in Abschnitt 5.3.2. genannten Antischaummittel zugesetzt. Hierdurch verstärkte sich die Koaleszenz der Blasen, sodaß sich die spezifische Phasengrenzfläche a und damit der Sauerstoffeintrag in die Kulturbrühe stark verringerte. Das hatte zur Folge, daß bei Fermentation ohne Rührung bei einer Verweilzeit von 5 Stunden aufgrund der Sauerstofflimitierung nur eine Biomassekonzentration < 1 g/l im Steady-state erreicht wurde. Diese unerwünschte Nebenwirkung des Antischaummittels konnte ausgeglichen werden, indem, solange keine Redoxregelung stattfand, standardmäßig mit einer festen Drehzahl von 300 /min gearbeitet wurde.

Da die stationären Werte der Biomassekonzentration und des Redoxpotentials bei dieser Drehzahl wieder mit denen übereinstimmten, die sich ohne Antischaummittelzugabe ergeben hatten, kann davon ausgegangen werden, daß auch der Wert von $k_L \cdot a$ unter diesen Bedingungen wieder in der Größenordnung von 10 h^{-1} lag.



Figur 50: Ausschnitt aus kontinuierlicher Fermentation ohne Redoxregelung. Gleiche Bedingungen wie in nachfolgendem Regelungsversuch

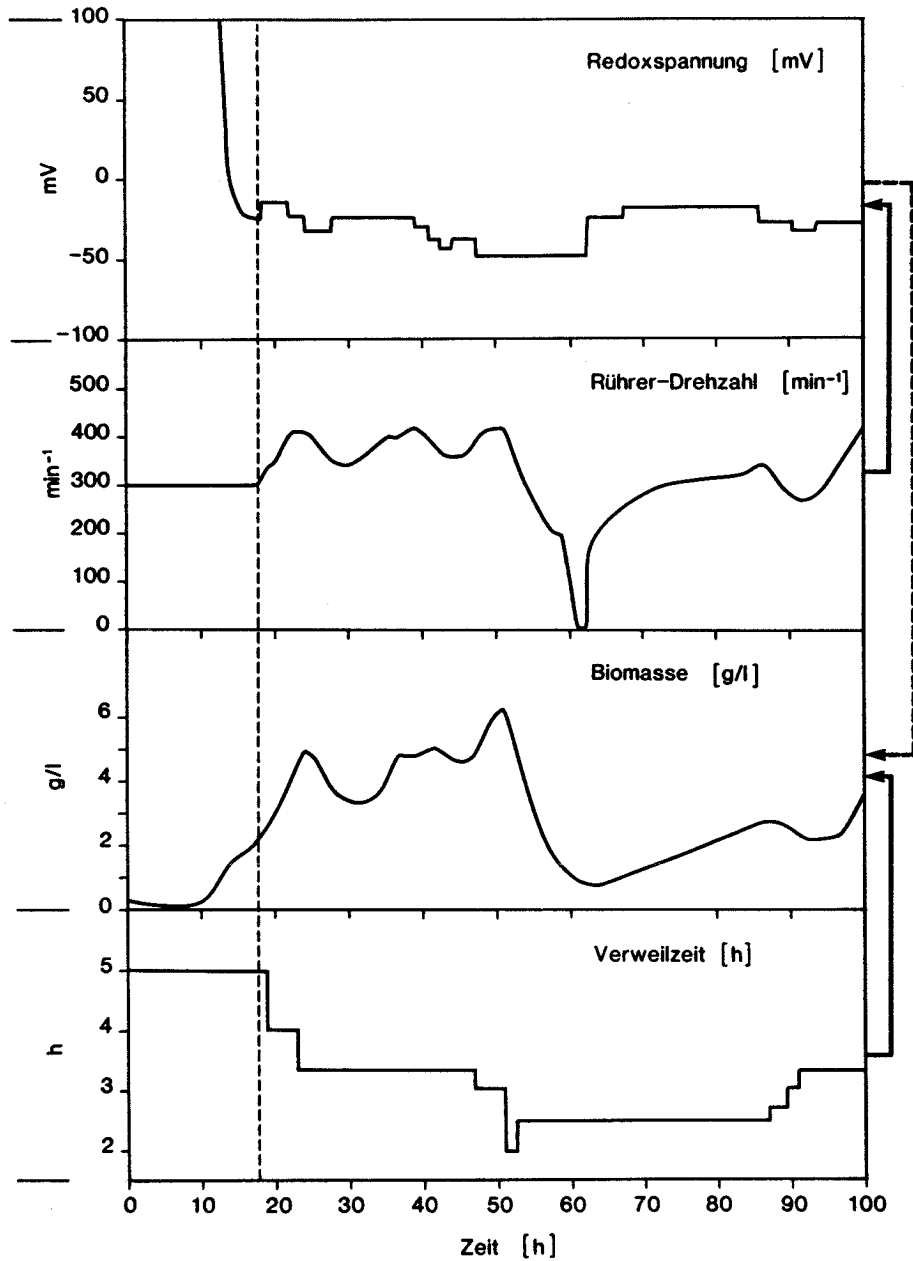
Zur Ermittlung der Werte des Redoxpotentials unter denen bei diesen leicht veränderten Versuchsbedingungen die maximale Xylanaseproduktion stattfindet, wurde zunächst in der gleichen Fermentation, in der auch die Regelung des Redoxpotentials stattfinden sollte, ein unregelter Vorversuch durchgeführt. Figur 50 zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus der kontinuierlichen Fermentation. Dargestellt ist das Redoxpotential, die Biomassekonzentration und die auf die Biomasse bezogene Xylanaseaktivität (U/gTS). Die Verweilzeit betrug 5 Stunden und lag damit im Verweilzeitbereich größer 4.5 Stunden. Das Redoxpotential zeigt daher seinen typischen stufenförmigen Verlauf mit dem Übergangsbereich mäßig negativer Werte, bei denen die Xylanaseproduktion stattfindet. Dieses Plateau des Redoxpotentials liegt unter den neuen Bedingungen in einem Bereich von ca. 0 bis -50 mV.

Nachfolgend wurde daraufhin der Versuch gemacht, das Redoxpotential mittels externer Ansteuerung der Rührerdrehzahl durch den Redoxregler in dem Bereich zwischen 0 und -50 mV zu halten und dadurch eine anhaltende Xylanaseproduktion zu erreichen.

Die zweite Regelung zur Konstanthaltung der Biomasse stand während des Versuchs allerdings nicht zur Verfügung. Im praktischen Versuch mußte die Verweilzeit daher durch Handverstellung jeweils zumindest so angepaßt werden, daß die Biomassekonzentration stets in einem solchen Bereich blieb, daß die Regelung des Redoxpotentials gewährleistet blieb. Da jedoch befürchtet wurde, daß schlagartiges Verändern der Verweilzeit in großen Stufen durch Handeinstellung (im Gegensatz zum stetigen Verändern durch einen Regler) zum Auswaschen der Kultur führen könnte, wie in einigen Versuchen zur Variation der Verweilzeit dargestellt, wurde zusätzlich versucht, die Biomassekonzentration durch leichte Veränderungen des Redox-Sollwerts innerhalb des Sollbereichs zwischen 0 und -50 mV zu beeinflussen.

Mit diesem Verfahren hat man durch die resultierenden leichten Veränderungen der Sauerstoffkonzentration die Möglichkeit, direkt die Wachstumsrate μ zu beeinflussen. Bei konstantem Redoxpotential und der entsprechend konstanten Sauerstoffkonzentration ist dagegen nach Gl. 17 die Wachstumsrate μ ebenfalls konstant, sodaß die Biomasse nur durch die Verweilzeit beeinflußt werden kann.

In Figur 51 sind die beiden Regelkonzepte anhand des Ausschnitts aus der kontinuierlichen Fermentation, in dem die Regelung des Redoxpotentials durchgeführt wurde, dargestellt. Während der ersten 17.7 Stunden des gezeigten Ausschnitts wuchs die Biomasse nach einem vorausgegangenem Auswaschvorgang wieder hoch. Das Redoxpotential sank während dieser Zeit aufgrund der Sauerstoffabnahme von positiven Werten auf ein Plateau bei -25 mV ab. Eine Redoxregelung fand dabei noch nicht statt. Die Rührerdrehzahl betrug konstant 300 min^{-1} und die Verweilzeit τ konstant 5 Stunden.



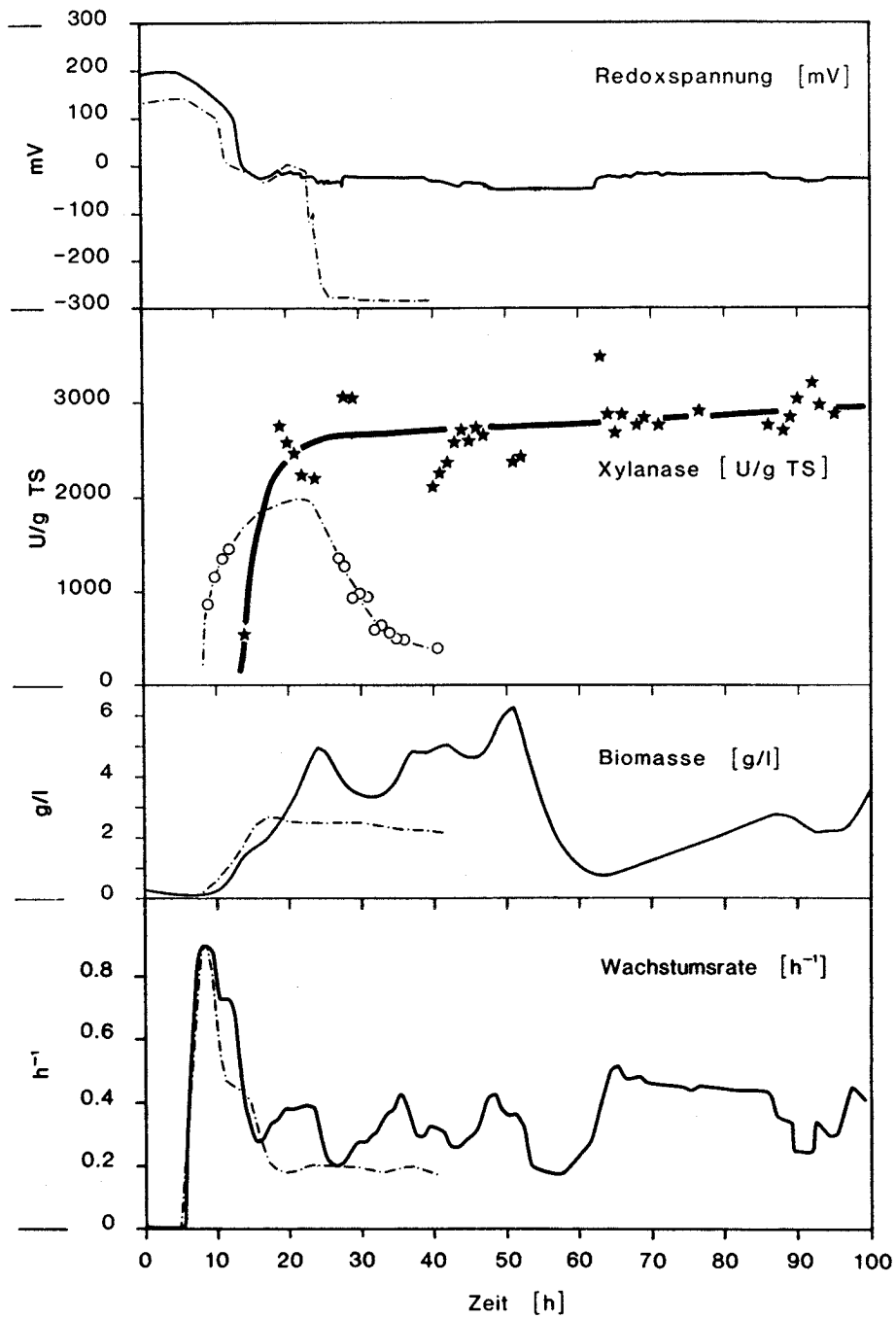
Figur 51: Darstellung des Regelungskonzepts anhand des Fermentationsausschnitts mit Redoxregelung

- Direkte Regelung
- - - - -→ Zusätzliche Abhängigkeit

Schon während dieser Übergangsphase und damit deutlich bevor das Redoxpotential mit einer Stoffwechselumstellung auf stark negative Werte abstürzen konnte wurde nach 17.7 Stunden die Redoxregelung aktiviert. Der erste Redox-Sollwert war mit -15 mV geringfügig positiver, als das letzte freie Redoxpotential. Da der Regler hierzu die Rührerdrehzahl und damit den Sauerstoffeintrag erhöht, nimmt die Biomasse in ihrer Konzentration weiter zu, anstatt in einen Steady-state einzuschwingen. Um den oben beschriebenen Konsequenzen der ungehinderten Biomassezunahme vorzubeugen, wurde zur Zeit $t = 19$ h die Verweilzeit der Kultur von 5 auf 4 Stunden verkürzt. Da die Wirkung dieser Maßnahme auf die Biomassezunahme zunächst gering war, wurde bei $t = 22$ h der Redox-Sollwert auf -25 mV und bei $t = 23$ h die Verweilzeit auf 3.3 Stunden verstellt. Von $t = 23$ bis $t = 47$ h wurde die Verweilzeit konstant gehalten. Alle Eingriffe zur Beeinflussung der Biomassekonzentration wurden während dieser Zeit über kleine Veränderungen des Redox-Sollwerts gemacht. Deutlich ist zu erkennen, wie die Kurve der Biomassekonzentration genau dem von den Redox-Sollwerten beeinflussten Verlauf der Rührerdrehzahl folgt. Zur Zeit $t = 47$ h wurde die Verweilzeit dann auf 3 Stunden und zur Zeit $t = 51$ h auf 2 Stunden verkürzt. Da es hierdurch zu einer starken Abnahme der Biomassekonzentration kam, wurde die Verweilzeit bereits zur Zeit $t = 52.5$ h wieder auf 2.5 Stunden verlängert. Trotzdem kam es in den folgenden Stunden zu einer so starken Biomasseverringerung, daß die Rührerdrehzahl zwischen $t = 61$ und $t = 62.5$ h auf Null zurückging. Bevor es dadurch zu einem unregelmäßigen Anstieg des Redoxpotentials kommen konnte, wurde der Redox-Sollwert von -50 auf -25 mV angehoben. Diese Maßnahme bewirkte einen sofortigen Anstieg der Rührerdrehzahl, und auch die Biomassekonzentration nahm in einem langsamen linearen Anstieg wieder zu. Die Verweilzeit wurde währenddessen bei 2.5 Stunden konstant gehalten. Erst nach $t = 84$ h wurde die Verweilzeit schrittweise wieder auf 3.3 Stunden verlängert, während gleichzeitig der Redox-Sollwert auf -30 mV abgesenkt wurde.

Insgesamt betrug die Zahl der Verweilzeiten während des gezeigten Ausschnitts 32 Verweilzeiten, von denen während 29 Verweilzeiten die Redoxregelung aktiv war. Die mittlere Verweilzeit während der Regelung betrug 2.84 Stunden.

Figur 52 stellt den gleichen Fermentationsausschnitt dar, wie Figur 51 und zeigt den Verlauf der Xylanaseproduktion während der Regelung des Redoxpotentials. Zum Vergleich ist dem geregelten Fermentationsausschnitt der unregelmäßige Ausschnitt aus Figur 50 gegenübergestellt. Dargestellt sind Redoxpotential, Xylanaseaktivität, Biomassekonzentration und die Wachstumsrate der Organismen aus beiden Ausschnitten. Aufgrund der sich stark ändernden Biomassekonzentration ist die Xylanaseaktivität auf die jeweilige Biomasse bezogen dargestellt.



Figur 52: Vergleich von Fermentationsausschnitten mit Regelung (durchgezogene Linien) und ohne Regelung (gestrichelte Linien) des Redoxpotentials. Konstant anhaltende Xylanaseproduktion bei Redoxregelung

Deutlich ist in Figur 52 zu erkennen, daß während der gesamten 29 Verweilzeiten, in denen die Redoxregelung aktiv war, die Xylanaseaktivität konstant bei ca. 2600 bis 3000 U/gTS erhalten bleibt. In dem unregulierten Vergleichsbeispiel bricht die Xylanaseproduktion dagegen bereits nach ca. 3 Verweilzeiten ab, da das Redoxpotential das Plateau bei 0 bis -50 mV verläßt und auf stark negative stationäre Werte abfällt.

Bei einer mittleren Verweilzeit von 2.84 Stunden ergibt sich bei einer mittleren Xylanaseaktivität von 2800 U/gTS eine biomassespezifische Produktivität von ca. 1000 U/(gTS·h). Das entspricht nahezu einer Verzehnfachung gegenüber dem maximal erreichten Wert von 110 U/(gTS·h) bei der Fermentation mit durch pH-Absenkung induzierten Biomassenschwingungen (vergl. Abschnitt 6.4.2) und einer Steigerung um den Faktor 30 gegenüber der biomassespezifischen Produktivitäten von 32 U/(gTS·h) in der Fermentation mit Eigenschwingungen der Biomasse (vergl. Abschnitt 6.4.1).

Eine Produktion der in Abschnitt 6.5.1. genannten Stoffwechselprodukte Essigsäure, Acetoin, 2,3-Butandiol, Ethanol, Lactat, Succinat und Formiat konnte während der gesamten Zeit mit Redoxregelung nicht beobachtet werden. So lag die Essigsäurekonzentration ständig unter 2 mmol/l, während die Konzentrationen der übrigen Substanzen mit den beschriebenen Methoden nicht nachweisbar waren.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß durch das rechtzeitige und spontan wirksame Regeln das Redoxpotential auf den mäßig negativen Werten des Übergangsbereichs gehalten werden konnte und damit sowohl ein Umstellen des Stoffwechsels auf Gärung, wie es ohne Regelung passiert wäre, als auch ein unerwünschtes Ansteigen des Redoxpotentials vollständig vermieden werden konnte.

Aufgrund der verschiedenartigen Beeinflussung der Biomassekonzentration sowohl durch Veränderungen am Redox-Sollwert wie durch Handverstellung der Verweilzeit kam es zu schwer überschaubaren Wechselwirkungen zwischen den beiden Einflüssen und dadurch zu den beobachteten Schwankungen in der Biomassekonzentration.

Vergleicht man den Verlauf der Wachstumsrate in Figur 52 mit den jeweils eingestellten Redox-Sollwerten (Figur 51), erkennt man daß die jeweiligen Werte der Wachstumsrate und damit deren starke Schwankungen genau den Änderungen des Redox-Sollwerts bzw. den resultierenden Sauerstoffkonzentrationen folgen, wie es auch nach Gl. 12:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_o + C_{O_2}} \quad [h^{-1}]$$

zu erwarten ist. Allerdings reagiert die Wachstumsrate nur mit gewisser Trägheit auf jeweils neue Redox-Sollwerte und damit neue konstante Sauerstoffpartialdrücke in der Kulturflüssigkeit und neigt daher meistens zu einem deutlichen Überschwingen.

Die Beeinflussung der Biomassekonzentration durch Ändern des Sollwerts des Redoxpotentials stellte jedoch nur einen Kompromiß dar, da die beschriebene automatische Regelung der Biomasse, basierend auf der kontinuierlichen Messung der optischen Dichte der Kultur, nicht zur Verfügung stand. Im Idealfall wird die Konzentration der Biomasse allein durch automatisch geregelte Variation der Verweilzeit konstant gehalten (turbidostatische Regelung), während das Redoxpotential über die Rührerdrehzahl auf einem festen Redox-Sollwert geregelt wird.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich mit diesem Verfahren der Regulation des Redoxpotentials über die Variation des Sauerstoffeintrags ein konstanter definierter Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit erzeugen läßt, der einer maximalen Xylanaseaktivität entspricht. Durch simultane Regelung der Biomassekonzentration läßt sich damit eine konstante hohe Ausbeute extrazellulärer Xylanase im Kulturfiltrat der kontinuierlichen Kultur gewinnen.

Wesentlich für den Erfolg dieses Verfahrens ist, daß die Regelung in den Prozeß eingreift, deutlich bevor es zu einem Abstürzen des Redoxpotentials und einer Stoffwechselumstellung kommt, die aufgrund langer Totzeiten praktisch irreversibel ist. Der entscheidende Vorteil der Regelung des Redoxpotentials über den Sauerstoffeintrag gegenüber der Verweilzeitvariation ist dabei das spontane Ansprechen des Redoxpotentials auf Änderungen der Rührerdrehzahl im Fermenter.

7. DISKUSSION

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sollen im folgenden diskutiert werden. Besondere Schwerpunkte sind dabei die Oszillationen der Biomasse, die Regulation der Xylanasesynthese in der Zelle, die Messung der für die Regulation charakteristischen Parameter sowie die Möglichkeiten aufgrund der Messung dieser Parameter mittels einer Regelung die Organismen in kontinuierlicher Kultur auf Dauer in einem Zustand zu halten, der eine konstante, andauernde Xylanaseproduktion ermöglicht. Abschließend sollen anhand einiger Modellrechnungen die Möglichkeiten und Konsequenzen des Regelungskonzepts diskutiert werden.

7.1. Oszillationen der Biomasse

In der kontinuierlichen Fermentation konnten sowohl freie, stabile Schwingungen, als auch induzierte Schwingungen der Biomasse erzeugt werden. Während die induzierten Schwingungen jeweils durch eine sogenannte Streßphase eingeleitet werden mußten, die Biomasse aber jedesmal nach einer Schwingung wieder in einen Steady-state einlief, brauchten die freien Schwingungen keinen Anstoß und dauerten mit gleichbleibender Amplitude und Frequenz an. Diese freien Schwingungen wurden zunächst nur beobachtet, wenn die Fermentation bei niedrigen pH-Werten unterhalb pH 5.5 stattfand. Später zeigte sich dann aber, daß freie Schwingungen unter bestimmten Bedingungen auch bei pH 6.0 auftreten können.

Die Ursachen für sowohl die freien als auch die induzierten Schwingungen konnten bisher nicht mit letzter Gewißheit geklärt werden. Auffällig war jedoch, daß das Absenken des pH-Werts nur dann als Anstoß für eine induzierte Schwingung wirksam war, wenn das Redoxpotential auf sehr niedrigen Werten um -350 mV lag. Bei diesen Redoxpotentialen wurden stets die höchsten Konzentrationen von organischen Säuren, vor allem Acetat, im Medium beobachtet. Denkbar ist, daß eine pH-Absenkung bei hohen Konzentrationen organischer Säuren zu einer Vergiftung der Organismen führt, da der Dissoziationsgrad der Carboxylgruppen bei Erniedrigung des pH-Werts um eine pH-Einheit etwa um eine 10er-Potenz sinkt. Die Giftigkeit verschiedener organischer Säuren für die Organismen nimmt im allgemeinen mit abnehmendem Dissoziationsgrad zu (Kneifel, 1986). Denkbar ist, daß die Bakterien aufgrund der plötzlichen Giftigkeit der Säuren ihr Wachstum einstellen und daher ausgewaschen werden.

Eine Möglichkeit, die freien Schwingungen bei niedrigen pH-Werten zu erklären, bietet die von Wood (1961) beschriebene Beobachtung, daß das Produktspektrum der Organismen selbst stark pH-abhängig ist. So sind bei pH-Werten über 6.3 Acetat und Formiat die Hauptprodukte, darunter

schaltet der Stoffwechsel jedoch auf die Bildung von 2,3-Butandiol und CO₂ um. Butandiolbildung ist bei *Bacillus* nach Wood (1961) stets mit der Bildung etwa äquimolarer Mengen Glycerin verbunden. Sowohl 2,3-Butandiol als auch Glycerin sind dabei Produkte der NAD⁺-Regenerierung. Da Glycerin in dem in dieser Arbeit verwendeten Medium die C-Quelle ist, und somit nicht gleichzeitig Gärungsprodukt sein kann, ist denkbar, daß *Bacillus* bei niedrigen pH-Werten unterhalb pH 5.5 nicht in der Lage ist, sein NAD⁺ vollständig zu regenerieren, sodaß der Energiestoffwechsel zusammenbricht, die Organismen nicht mehr wachsen können und die Kultur beginnt auszuwaschen.

Die Fermentation mit freien Schwingungen bei pH-Werten zwischen 5.5 und 5.1 wurde mit einer Verweilzeit von 11 Stunden durchgeführt. Bei dieser Verweilzeit ließen sich bei pH-Werten zwischen 6.0 und 6.5 keine Schwingungen der Biomasse beobachten. Bei pH 6.0 traten freie Schwingungen nur in einem engen Verweilzeitbereich zwischen $\tau = 3.6$ h und $\tau = 4.5$ h auf. Der pH-Wert von 6.0 liegt ebenfalls unterhalb der in der Literatur (Wood, 1961; Doelle, 1975) angegebenen pH-Grenze von pH 6.3, unterhalb derer der Stoffwechsel von *Bacillus* auf Butandiol- und Glycerinbildung umschaltet. Der für pH-Werte zwischen 5.0 und 5.5 diskutierte Grund für die freien Schwingungen könnte also auch bei pH 6.0 zutreffen. Möglich ist, daß die Voraussetzungen für das Auswaschen der Organismen (Akkumulation von organischen Säuren, Zusammenbrechen des Energiestoffwechsels) nur innerhalb eines bestimmten Verweilzeitbereichs wirksam werden. Dieser Verweilzeitbereich scheint dabei um so breiter zu sein, je niedriger der pH-Wert in der Fermentation liegt, da mit sinkendem pH-Wert einerseits die Giftigkeit der produzierten organischen Säuren zunimmt und zudem der Stoffwechsel zunehmend auf der Seite der Butandiol- und Glycerinbildung liegt, wodurch die Möglichkeiten der NAD⁺-Regenerierung abnehmen.

Vor allem die Möglichkeit der Induktion von Schwingungen durch die pH-Wert-Absenkungen wurde in dieser Arbeit genutzt, um innerhalb des kontinuierlichen Systems immer wieder die Übergangszustände zwischen dem exponentiellen Wachstum und dem Steady-state der Biomasse durchlaufen zu können in denen eine Xylanaseproduktion stattfindet. Neben einer quasikontinuierlichen Enzymproduktion, die zu Xylanaseausbeuten von 32 U/(gTS·h) im Fall der freien und zu 110 U/(gTS·h) im Fall der induzierten Schwingungen führte, konnten dabei Erkenntnisse über die Regulation der Xylanase-Synthese bei *Bacillus amyloliquefaciens* in Abhängigkeit von den die Organismen umgebenden Kulturbedingungen gewonnen werden.

7.2. Konstitutive Xylanase-Synthese

Bereits mit den anfänglichen Versuchen zur Medienzusammensetzung konnte gezeigt werden, daß die Synthese der extrazellulären Xylanase bei *Bacillus amyloliquefaciens* weitgehend konstitutiv ist. So wurden mit Glucose, Lactose und Glycerin als C-Quelle höhere Xylanaseaktivitäten erreicht, als mit dem Enzymsubstrat Xylan. Noch höhere Biomasse-spezifische Aktivitäten konnten mit Xylose als C-Quelle gemessen werden. Das Wachstum der Organismen war dabei jedoch sehr gering. Es muß daher bezweifelt werden, daß dieser Befund auf einen induktiven Effekt der Xylose auf die Xylanasesynthese zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher ist, daß, wie später diskutiert, das sehr langsame Wachstum der Organismen auf Xylose eine Katabolit-Repression der Xylanasesynthese verhindert, sodaß bezogen auf die Biomasse sehr hohe Aktivitäten resultieren.

Eine konstitutive Synthese extrazellulärer Enzyme bei *Bacillus amyloliquefaciens* wurde unter anderem von Coleman (1967) für die α -Amylase beschrieben.

In diesem Fall ermöglichte es die konstitutive Synthese der Xylanase, auf den Feststoff Xylan im Nährmedium zu verzichten. Stattdessen wurde Glycerin als C-Quelle verwendet.

7.3. Katabolit-Repression der Xylanase-Synthese

Sowohl in Batch- als auch in kontinuierlichen Fermentationen zeigte sich, daß die konstitutive Synthese der Xylanase und anderer extrazellulärer Enzyme wie Amylase und Protease jeweils erst einsetzt, nachdem das ungehinderte, exponentielle Wachstum der Organismen mit maximalen Wachstumsraten von 0.7 bis 1.0 h⁻¹ abgeschlossen ist. Der wahrscheinliche Grund für dieses Verhalten ist eine Katabolit-Repression der Xylanase-Synthese während des exponentiellen Wachstums, so wie für die Synthese der meisten, wenn nicht aller extrazellulären Enzyme von Prokaryonten eine Katabolit-Repression vermutet wird (Priest, 1983). Für *Bacillus amyloliquefaciens* wurde eine Katabolit-Repression beispielsweise für die Synthese der α -Amylase beschrieben (Ingle & Boyer, 1976).

Die Katabolit-Repression extrazellulärer Enzyme bei *Bacillus* wird wie die Katabolit-Repression intrazellulärer Enzyme bei *E. coli* bisher meist im Zusammenhang mit der Konzentration einer leicht metabolisierbaren C-Quelle (Priest & Thirunavukkarasu, 1985; Laishley & Bernlohr, 1968) oder auch N-Quelle (Egorov et al., 1984; Hanlon et al., 1982) im Medium gesehen. Voraussetzung für das Aufheben der Katabolit-Repression ist danach immer das fast vollständige Verschwinden dieser Stoffe aus dem Nährmedium der Organismen.

Konstitutive und induzierbare Exoenzyme, die einer Katabolit-Repression unterliegen und dadurch nicht direkt an das Wachstum der Organismen gekoppelt sind, sondern erst gebildet werden, wenn das Wachstum durch eine Limitierung gebremst wird, lassen sich nach allgemeiner Auffassung (Frankena et al., 1985; Baig et al., 1984; Priest, 1983; Heinecken & O'Connor, 1972) in kontinuierlicher Kultur entweder gar nicht, oder nur im Bereich langer Verweilzeiten gewinnen. Die Ursache dafür ist, daß die stationäre Konzentration des die Katabolit-Repression verursachenden Substrates mit kürzer werdender Verweilzeit größer wird (vergl. Figur 4), sodaß sich der reprimierende Effekt verstärkt. Die Folge ist, daß die Produktion rein konstitutiver Enzyme mit steigender Durchflußrate allgemein sinkt. Bei der Produktion von induzierbaren Enzymen existiert in Abhängigkeit von der Durchflußrate ein Optimum zwischen der induzierenden und der reprimierenden Wirkung des Substrates. Dieses Optimum ist beispielsweise für die α -Amylase-Produktion mit *Bacillus caldolyticus* für Durchflußraten von 0.1 bis 0.25 h⁻¹ (Emanuilova & Toda, 1984) und für die Protease-Produktion mit *Bacillus licheniformis* mit 0.22 h⁻¹ (Frankena et al., 1985) angegeben. Die Biomasse-spezifische Proteaseaktivität sinkt im zuletzt zitierten Beispiel allerdings linear mit steigender Wachstumsrate bis auf Null ab.

Solange das reprimierende Substrat ein Bestandteil des ständig zudosierten Mediums ist, führt das Bestreben, die Organismen einer Limitierung durch dieses Substrat auszusetzen konsequenterweise zum Einstellen langer Verweilzeiten.

7.4. Sauerstofflimitierung der Kultur

Der Auffassung, daß die Katabolit-Repression nur durch eine Limitierung der im Medium enthaltenen C- oder N-Quelle aufgehoben werden kann, widersprechen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen teilweise. So beginnt die Produktion der extrazellulären Enzyme Xylanase, Amylase und Protease in der Batch-Fermentation stets lange bevor die C-Quelle Glycerin oder die N-Quellen NH₄⁺ und NO₃⁻ aufgebraucht sind. In der kontinuierlichen Fermentation liegen die stationären Konzentrationen dieser Nährstoffe ebenfalls deutlich im Überschuß vor, sodaß die Exoenzymproduktion theoretisch dauerhaft reprimiert sein sollte. Stattdessen setzt die Exoenzymproduktion in dem Augenblick ein, in dem die Konzentration des in der Kulturflüssigkeit gelösten Sauerstoffs auf Null zurückgegangen ist.

Da nicht anzunehmen ist, daß die Regulation der Enzymsynthese in einem direkten Zusammenhang mit der Sauerstoffkonzentration steht, ist es wahrscheinlich, daß die Katabolit-Repression bei *Bacillus* allgemein von einer Limitierung des Wachstums bzw. von der resultierenden Wachstums-

rate abhängig ist. Das würde bedeuten, daß die Katabolit-Repression nicht von der Konzentration eines Nährstoffes, sondern vom Energiezustand der Zellen abhängt. Dieser wiederum ist von der Verfügbarkeit des Sauerstoffs abhängig, der als Elektronenakzeptor im energieliefernden Respirationsstoffwechsel der Organismen erforderlich ist.

Diese Interpretation der Katabolit-Repression ist in der Lage, sowohl die Verweilzeit-Abhängigkeit der Exoenzymproduktion in C- oder N-limitierten Kulturen, als auch die in dieser Arbeit beschriebene Tatsache des Aufhebens der Repression bei gleichzeitiger C- und N-Sättigung zu erklären. Sie erklärt auch die Beobachtung, daß beim langsamen Wachstum auf einer schlecht metabolisierbaren C-Quelle wie Xylose eine Katabolit-Repression gar nicht erst stattfindet, sodaß hohe Biomasse-spezifische Aktivitäten der Xylanase resultieren (vergl. Abschnitt 7.2).

Die Limitierung der Organismen durch den Sauerstoffmangel hat gegenüber einer Limitierung durch eine im zulaufenden Nährmedium enthaltene Substanz den Vorteil, daß der Sauerstoffeintrag in das Medium unabhängig von der Verweilzeit variiert werden kann. Zwar ist die stationäre Sauerstoffkonzentration C_{O_2} nach Gl. 20 ebenfalls von der Verweilzeit abhängig, kurzfristige Änderungen, wie sie für eine gezielte Regelung einer limitierenden Konzentration erforderlich sind (s.u.), lassen sich jedoch nur mit einem Substrat erreichen, dessen Zuführung, wie die des Sauerstoffs, innerhalb weniger Sekunden erhöht oder erniedrigt werden kann. Mit Hilfe der Redox-Regelung konnte dieses Verfahren, wie später diskutiert, auch tatsächlich realisiert werden.

Zunächst trat jedoch bei der sauerstofflimitierten Fermentation ein anderes Problem auf: Obwohl die Katabolit-Repression der Xylanasesynthese durch die Sauerstofflimitierung des Wachstums der Organismen aufgehoben wurde und obwohl die Sauerstofflimitierung während der kontinuierlichen Fermentation andauerte, ließ die Xylanaseproduktion im Verlauf der Fermentation nach und hörte schließlich völlig auf.

Anfängliche Vermutungen über einen Zusammenhang mit der Morphologie der Organismen (Ketten- und Flockenbildung oder Einzelzellen) oder gar ein genetischer Verlust der Fähigkeit Xylanase zu produzieren, bestätigten sich nicht. Ein genetischer Verlust konnte nicht stattgefunden haben, da die Xylanaseproduktion wieder einsetzte, wenn die Kultur infolge von Biomasse-Schwingungen erneut den Übergang vom exponentiellen Wachstum in die Sauerstofflimitierung durchlief. Der Zusammenhang mit der Zellmorphologie blieb länger unklar: So wurden die Ketten und Flocken zwar jeweils im Steady-state der Biomasse von den Einzelzellen abgelöst, nach jedem Auswaschen wuchsen die Organismen jedoch zunächst wieder in Kettenverbänden heran. Erst bei den Versuchen mit

geregeltem Redoxpotential zeigte sich, daß die Xylanaseproduktion nicht an das Vorhandensein von Ketten oder Flocken gebunden ist.

Der Grund für den Rückgang der Xylanaseproduktion trotz Sauerstofflimitierung wurde erst erkannt, als zusätzlich zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 das Redoxpotential in der Kulturflüssigkeit bestimmt wurde. Das Redoxpotential erlaubt, wie später diskutiert werden soll, eine genaue quantitative Messung des Sauerstoffpartialdrucks auch in den Bereichen, die unterhalb der Nachweisgrenze der polarographischen Sauerstoffelektrode liegen. Dabei zeigte sich, daß sich der Sauerstoffgehalt in der Kulturflüssigkeit auch dann noch stark ändert, wenn die Sauerstoffelektrode nur noch den Wert Null anzeigt.

So sank der Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit, wenn die Verweilzeit der Fermentation länger als 4.5 h war, jeweils zunächst auf ca. 10^{-3} bar ab, hielt sich dort über einige Stunden und sank dann, während die Kultur in einen Steady-state einlief, auf wesentlich niedrigere Werte ab. Bei kürzeren Verweilzeiten sank der Sauerstoffpartialdruck ebenfalls zunächst für einige Stunden auf ca. 10^{-3} bar ab, stieg im Steady-state aber wieder auf $\geq 10^{-2}$ bar an. Ein stationäres Verweilen des Sauerstoffpartialdrucks in dem Bereich um 10^{-3} bar konnte bei keiner Verweilzeit erreicht werden.

In allen Fällen zeigte sich, daß Xylanaseproduktion nur stattfindet, wenn der Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit in dem instationären Bereich um 10^{-3} bar ($10^{-2.5}$ bis $10^{-3.5}$ bar) liegt. Bei höheren Werten unterliegt die Synthese der Xylanase wie gezeigt einer Katabolit-Repression, bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen kommt es dagegen wahrscheinlich zu einer Umstellung des Energiestoffwechsels auf Gärung, wodurch ebenfalls die Synthese extrazellulärer Enzyme unterdrückt ist.

Die Xylanaseproduktion ist demnach nicht an einen allgemeinen Zustand der Sauerstofflimitierung gebunden, sondern findet nur statt, wenn der Sauerstoffpartialdruck zwar niedrig ist, sich aber in dem definierten instationären Bereich um 10^{-3} bar befindet. Sinkt er, wie es im Steady-state bei Verweilzeiten ≥ 4.5 h stets geschieht, auf darunter liegende Werte ab, oder steigt er, wie im Steady-state von Verweilzeiten ≤ 3.6 h, so endet die Xylanaseproduktion wieder.

Da der erwähnte Bereich optimaler Sauerstoffpartialdrücke unter stationären Bedingungen nicht selbständig erhalten bleibt, muß dieser, will man eine dauerhafte Enzymproduktion erreichen, durch eine wirksame Regelung aufrechterhalten werden.

Auch Frankena et al. (1986) haben am Beispiel der Protease-Produktion mit *Bacillus licheniformis* den positiven Effekt einer Sauerstofflimitierung

auf das Aufheben der Katabolit-Repression beobachtet und die Katabolit-Repression in einen Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel gestellt. Bei konstantem Sauerstoffeintrag in die Kultur und fehlender Möglichkeit zur Quantifizierung der Sauerstofflimitierung wurde von den Autoren jedoch auch in diesem Fall beschrieben, daß die Proteasesynthese im Steady-state bereits bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ weitgehend reprimiert war.

7.5. Messung des Redoxpotentials

Vergleichende Messungen des mit der Platinelektrode gemessenen Redoxpotentials und des mit der polarographischen Sauerstoffelektrode bestimmten Sauerstoffpartialdrucks in der Kulturflüssigkeit zeigten, daß das Redoxpotential in erster Linie vom Sauerstoffgehalt abhängig ist. So wurde das Redoxpotential stets mit sofortiger Wirkung positiver, wenn der Sauerstoffeintrag OTR in die Flüssigkeit erhöht wurde und wurde umgekehrt sofort negativer, wenn der Sauerstoffeintrag verringert wurde.

Der Grund für diese Abhängigkeit ist, wie in Abschnitt 2.4.3. dargestellt, daß die Austauschstromdichte der in der Fermentationsbrühe vorliegenden organischen Redoxsysteme an der Platinelektrode sehr gering ist (Bühler, 1985), während sich die Konzentrationen der Salze, deren Redoxsysteme eine höhere Austauschstromdichte mit der Platinelektrode haben, im Verlauf der Fermentation wenig ändern. Unter den Redoxsystemen mit hoher Austauschstromdichte liegt einzig der Sauerstoff in stark veränderlichen Konzentrationen vor.

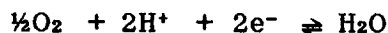
So ergab sich unter den bestehenden Bedingungen (pH-Wert, Temperatur) nach Gl. 32 folgender Zusammenhang:

$$\log_{10}(pO_2) = 0.0182 \cdot \text{Redox (mV)} - 1.95$$

Der logarithmische Zusammenhang zwischen den beiden Meßsignalen ergibt sich nach Radjai et al. (1984) aus der Nernst-Gleichung (Gl. 21):

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{A_{\text{ox}}}{A_{\text{red}}} \quad [\text{mV}]$$

Für die Redox-Reaktion:



ergibt sich folgender Zusammenhang (mit $E_0 = 1.23 \text{ V}$ und $n = 2$):

$$E_h = 1.23 + 0.059/2 \cdot (\log(pO_2^*) - 2\text{pH}) \quad (\text{V})$$

Löst man diese Gleichung nach $\log pO_2$ auf, so ergibt sich:

$$\log pO_2 = 4/0.059 \cdot E_h + (1.23-2pH)$$

wobei $4/0.059 = 67.7$ als Steigung und $(1.23-2pH)$ als Achsenabschnitt einer Geraden-Gleichung angesehen werden können:

$$\log pO_2 = a \cdot \text{Redox} + b$$

Bezogen auf einen pH-Wert von 6.0 und eine Messung gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode ($E_{\text{ref}} = 198 \text{ mV}$) lautet der Zusammenhang:

$$\log pO_2 = 0.068 \cdot \text{Redox (mV)} - 46.0$$

In dieser Arbeit wurden die Steigung a und der Achsenabschnitt b als $a = 0.0182$ und $b = 1.95$ bestimmt (Gl. 32). Auffällig ist dabei vor allem, daß die Steigung a etwa um den Faktor 4 kleiner gefunden wurde, als es der theoretische Zusammenhang nahelegt. Ähnliche Werte, wie die in dieser Arbeit ermittelten, fanden Radjai et al. (1984) bei der Homoserin-Fermentation mit *Corynebacterium glutamicum* mit 0.0157 für a und 0.071 für b . Sie weisen darauf hin, daß diese Konstanten nicht universal sind und von Fermentationstyp zu Fermentationstyp differieren können.

Aufgrund des logarithmischen Zusammenhangs zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und dem Redoxpotential ist eine sehr viel genauere Messung des Sauerstoffpartialdrucks bei niedrigen Werten möglich. So endet der Meßbereich der polarographischen Sauerstoffelektrode etwa bei 10^{-3} bar (vergl. Figur 43). Geht man davon aus, daß der in Gl. 32 dargestellte Zusammenhang auch bei Redoxpotentialen um -350 mV gilt, so entspricht das einem Sauerstoffpartialdruck von weniger als 10^{-6} bar. Da Gl. 32 aber nur anhand von Sauerstoffwerten aus dem Bereich von 0.25 bis 10^{-3} bar bestimmt werden konnte, ist eine gewisse Vorsicht bei der linearen Extrapolation bis zu den ganz niedrigen Redox-Werten geboten.

Der Frage der Interpretation des Verlaufs des Redoxpotentials für den Stoffwechsel der Organismen ist Jacob (1970) nachgegangen. Der Autor unterscheidet dabei deutlich den Verlauf des Redoxpotentials während Batch-Fermentationen bei aeroben, fakultativ anaeroben und anaeroben Organismen. Den in dieser Arbeit beobachteten, charakteristisch stufenförmigen Verlauf des Redoxpotentials beschreibt Jacob (1970) für die fakultativ anaeroben Organismen wie beispielsweise *Proteus vulgaris*. Auch dort sinkt das Redoxpotential zunächst mit dem pO_2 . Nachdem der pO_2 auf Null gesunken ist, verlangsamt sich die Rate des Negativwerdens für eine Weile und sinkt dann wie in dieser Arbeit beschrieben sehr schnell auf stark negative Werte ab. Für strikt aerobe Organismen

beschreibt der Autor dagegen, daß das Redoxpotential nach Erreichen des Plateaus schwach negativer Werte nicht weiter abnimmt.

Als Grund für den stufenförmigen Verlauf des Redoxpotentials bei fakultativen Anaerobiern vermutet Jacob (1970) das Umstellen des Stoffwechsels auf die Bedingungen der Sauerstofflimitierung. Diese Interpretation deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, die zeigten, daß mit Absinken des Redoxpotentials auf Werte um -350 mV eine verstärkte Produktion von Gärungsprodukten und organischen Säuren einsetzt. So blieben die Konzentrationen von Essigsäure, Acetoin, 2,3-Butandiol, Formiat und Succinat sowohl im Bereich positiver Redox-Werte, als auch während dem Plateau des Redoxpotentials nahezu konstant. Ab dem Zeitpunkt, wo das Redoxpotential auf seine negativsten Werte absank, nahmen die Konzentrationen dieser Komponenten teilweise erheblich zu (vergl. Figur 44 und Tabelle 10).

Daraus kann man schließen, daß *Bacillus* während des Plateaus des Redoxpotentials zwar bereits sauerstofflimitiert ist, sodaß Xylanaseproduktion resultiert, seinen oxidativen Stoffwechsel jedoch noch weiter aufrechterhält. Zeitgleich mit dem raschen Absinken des Redoxpotentials stellen die Organismen dann ihren Stoffwechsel auf einen fermentativen Stoffwechsel um, sodaß die Ausscheidung der erwähnten Stoffwechselprodukte einsetzt während die Xylanaseproduktion endet.

Die kausale Reihenfolge dieser Stoffwechselumstellung konnte dabei nicht geklärt werden. So ist nicht bekannt, ob das Absinken des Redoxpotentials die Umstellung des Stoffwechsels verursacht, oder ob die Stoffwechselumstellung zur Absenkung des Redoxpotentials führt. Im ersten Fall bleibt unklar, weshalb es bei nahezu konstanter Biomassekonzentration zu dieser dramatischen Absenkung des Redoxpotentials und damit des Sauerstoffgehalts kommt. Im zweiten Fall stellt sich die Frage, weshalb das Umschalten auf einen vermutlich fermentativen Stoffwechsel zu einer Absenkung des Sauerstoffgehalts führt.

Tatsache ist jedoch, daß bei den Versuchen, bei denen das Redoxpotential mittels einer Regelung auf dem Plateau mäßig negativer Werte festgehalten wurde, die Konzentration der Essigsäure unter 2 mmol/l blieb und die anderen in Tabelle 10 genannten Substanzen gar nicht nachweisbar waren. Ein Umschalten des Stoffwechsels konnte also durch das Festhalten des Sauerstoffpartialdrucks in dem Bereich um 10^{-3} bar verhindert werden.

7.6. Regelung des Redoxpotentials

Wie bereits teilweise in den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils diskutiert, soll die Regelung des Redoxpotentials einerseits eine quantitative Beeinflussung des Sauerstoffpartialdrucks in der Kulturflüssigkeit in jenem engen Bereich um 10^{-3} bar ermöglichen, der einer maximalen Xylanaseproduktion entspricht.

Weiterhin muß die Regelung in der Lage sein, diesen stationär nicht möglichen Bereich auf Dauer zu halten und zudem zu verhindern, daß das Redoxpotential stationäre Werte im positiven oder stark negativen Bereich einnimmt, da es dort aufgrund langer Totzeiten nur noch schwer beeinflussbar ist.

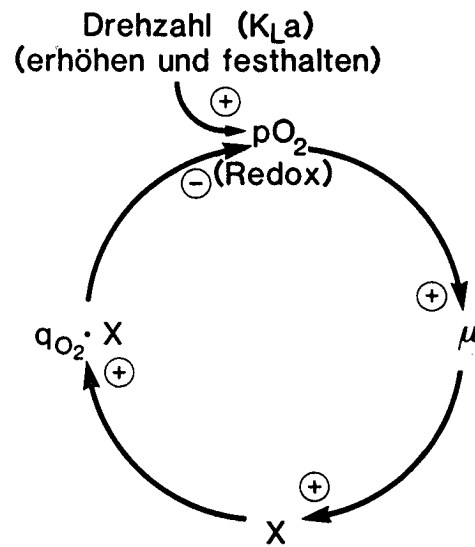
Aufgrund des trägen und erst im Stationären wirksamen Einflusses der Verweilzeit auf den Sauerstoffgehalt (Gl. 20) hat sich die Regelung des Redoxpotentials durch Variationen der Verweilzeit als ungeeignet erwiesen. Der Einfluß einer Änderung des Sauerstoffeintrags OTR auf den Sauerstoffgehalt (Gl. 13) hat dagegen keinen Einfluß auf die stationäre Sauerstoffkonzentration, ist aber sofort wirksam.

Zur Regelung des Redoxpotentials gibt es in der Literatur bereits einige Ansätze. So schlagen Thompson & Gerson (1985) eine elektrochemische Regelung des Redoxpotentials in Batch-Fermentationen mit *E. coli* vor, während Kjaergaard & Joergensen (1979) für die Säureproduktion mit *Bacillus licheniformis* eine Beeinflussung des Redoxpotentials durch geregelte Glucosezugabe in der glucoselimitierten Kultur vorschlagen. Radjai et al. (1984) und Jacob (1970) berichten dagegen ebenfalls über eine Regelung des Redoxpotentials über eine Variation des Sauerstoffeintrags OTR in die Kulturflüssigkeit. Hierbei wird der OTR entsprechend Gl 15:

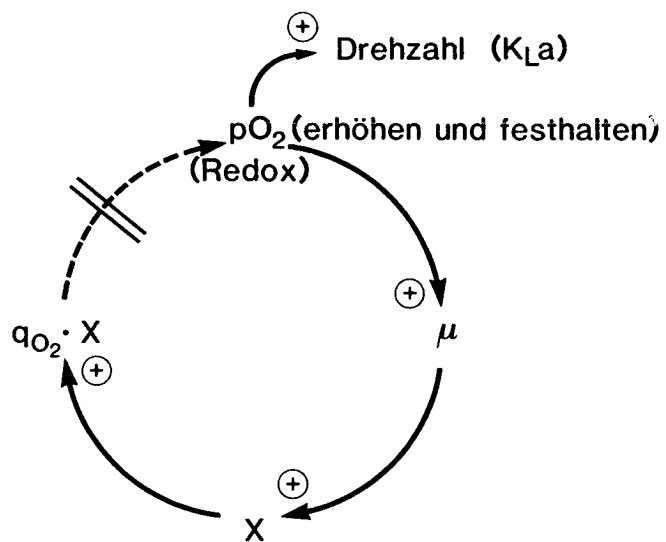
$$\text{OTR} = k_L \cdot a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [\text{mmol}/(\text{l} \cdot \text{h})]$$

entweder über die Rührerdrehzahl ($\rightarrow k_L \cdot a$), die Belüftungsrate ($\rightarrow k_L \cdot a$) oder die Gaszusammensetzung der Zuluft ($\rightarrow C^*$) verändert.

Jacob (1970) und Kjaergaard & Joergensen (1980) weisen dabei bereits auf das Problem hin, daß eine solche Regelung zu Instabilitäten in der Biomassekonzentration führt, das heißt: ist der Redox-Sollwert positiver als das sich ohne Regelung einstellende Redoxpotential, so kommt es zu einem unkontrollierten Anstieg der Biomassekonzentration, ist der Redox-Sollwert niedriger, kommt es zu einem starken Rückgang der Biomassekonzentration.



Figur 53: Kinetischer Regelkreis für Drehzahlregelung



Figur 54: Kinetischer Regelkreis für Redoxregelung

Folgende Überlegung soll dieses Problem erläutern: Wird die Drehzahl und damit $k_L \cdot a$ in einer sauerstofflimitierten Kultur mit Hilfe eines Drehzahlreglers erhöht und dann festgehalten (Figur 53), so führt das zwar im ersten Augenblick zu einer Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks p_{O_2} , das führt aber in der weiteren Folge zu einer Erhöhung der Wachstumsrate μ und damit der Biomassekonzentration X . Da sich dadurch auch der Gesamt-Sauerstoffverbrauch $Q_{O_2} = q_{O_2} \cdot X$ vergrößert, kommt es wieder zu einer Abnahme des p_{O_2} , sodaß sich effektiv nur die Biomassekonzentration, nicht aber der Sauerstoffpartialdruck erhöht hat. Dieser Regelkreis ist in sich stabil, alle Konzentrationen laufen wieder in stationäre Zustände ein.

Wird dagegen durch eine Redox-Regelung über die Rührerdrehzahl das Redoxpotential und damit der Sauerstoffpartialdruck p_{O_2} in einer sauerstofflimitierten Kultur erhöht und dann festgehalten (Figur 54), so führt das auch zunächst, wie im vorangegangenen Beispiel, zu einer Erhöhung von μ , X und $q_{O_2} \cdot X$, die Rückkopplung über eine Erniedrigung des p_{O_2} ist jedoch durch die Redox-Regelung verwehrt. Da $\mu = f(p_{O_2})$ dadurch stets größer als D ist, führt dies zu einer fortwährenden Vergrößerung der Biomasse X bei gleichzeitig ständig größer werdender Rührerdrehzahl. Dieser Regelkreis ist folglich instabil und hat seine Grenzen vermutlich erst in der maximalen Drehzahl des Fermenter-Rührers. Im umgekehrten Fall, wenn der gewählte Redox-Sollwert negativer als das natürliche Redoxpotential ist, kommt es, da $\mu = f(p_{O_2})$ jetzt stets kleiner als D ist, zu einer Abnahme der Biomassekonzentration, begleitet von einer immer niedriger werdenden Rührerdrehzahl. In beiden Fällen wird das Redoxpotential in dem Augenblick nicht mehr regelbar, in dem die Rührerdrehzahl nicht mehr steigen (max. Drehzahl) oder sinken (Drehzahl Null) kann.

In dem in Abschnitt 6.6.2. beschriebenen Versuch zur Regelung des Redoxpotentials ist diese Instabilität der Biomassekonzentration deutlich zu erkennen. Eine Lösung dieses Problems wurde in der gleichzeitigen Regelung der Biomassekonzentration durch Variation der Verweilzeit bzw. der Durchflußrate gesucht. Dieses Verfahren setzt voraus, daß ein exaktes kontinuierliches Meßsignal für die Biomassekonzentration zur Verfügung steht. Dafür bietet sich im Prinzip das Signal der kontinuierlich gemessenen optischen Dichte der Kulturbrühe an. Dieses Signal war jedoch stets einigen Störungen unterworfen, die einerseits von einem teilweise erheblichen "Rauschen" des Meßwertes, andererseits von einem Drift des Meßwertes aufgrund von Bewachsen der Photometerküvette herührten. Ein alternatives Meßgerät, die Trübungsmeßsonde der Firma Eur-Control stand während der Versuche noch nicht zur Verfügung, zeigte in anderen Fermentationen aber so gute Eigenschaften, daß sie für die genannte Verwendung geeignet erscheint.

In den beschriebenen Fermentationen mit Redox-Regelung wurde daher versucht, die Biomassekonzentration nicht mit einer automatischen Regelung, sondern über Eingriffe in die Verweilzeit mittels Handverstellung in einem vertretbaren Rahmen zu halten. Dadurch kam es, wie in Abschnitt 8.6.2 beschrieben, zu deutlichen Schwankungen in der Biomassekonzentration. Durch Handverstellungen der Durchflußrate über die Pumprate der Dosierpumpe konnte jedoch ein Instabilwerden der Regelung infolge eines Ausuferns der Biomassekonzentration verhindert werden.

7.7. Rechnersimulation des Regelungskonzepts

Da die doppelte Regelung des Redoxpotentials über die Rührerdrehzahl ($\rightarrow k_L \cdot a$) und der Biomasse über die Durchflußrate D mit ihren gegenseitigen Abhängigkeiten nur schwer zu überblicken ist, wurde das Regelverhalten anhand einer Rechner-Simulation mittels numerischer Integration nach Runge-Kutta analysiert. Dazu wurden die in Abschnitt 2.1. erläuterten Gleichungen:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_o + C_{O_2}} \quad [h^{-1}] \quad (\text{Gl. 12})$$

$$\text{OTR} = k_L \cdot a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [\text{mmol}/(\text{l} \cdot \text{h})] \quad (\text{Gl. 15})$$

$$q_{O_2} = q_{O_2\max} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_q + C_{O_2}} \quad [\text{mmol}/(\text{gTS} \cdot \text{h})] \quad (\text{Gl. 18})$$

$$\log(p_{O_2}) = 0.0182 \cdot \text{Redox} - 1.95 \quad (\text{Gl. 32})$$

sowie die Differentialgleichungen:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \text{OTR} - q_{O_2} \cdot X \quad [\text{mmol}/(\text{l} \cdot \text{h})] \quad (\text{Gl. 13})$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) \cdot X \quad [\text{g/l}] \quad (\text{Gl. 5})$$

verwendet.

Zur Beschreibung der zeitlichen Änderung der Stellgrößen $k_L \cdot a$ und D wurden außerdem die Differentialgleichungen:

$$\frac{d(k_L \cdot a)}{dt} = r \cdot \frac{C_{O_2, \text{soll}} - C_{O_2}}{C_{O_2, \text{soll}}} \cdot k_L \cdot a \quad [-] \quad (\text{Gl. 33})$$

$$\frac{dD}{dt} = s \cdot \frac{X - X_{\text{soll}}}{X_{\text{soll}}} \cdot D \quad [-] \quad (\text{Gl. 34})$$

mit X_{soll} = Sollwert der Biomassekonzentration
 $C_{O_2, \text{soll}}$ = Sollwert der Sauerstoffkonzentration

zugefügt. Die Faktoren r und s sind die Proportionalfaktoren des Reglers. Große Werte für r und s bedeuten ein starkes Ansprechen des Reglers, kleine Werte entsprechend eine nur schwache Reaktion des Reglers auf Abweichungen von den jeweiligen Sollwerten.

Für die fermentationskinetischen Konstanten wurden entweder aus den Ergebnissen abgeleitete Werte verwendet, oder Angaben aus der Literatur entnommen:

$$\mu_{\text{max}} = 0.77 \text{ h}^{-1} \quad (\text{vergl. Abschnitt 6.2})$$

$$q_{O_2, \text{max}} = 189 \text{ mg/(g}\cdot\text{h)} \quad (\text{Reuß (1979 b) für } Bacillus \text{ subtilis})$$

$$C_{O_2}^* = 7 \text{ mg/l} \quad (\text{vergl. Abschnitt 2.4.2})$$

$$K_0 = 0.036 \text{ mg/l} \quad (\text{vergl. Abschnitt 6.2})$$

$$K_q = 0.23 \text{ mg/l} \quad (\text{siehe unten})$$

Für die Simulation der Fermentationsabschnitte ohne Redoxregelung wurde analog der Berechnung in Abschnitt 6.5.1. ein Wert für $k_L \cdot a$ von 10 h^{-1} verwendet. Anstelle des Zusammenhangs nach Gl. 16 wurde für $k_L \cdot a$ vereinfachend eine lineare Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl n angenommen.

Um einen Wert für die Konstante K_q abzuschätzen, wurden die Gleichungen 18 und 19 vereinfachend zusammengefaßt zu:

$$K_q = q_{\text{max}} \cdot \frac{X_{\text{stat}} \cdot C_{O_2, \text{stat}}}{C_{O_2}^* \cdot k_L \cdot a} \quad (\text{Gl. 35})$$

Aus dem praktisch stationären Abschnitt um $t = 65 \text{ h}^{-1}$ in Figur 48 wurden der Wert $X_{\text{stat}} = 2.8 \text{ g/l}$ und aus dem Wert des Redoxpotentials von -60 mV ein $C_{O_2, \text{stat}} = 0.03 \text{ mg/l}$ ermittelt. Setzt man diese Werte sowie die oben genannten Werte für $C_{O_2}^*$, $q_{O_2, \text{max}}$ und $k_L \cdot a$ in die Gleichung

ein, so ergibt sich für K_q ein Wert von 0.23 mg/l, also ein um etwa eine Größenordnung größerer Wert als der für $K_o = 0.036$ mg/l.

Da angenommen werden kann, daß die Limitierung sowohl des Wachstums als auch der Sauerstoffaufnahme durch den Sauerstoff in gleicher Weise an den respiratorischen Enzymen wirksam wird, lassen sich für K_o und K_q theoretisch Werte gleicher Größenordnung erwarten. Ein von Reuß (1979 b) zitierter Wert für *Bacillus subtilis* nennt mit $K_q = 0.060$ mg/l einen Wert, der in der Größenordnung besser mit dem hier ermittelten Wert für K_o übereinstimmt. Für die hier durchgeführte Simulation spielt der Wert für K_q jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Der aus Figur 48 ermittelte Wert von $K_q = 0.23$ mg/l wurde daher beibehalten.

Mit dem Integrationsverfahren nach Runge-Kutta wird zunächst das freie Einlaufen des Systems in einen stationären Zustand bei konstanten Werten für D und $k_{l,a}$ simuliert. Ist der stationäre Zustand in der Simulation nahezu erreicht, wird unter zusätzlicher Verwendung der Differentialgleichungen 33 und 34 die Regelung des Redoxpotentials und der Biomassekonzentration auf festgesetzte Sollwerte simuliert.

Die simulierten Beispiele gehen dabei von der Annahme aus, daß die Organismen (z.B. nach dem Auswaschen durch pH-Absenkung) von der niedrigen Biomassekonzentration von 0.01 g/l und der entsprechend hohen Sauerstoffkonzentration von 6.99 mg/l zunächst ohne Redox-Regelung gegen eine Durchflußrate von $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$ ($\approx \tau = 2.5 \text{ h}$) heranwachsen. Ohne eine Regelung läuft die Kultur in einen Steady-state ein.

Die stationären Konzentrationen der verschiedenen Komponenten lassen sich nach den Gleichungen 6, 18, 19 und 20 berechnen und ergeben für:

$$X_{\text{stat}} = 2.546 \text{ g/l}$$

$$C_{O_2, \text{stat}} = 0.0389 \text{ mg/l} (\approx \text{Redoxpotential von } -54 \text{ mV})$$

$$\mu_{\text{stat}} = 0.4 \text{ h}^{-1}$$

$$q_{O_2} = 27.34 \text{ mg/(gTS}\cdot\text{h)}$$

Nach 30 Stunden, wenn die Kultur nahezu ihren Steady-state erreicht hat, wird die Regelung aktiviert. Als Sollwert wird dabei eine Sauerstoffkonzentration von 0.1 mg/l (\approx Redoxpotential von -31.5 mV) festgesetzt.

Wird dabei einzig eine Regelung des Redoxpotentials durchgeführt, kommt es zu der beschriebenen Instabilität durch ungehemmtes Ansteigen der Biomassekonzentration (Figur 55). Dabei wurde in diesem Beispiel der Wert von $k_{l,a}$ nach oben auf 1000 h^{-1} begrenzt, um eine maximale

Rührerdrehzahl zu simulieren. Dabei zeigt sich, daß der Redox-Sollwert nur so lange aufrechterhalten werden kann, wie die Rührerdrehzahl mitsteigen kann. Wird eine maximale Drehzahl ($\approx k_L \cdot a = 1000 \text{ h}^{-1}$) erreicht, geht das Redoxpotential wieder auf seinen stationären Wert von -54 mV zurück.

Durch gleichzeitiges Regeln der Biomassekonzentration, z.B. auf 5 g/l , läßt sich dagegen eine stabile Regelung von Redoxpotential und Biomasse erreichen. Dabei kann es jedoch je nach den verwendeten Proportionalfaktoren zu erheblichen Schwingungen sowohl von $k_L \cdot a$ und D als auch von X und Co_2 kommen. Dabei zeigt sich, daß die Schwingungen vor allem bei großen Proportionalfaktoren ($s = 100$, $r = 25$) sehr heftig und stabil sind (Figur 56).

Wählt man entsprechend kleinere Faktoren, klingen die Schwingungen schneller ab (Figur 57 und 58). Das geht jedoch auf Kosten des Redoxpotentials, das nun seinerseits stärkere Schwingungen zeigt, während es bei großen Proportionalfaktoren sehr konstant ist. Werden die Proportionalfaktoren z.B. extrem klein gewählt ($s = 0.1$, $r = 0.1$), so zeigen die beiden Stellgrößen $k_L \cdot a$ und D zwar nur noch sehr gedämpfte Schwingungen, die Regelung wird dabei aber sehr träge und das Redoxpotential wird zunächst negativer, anstatt wie gewünscht positiver.

Aus den Erfahrungen der praktischen Versuche mit dem sich teilweise sehr plötzlich ändernden Redoxpotential erscheint sowohl eine solche träge Regelung als auch das heftige Schwingen von $k_L \cdot a$ und D als untauglich. Eine Verbesserung der Situation läßt sich erreichen, wenn die Startbedingungen von Anfang an bereits so gewählt werden, daß die Steady-state-Werte näher an den späteren Sollwerten liegen. Dies läßt sich in diesem Beispiel für das Redoxpotential mit einer Erhöhung der festen Durchflußrate D erreichen (Gl. 20) und für die Biomassekonzentration mit einer Vergrößerung von $k_L \cdot a$ (Gl. 19). In Figur 59 ist dies am Beispiel eines auf 21 h^{-1} erhöhten Start- $k_L \cdot a$ bei unverändertem $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$ dargestellt. Dabei zeigt sich bei großen Proportionalfaktoren ($r = 100$, $s = 25$), daß Schwingungen zwar immer noch sehr langsam ausklingen, in ihrer Amplitude jedoch stark verringert sind.

Die schlechte Dämpfung der Schwingungen hat ihre Ursache in der Phasenverschiebung zwischen Co_2 und X . Diese rühren daher, daß die Biomasse zwar über die Durchflußrate D und das Redoxpotential (bzw. Co_2) über die Rührerdrehzahl (bzw. $k_L \cdot a$) geregelt werden (Gl. 33 und 34), daß die resultierenden Konzentrationen von X und Co_2 aber nach Gl. 19 und 20 genau entgegengesetzt von $k_L \cdot a$ und D abhängen. Wenn in Gl. 43 die Biomassekonzentration X genau mit dem Sollwert X_{soll} übereinstimmt, ist $dD/dt = 0$, das heißt: die Durchflußrate hat gerade ihren Maximal-

oder Minimalwert in einer Schwingung und die Sauerstoffkonzentration C_{O_2} nimmt gerade mit maximaler Rate zu oder ab.

Mit einem einfachen Verfahren lassen sich die Schwingungen jedoch so stark verringern, daß sie in der Praxis nicht mehr ins Gewicht fallen dürften. Dabei wird die Simulation zunächst so gestartet, wie in Figur 59 dargestellt und nach 30 Stunden ebenfalls zunächst die doppelte Regelung aktiviert. Aus den nun resultierenden Schwingungen der Durchflußrate und der Rührerdrehzahl können innerhalb weniger Stunden die Mittelwerte der Schwingungsamplituden ermittelt werden. Wird die Regelung in einem Augenblick, wo die gegenläufigen Konzentrationen von X und C_{O_2} gerade dicht an den Sollwerten liegen, ausgeschaltet und die errechneten Mittelwerte der Rührerdrehzahl und der Durchflußrate fest eingestellt, so enden die Schwingungen sofort und das System beruhigt sich bei Konzentrationen, die den gewünschten Werten sehr nahe sind (Figur 60). Wird die Regelung dann nach kurzer Zeit ($\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde) wieder eingeschaltet, sind die resultierenden Schwingungen bedeutend geringer als zuvor. Wird diese Prozedur im Bedarfsfall noch einmal wiederholt, so werden die resultierenden Schwingungen praktisch nicht mehr wahrnehmbar. Durch dieses einfache Verfahren sollte sich das System also in kürzester Zeit stabilisieren lassen. Die Proportionalfaktoren sind in diesem Modellbeispiel mit $r = 100$ und $s = 25$ so groß, daß die Regelung sehr spontan auf jede Störung reagieren könnte.

Eine andere Möglichkeit die Schwingungen innerhalb kurzer Zeit zu eliminieren ist in Figur 61 gezeigt. Bei diesem Verfahren wird im Gegensatz zu dem vorigen Verfahren die Abklingzeit der Schwingungen durch das Einführen eines Verzögerungsterms ($D - D_s$) in die Regelung der Biomassekonzentration durch die Durchflußrate stark verkürzt. Dieses in der Regelungstechnik gängige Verfahren (Pressler, 1967) beruht darauf, daß die erwähnte Phasenverschiebung der Durchflußrate gegenüber der Regelung des Redoxpotentials aufgehoben wird, sodaß eine sofortige Dämpfung der Regelschwingungen eintritt.

Die Differentialgleichung 34 erhält dazu folgende Form:

$$\frac{dD}{dt} = s \cdot \frac{X - X_{soll}}{X_{soll}} \cdot D - \delta \cdot (D - D_s) \quad [-] \quad (Gl. 36)$$

mit δ = Faktor

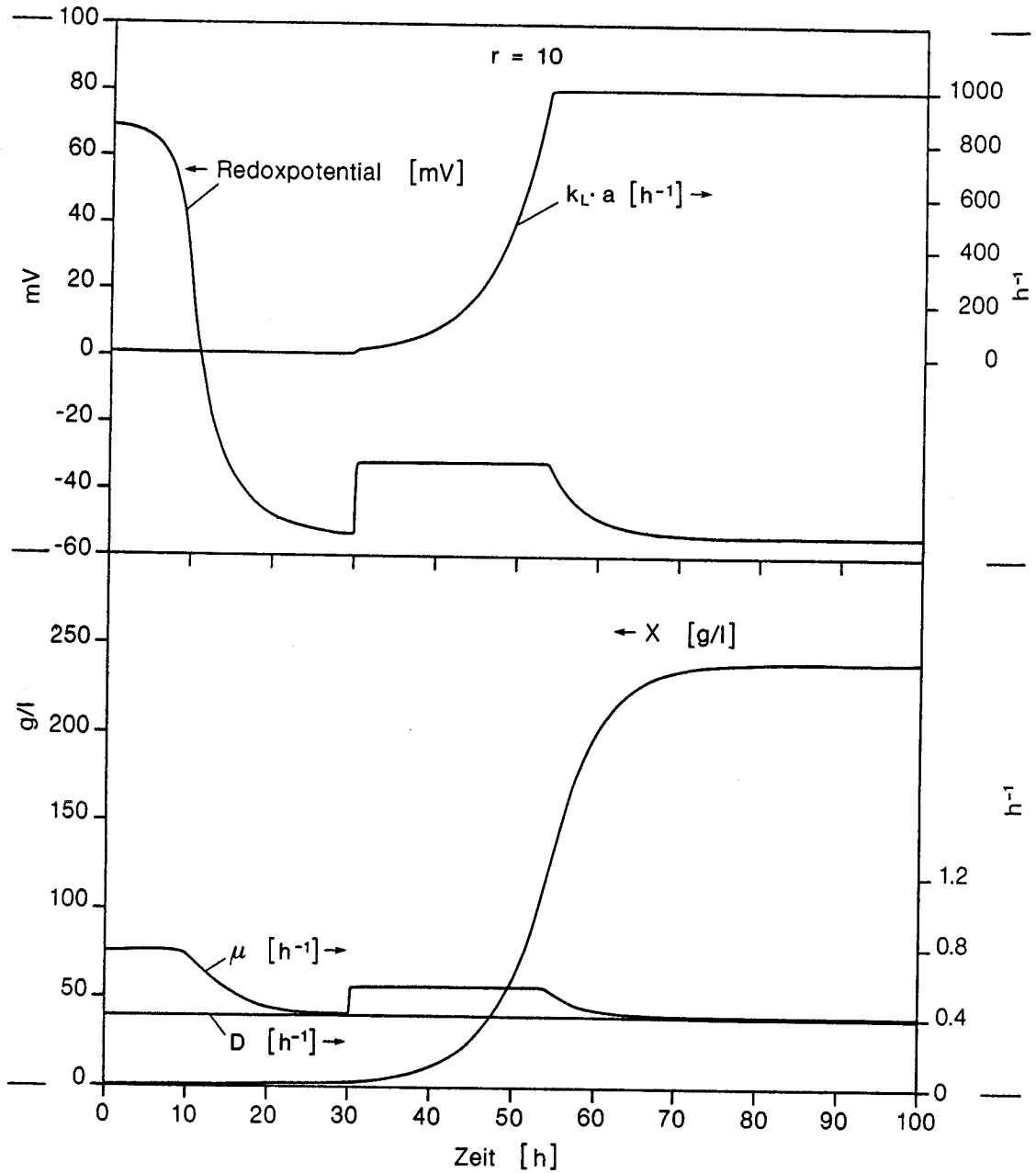
D_s = Schätzwert der resultierenden Durchflußrate

Der Schätzwert D_s kann entweder aus Gl. 20 unter Einsetzen der kinetischen Konstanten oder aus dem Mittelwert der Schwankungen von D im Experiment leicht bestimmt werden. Für den Faktor δ wurde in der Rechnung der Wert 1 eingesetzt.

Obwohl die Modellrechnung in diesem Beispiel nur mit einem $k_L \cdot a$ von 10 h^{-1} gestartet wird und die stationäre Biomassekonzentration dadurch nur etwa halb so groß wie der Sollwert von 5 g/l ist, schwingen die Konzentrationen von X und CO_2 sehr schnell auf die Sollwerte ein und bleiben danach konstant.

In welchem Maße in der Fermentation tatsächlich Schwingungen auftreten, welche der beiden Methoden zur Dämpfung der Schwingungen erfolgreicher ist und welche Proportionalfaktoren für die Regelung die geeignetsten sind, muß in praktischen Versuchen untersucht werden. Die Modellrechnungen konnten aber bereits zeigen, mit welchen Problemen aufgrund der doppelten Regelung von Redoxpotential und Biomasse zu rechnen ist und mit welchen Maßnahmen diesen Problemen begegnet werden kann. So scheint es in jedem Fall sinnvoll zu sein, möglichst große Proportionalfaktoren in der Regelung zu verwenden, möglicherweise auftretende Schwingungen lassen sich dann durch eine der beschriebenen Methoden eliminieren.

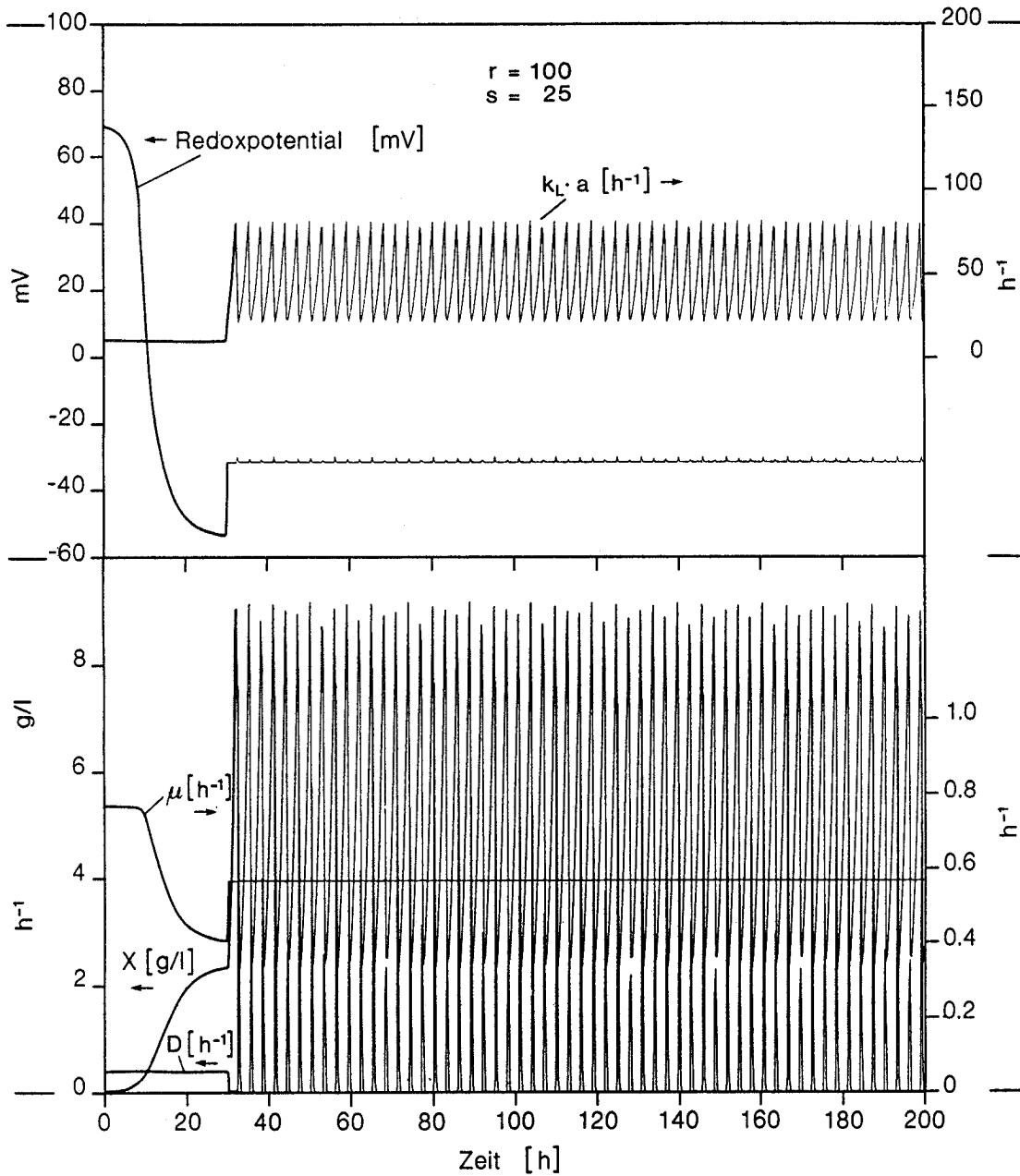
Weiterhin konnte durch die Rechnersimulation gezeigt werden, daß eine simultane Regelung des Redoxpotentials durch Variation des Sauerstoffeintrags und der Biomassekonzentration durch Variation der Verweilzeit prinzipiell möglich ist. Durch dieses Verfahren lassen sich dabei innerhalb der Grenzen, in denen die Kultur einer Sauerstofflimitierung unterliegt, unabhängig voneinander beliebige Sollwerte des Redoxpotentials und der Biomassekonzentration einstellen. Durch Wählen passender Substratkonzentrationen im Nährmedium läßt sich erreichen, daß der von den Organismen nicht genutzte Substratanteil sehr gering ist.



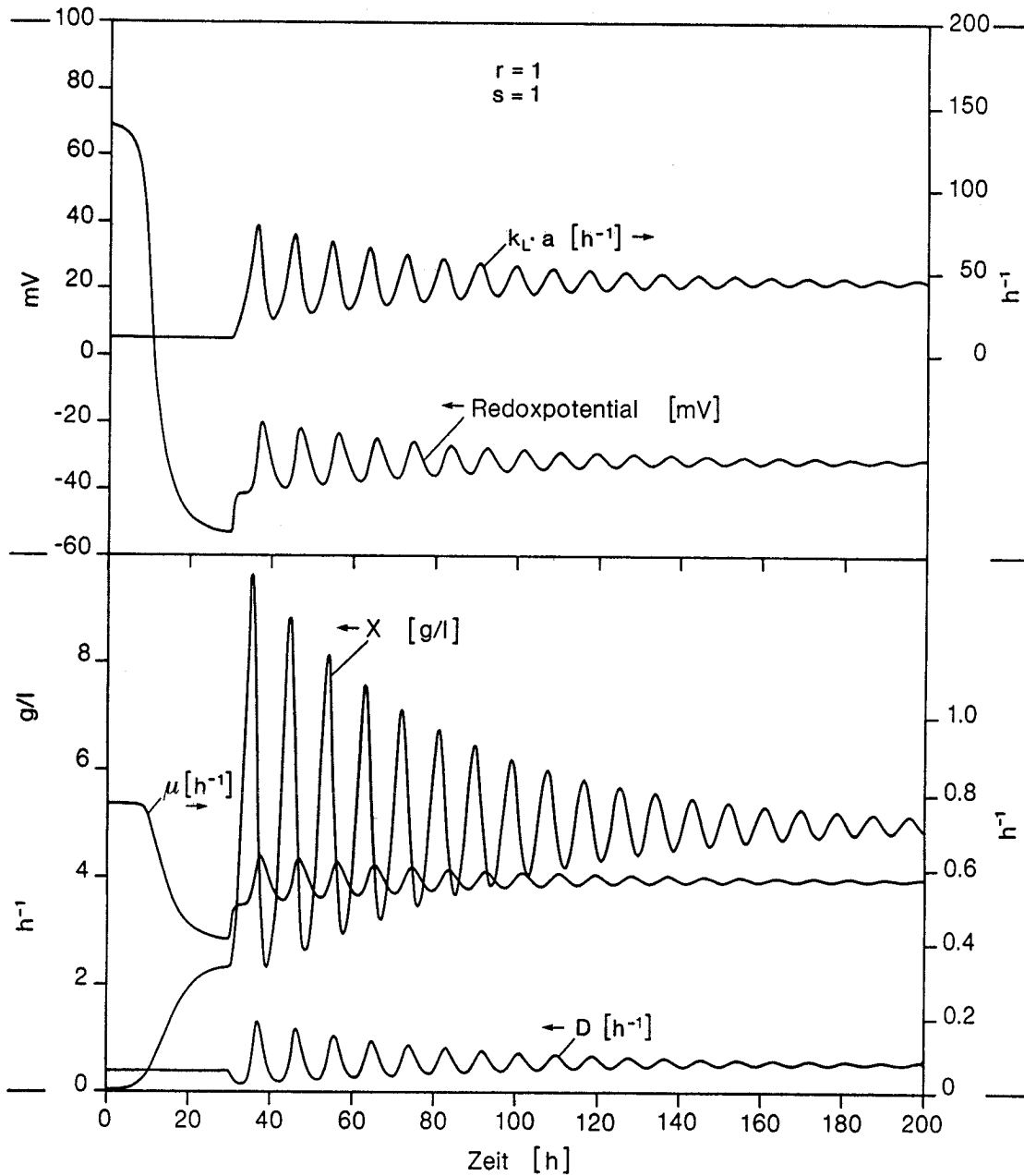
Figur 55: Simulation instabiler Redoxregelung, wenn keine simultane Biomasseregung stattfindet

Ungeregelt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 10 \text{ h}^{-1}$

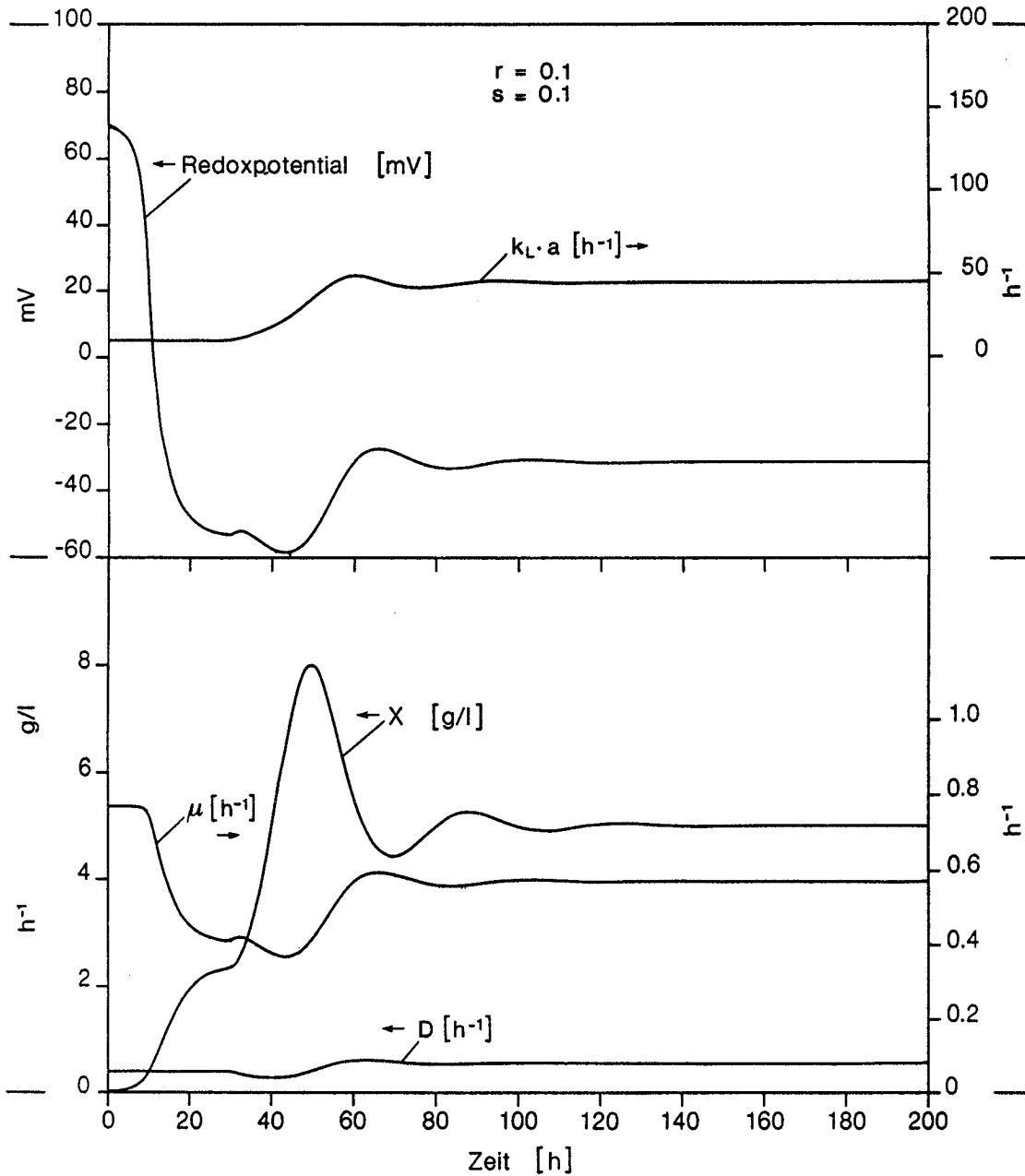
Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{soll}} = -31.5 \text{ mV}$, $r = 10$, $k_L \cdot a_{\text{max}} = 1000 \text{ h}^{-1}$



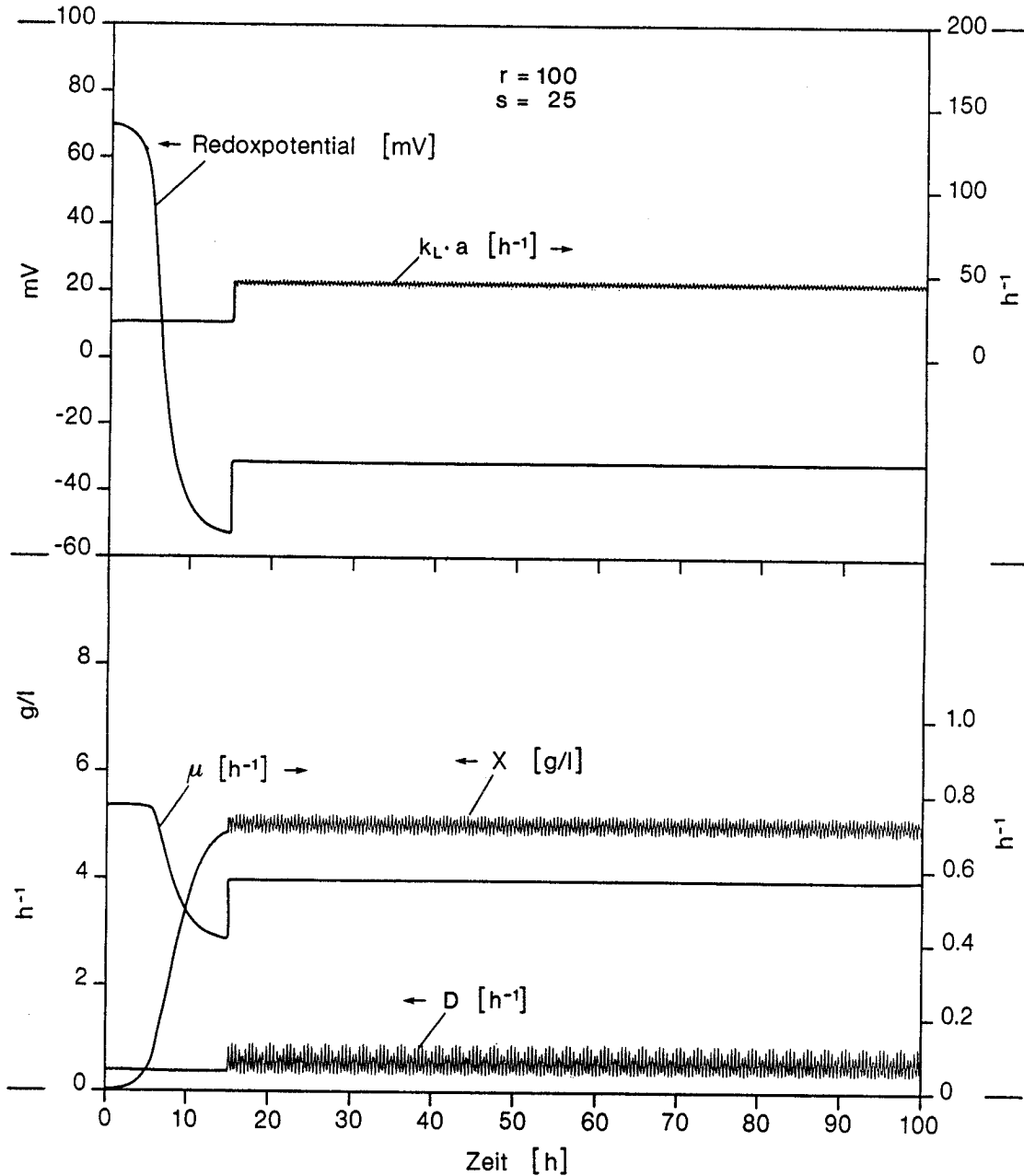
Figur 56: Simulation starker Regelschwingungen bei doppelter Regelung mit großen Proportionalfaktoren r und s
 Ungeregelt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 10$ h⁻¹
 Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{Soll}} = -31.5$ mV, $r = 100$
 Biomasseregung mit $X_{\text{Soll}} = 5$ g/l, $s = 25$



Figur 57: Simulation gedämpfter Regelschwingungen bei doppelter Regelung mit gemäßigten Proportionalfaktoren r und s
 Ungeregelt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 10 \text{ h}^{-1}$
 Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{Soll}} = -31.5 \text{ mV}$, $r = 1$
 Biomasseregung mit $X_{\text{Soll}} = 5 \text{ g/l}$, $s = 1$



Figur 58: Simulation sehr trägen Regelverhaltens bei doppelter Regelung mit sehr kleinen Proportionalfaktoren r und s
 Ungeregelt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 10$ h⁻¹
 Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{Soll}} = -31.5$ mV, $r = 0.1$
 Biomasseregung mit $X_{\text{Soll}} = 5$ g/l, $s = 0.1$

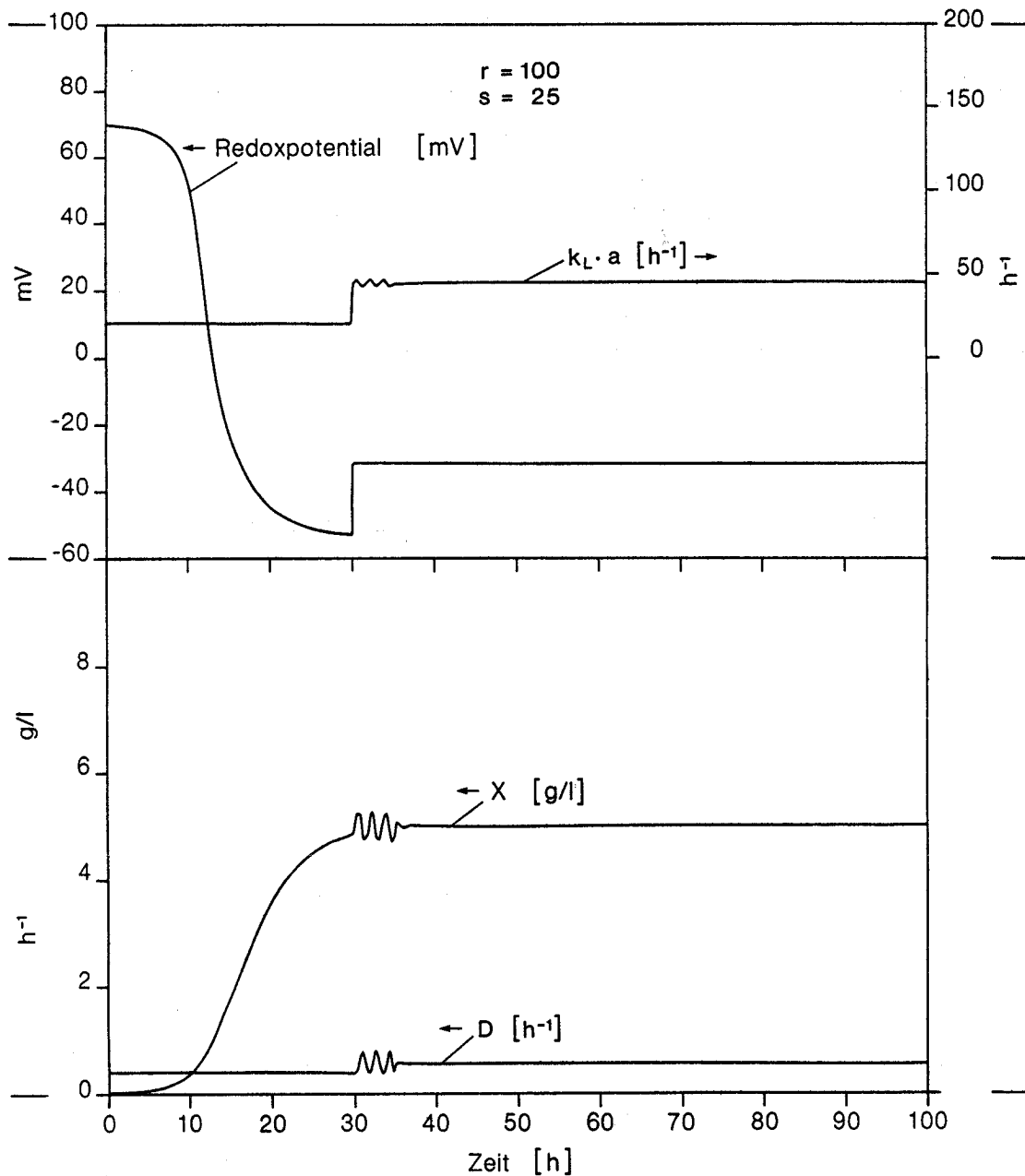


Figur 59: Simulation verringerter Amplitude der Regelschwingungen bei doppelter Regelung, wenn mit höherem $k_L \cdot a$ gestartet wird.

Ungeregt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 21 \text{ h}^{-1}$

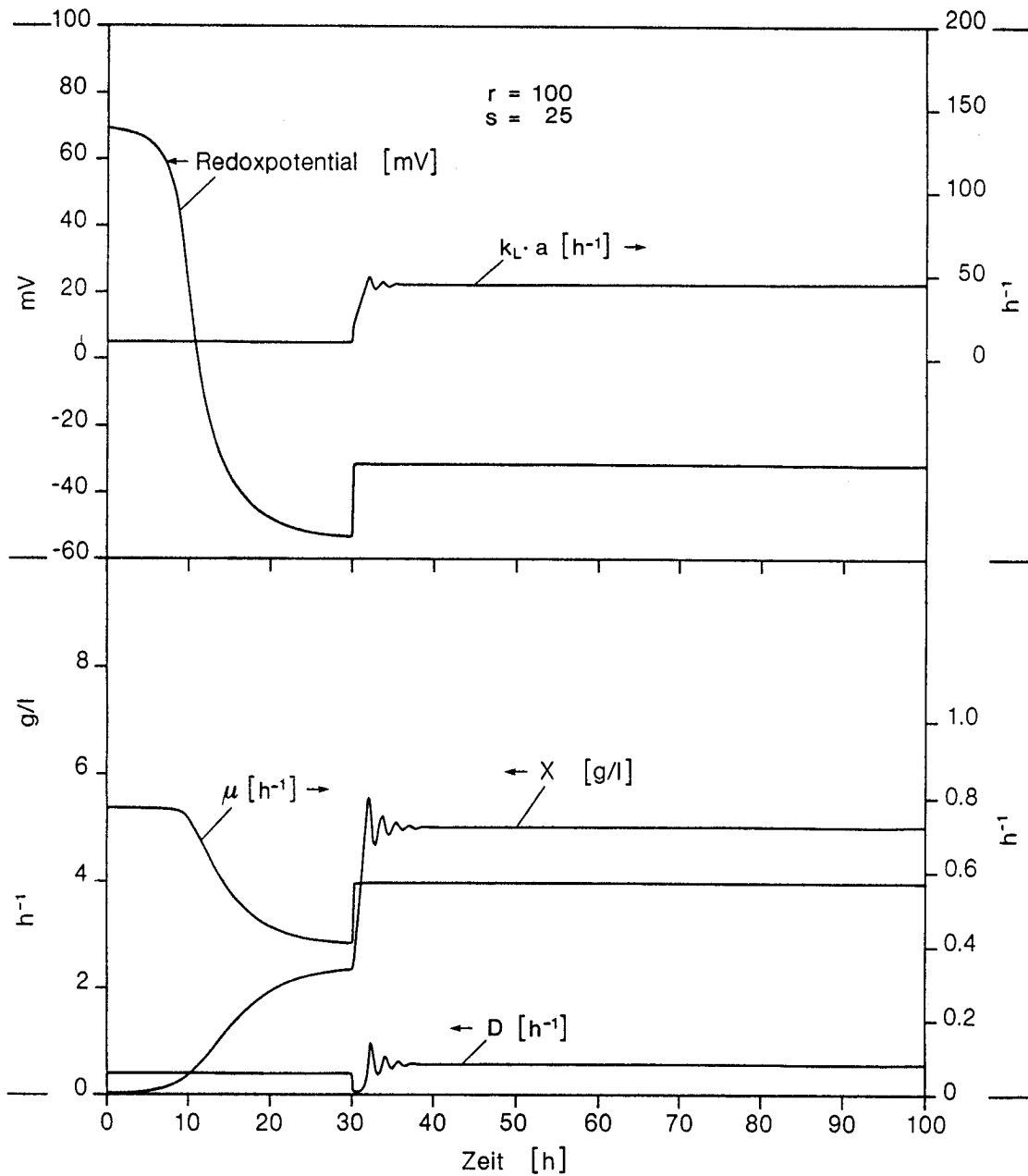
Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{Soll}} = -31.5 \text{ mV}$, $r = 100$

Biomasseregulation mit $X_{\text{Soll}} = 5 \text{ g/l}$, $s = 25$



Figur 60: Simulation wirksamer Schwingungsdämpfung bei doppelter Regelung mit Mittelwertverfahren (siehe Text), gleiche Startbedingungen wie in Figur 55

Ungeregelt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 21 \text{ h}^{-1}$
 Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{Set}} = -31.5 \text{ mV}$, $r = 100$
 Biomasseregung mit $X_{\text{Set}} = 5 \text{ g/l}$, $s = 25$



Figur 61: Simulation gedämpfter Regelschwingungen durch Einführen eines Dämpfungsgliedes in den Regelalgorithmus der Biomasseregung (Gl. 36). Ungeregelt bis $t = 30$ h mit $k_L \cdot a = 10 \text{ h}^{-1}$
 Redoxregelung mit $\text{Redox}_{\text{soll}} = -31.5 \text{ mV}$, $r = 100$
 Biomasseregung mit $X_{\text{soll}} = 5 \text{ g/l}$, $s = 25$

7.8. Vorschläge für weitere Untersuchungen

Neben der praktischen Verwirklichung des doppelten Regelungskonzeptes für das Redoxpotential und die Biomassekonzentration unter Verwendung zweier automatischer Regler sind in dieser Arbeit folgende Fragen offengeblieben:

- a) Läßt sich der vermutete Zusammenhang zwischen der Katabolit-Repression der Xylanasesynthese und dem Energiezustand der Organismen mit Hilfe weiterer Meßmethoden verifizieren?

Denkbar sind hier einerseits die Bestimmung des energy charge EC durch Messung der Konzentrationen der intrazellulären Adenosinnukleotide.

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit ist die on-line-Messung des intrazellulären NADH-Gehalts der Zellen mit einer Fluorometer-Sonde. Bestätigt sich dabei ein mutmaßlicher Zusammenhang zwischen der Regulation der Xylanasesynthese und der NADH-Konzentration, so läßt sich dieses Meßsignal möglicherweise auch, ähnlich wie das des Redoxpotentials, zur Regelung einer definierten limitierenden Sauerstoffkonzentration in der Kulturflüssigkeit verwenden.

- b) Gelten für das Aufheben der Katabolit-Repression anderer extrazellulärer Enzyme wie Protease oder Amylase bei *Bacillus amyloliquefaciens* die gleichen Sauerstoffkonzentrationen bzw. Redoxpotentiale oder sind die Grenzen, innerhalb derer eine maximale Enzymproduktion stattfindet, von Enzym zu Enzym individuell leicht verschieden?

Die generelle Gemeinsamkeit in der Regulation der genannten Enzyme konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, eine Optimierung des Verfahrens wurde jedoch nur in Hinblick auf eine maximale Xylanaseproduktion unternommen.

- c) Wieweit lassen sich die in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge zur Regulation der Xylanasesynthese verallgemeinern und auf andere Arten der Gattung *Bacillus*, bzw. auf andere Bakteriengattungen übertragen?

Eine wichtige Rolle wird dabei wahrscheinlich immer die Frage spielen, in wieweit die Enzymsynthese katabolitreprimiert ist. Dabei kann vermutlich davon ausgegangen werden, daß das hier beschriebene Verfahren bei jenen Organismen besonders gut funktioniert, deren konstitutive oder induzierte Exoenzymsynthese einer Katabolitreprression unterliegt.

- d) Welche anderen C-Quellen als Glycerin lassen sich für die Verfahren mit schwingenden Kulturen bzw. mit Regelung des Redoxpotentials verwenden?

Aufgrund der konstitutiven Xylanasesynthese können, wie gezeigt wurde, prinzipiell auch andere C-Quellen wie Glucose, Lactose oder Xylose verwendet werden. Zu dem für die Schwingungen der Biomasse charakteristischen Auswaschverhalten kommt es jedoch möglicherweise nur bei Verwendung von Glycerin, das als mutmaßliches gleichzeitiges Gärungsprodukt eine wichtige Rolle beim Zusammenbrechen des Stoffwechsels und Auswaschen der Zellen zu haben scheint.

Für das Verfahren mit Redoxregelung sollte die Art der C-Quelle dagegen keine Rolle spielen. Sofern das Redoxpotential hier auch noch eine Aussage über den Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit erlaubt, sollte dieses Verfahren auch in technischen Medien möglich sein.

- e) Welchen Einfluß hat eine zusätzliche Biomasserückhaltung auf die Enzymausbeute und auf das Regelkonzept der simultanen Regelung des Redoxpotentials und der Biomassekonzentration?

Wie anhand der Rechnersimulationen (vergl. Abschnitt 7.7) gezeigt werden konnte, lassen sich durch die doppelte Regelung theoretisch nahezu beliebige Biomassekonzentrationen einstellen, ohne daß es zu Störungen in der Regelung einer definierten Sauerstofflimitierung der Organismen kommt. Inwieweit durch eine Verweilzeitentkoppelung des Biomassewachstums eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute oder der Substratausnutzung zu erreichen ist, ohne daß es andererseits zu einer Störung des komplexen Regelkonzeptes kommt, muß in der Praxis untersucht werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, ein Verfahren zur kontinuierlichen Produktion einer Xylanase zu entwickeln. Dazu sollte ein Organismus gesucht werden, der Xylanase mit hohen Raum-Zeit-Ausbeuten in einem möglichst unkomplizierten Nährmedium produziert. Insbesondere war beabsichtigt, auf die Verwendung mycelbildender Schimmelpilze und feststoffhaltiger Medien zu verzichten. Es wurde daher der Stamm DSM 7 von *Bacillus amyloliquefaciens* ausgewählt, der auf Glycerin als C-Quelle gezüchtet wurde.

Im einzelnen konnten dabei folgende Ergebnisse erzielt werden:

Bacillus amyloliquefaciens Stamm DSM 7 ist zu einer konstitutiven Synthese der extrazellulären Xylanase fähig und zeigt in Schüttelkolben mit Glycerin, Glucose oder Lactose als C-Quelle Xylanaseaktivitäten zwischen 10 und 15 U/ml Kulturfiltrat.

In der Batchfermentation findet eine Xylanaseproduktion erst nach Abschluß des exponentiellen Wachstums statt. Der Grund dafür ist eine Katabolit-Repression der Xylanasesynthese, die erst aufgehoben wird, wenn das Wachstum der Organismen durch einen Substratmangel limitiert wird. Das limitierende und dadurch die Katabolit-Repression aufhebende Substrat war unter den gegebenen Fermentationsbedingungen der mit der Belüftung zugeführte Sauerstoff. Ursache ist der schlechte Sauerstoffeintrag in die Kulturflüssigkeit. Der Wert von $k_L \cdot a$ wurde als 10 h^{-1} bestimmt.

Im chemostatischen Betrieb der kontinuierlichen Fermentation geht die Xylanaseproduktion trotz Sauerstofflimitierung nach anfangs hohen Aktivitäten von 6 bis 15 U/ml bis auf geringe Restaktivitäten unter 1 U/ml zurück. Der Grund dafür wurde erkannt, als zusätzlich zum pO_2 -Wert der polarographischen Sauerstoffelektrode das Redoxpotential mit einer Platinelektrode gemessen wurde. Dabei zeigte sich, daß eine Xylanaseproduktion nur stattfindet, wenn das Redoxpotential in der Kulturflüssigkeit um -50 mV ($\pm 30 \text{ mV}$) liegt. Nach Eichmessungen zwischen der pO_2 - und der Redoxelektrode entspricht das Sauerstoffpartialdrücken von ca. 10^{-3} bar bzw. ca. 0.4% der Sauerstoffsättigung. Bei höheren Sauerstoffkonzentrationen unterliegt die Xylanasesynthese der Katabolit-Repression, bei tieferen Sauerstoffkonzentrationen findet ein Umschalten des Stoffwechsels statt, in dessen Folge vermehrt organische Säuren aber keine Xylanase produziert wird.

Um eine Xylanaseproduktion auch in der kontinuierlichen Fermentation zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren entwickelt:

1) Versetzt man die Kultur in Schwingungen der Biomassekonzentration, durchlaufen die Organismen immer wieder die Übergangszustände vom exponentiellen zum sauerstofflimitierten Wachstum, sodaß eine immer erneut angeregte, quasikontinuierliche Xylanaseproduktion resultiert. Diese Schwingungen der Biomassekonzentration lassen sich erzeugen, indem:

a) die Fermentation bei pH-Werten zwischen pH 5.5 und 5.0 durchgeführt wird, wobei sich stabile **Eigenschwingungen** der Biomasse ergeben, oder
b) der Steady-state der Biomasse durch kurzfristige Absenkungen des pH-Werts auf pH 5.0 gestört wird. In diesem Fall erhält man eine **induzierte Schwingung**.

2) Mit Hilfe einer **Regelung des Redoxpotentials** kann der Bereich des Sauerstoffpartialdrucks um 10^{-3} bar aufrechterhalten werden, in dem eine maximale Xylanaseproduktion stattfindet. Dazu wird das Redoxpotential durch eine geregelte Variation des Sauerstoffeintrags OTR in die Kulturflüssigkeit auf einem Sollwert konstant gehalten. Durch eine gleichzeitige Regelung der Biomassekonzentration durch Variation der Verweilzeit kann dabei ein Instabilwerden der Kultur durch ungehinderte Zu- oder Abnahme der Biomasse verhindert werden.

Die biomassespezifische **Produktivität der Xylanaseproduktion** in der chemostatischen Kultur ohne Biomasseschwingungen oder Redoxregelung ist praktisch Null, da die Organismen nach einer Anfangsphase keine Xylanase mehr produzieren. Dagegen konnte in der Fermentation mit freien Schwingungen über die gesamte Versuchszeit eine Produktivität von 32 U/(gTS·h) erreicht werden. Durch das Verfahren der Schwingungsinduktion konnte die Schwingdauer gegenüber den freien Schwingungen optimiert werden, wodurch sich eine Steigerung der Produktivität auf 110 U/(gTS·h) ergab. Nahezu eine Verzehnfachung gegenüber diesem Wert konnte durch das Verfahren der Redoxregelung erreicht werden. Bei einer durchschnittlichen Verweilzeit von 2.84 h wurde über fast 30 Verweilzeiten eine konstante spezifische Xylanaseaktivität von ca. 2800 U/gTS und eine biomassespezifische Produktivität von 986 U/(gTS·h) erzielt.

Durch eine **Rechnersimulation der Redoxregelung** mittels numerischer Integration nach Runge-Kutta konnte gezeigt werden, daß das Konzept der gleichzeitigen Regelung des Redoxpotentials und der Biomassekonzentration prinzipiell durchführbar ist, wenn geeignete Vorkehrungen zur Dämpfung eventueller Regelschwingungen getroffen werden.

ANHANG

A. Schrifttum

- Altometer: *Montage und Betriebsanleitung X-1000*
B.V. Altometer, Sliedrecht, Niederlande
- Aspinall, G.O. (1959): *Structural Chemistry of the Hemicelluloses*
Adv. Carbohydrate Chemistry, 14, 429-468
- Aspinall, G.O. (1980): *Chemistry of Cell Wall Polysaccharides*
in: *The Biochemistry of Plants - A comprehensive Treatise* Vol. 3:
Carbohydrates: Structure and Function Hrsg.: J.Preiss Academic
Press, New York etc.
- Baig, M.A.; Pazlarova, J.; Votruba, J. (1984): *Kinetics of α -Amylase
Production in a Batch and a Fed-batch Culture of Bacillus subtilis*
Folia Microbiol. 29, 359-364
- Berke, J. (1983): *Persönliche Mitteilung*
- Bernier, R. Jr.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Paice, M.G. (1983):
Isolation and Characterisation of a Xylanase from Bacillus subtilis
Applied and Environmental Microbiology, Vol. 46, No. 2, 511-514
- Biely, P.; Vrsanska, M.; Kratky, Z. (1980 a): *Xylan-Degrading Enzymes of
the Yeast Cryptococcus albidus - Identification and Cellular
Localization*
Eur. J. Biochem., 108, 313-321
- Biely, P.; Kratky, Z.; Vrsanska, M. (1980 b): *Induction and Inducers of
Endo-1,4- β -Xylanase in the Yeast Cryptococcus albidus*
Eur. J. Biochem, 108, 323-329
- Biely, P. (1985): *Microbial xylanolytic systems*
Trends in Biotechnology, Vol. 3, No. 11, 286-290
- Bioengineering AG: *Redox Measurement - Principles and Problems*
Bioengineering AG, CH-8636 Wald/Schweiz
- Biselli, M. (1986): *Untersuchung der Kinetik zweier Cellulasen mit
Cellodextrinen als Modellsubstraten*
Diplomarbeit, Universität Bonn
- Bisswanger, H. (1979): *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*
Verlag Chemie

- Bradford, M.M. (1976): *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding*
Anal. Biochem., 72, 248-254
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (Hrsg.) (1974): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8. Auflage, The Williams and Wilkins Company, Baltimore
- Bühler, H. (1985): *Messen in der Biotechnologie / ABC der Mess- und Regeltechnik*, Dr. Alfred Hürtig Verlag GmbH, Heidelberg
- Bulla, L.A.Jr. and Hoch, J.A. (1985): *Biology of the Bacilli*
in: *Biology of Industrial Microorganisms*, 57-78, Hrsg.: A.L. Demain, N.A. Solomon The Benjamin/Cummings Publ. Comp. Inc., London
- Chaloupka, J. Severin, A.I.; Sastry, K.J.; Kucerova, H. Strnadova, M. (1982): *Differences in the regulation of extracellular proteinase synthesis during growth and sporogenesis of Bacillus megaterium*
Canadian J. Microbiol., Vol. 28, 1214-1218
- Chaloupka, J. (1985): *Regulation of the Synthesis of Extracellular Proteinases in Bacilli*
in: FEMS Symp., Bd. 23, 287-293
- Coleman, G. (1966): *Characteristics of α -Amylase Formation by Bacillus subtilis*
Nature, Vol. 211, 306-307
- Coleman, G. (1967): *Studies on the Regulation of Extracellular Enzyme Formation by Bacillus subtilis*
J. Gen. Microbiol., 49, 421-431
- Conrad, D. (1981): *Enzymatic Hydrolysis of Xylans - 1. A high Xylanase and β -Xylosidase producing strain of Aspergillus niger*
Biotechnology Letters, Vol. 3, No. 7, 345-350
- Conrad, D. (1983): Persönliche Mitteilung
- Dancer, B.N. and Mandelstam, J. (1975): *Criteria for Categorizing Early Biochemical Events Occuring during Sporulation of Bacillus subtilis*
Journal of Bacteriology, Vol. 121, No. 2, 411-415
- Dekker, R.F.H. (1983): *Bioconversion of Hemicellulose: Aspects of Hemicellulase Production of Trichoderma reesei QM 9414 and Enzymatic Saccharification of Hemicellulose*
Biotech. Bioeng., Vol. 25, 1127-1146

- Deschamps, A.M.; Comtat, J.; Nouvion, N.; Libeault, J.M. (1982):
*Degradation of Purified Birch-Wood Xylan and Production of Xylanase
by Wood-Decaying Bacteria*
J. Gen. Appl. Microbiol., 28, 275-280
- Doelle, H.W. (1975): *Bacterial Metabolism*, 2. Auflage,
Academic Press, New York, San Francisco, London
- Eggstein, M.; Kuhlmann, E. (1974): *Triglyceride und Glycerin*
in: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): *Methoden der enzymatischen Analyse*,
Band 2, Seiten 1871-1877, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim
- Egorov, N.S.; Loriya, Z.K. Yudina, T.G. (1982): *Effect of various Carbon
Sources and Purine Nucleotides on the Synthesis of Exoprotease by
Bacillus thuringiensis*
Microbiology, 51(1), 35-39
- Egorov, N.S.; Vybornykh, S.N.; Loriya, Z.K.; Fishinger, Z. (1984):
Repression of Exoprotease Synthesis
Microbiology, 52(6), 743-746
- Emanuilova, E.I.; Toda, K. (1984): *α -Amylase Production in Batch and
Continuous Cultures by Bacillus caldolyticus*
Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 301-305
- Emi, S.; Fukumoto, J.; Yamamoto, T. (1971): *Studies of Hemicellulolytic
Enzymes of Bacillus subtilis - Part 1. Purification, Crystallization
and some properties of Arabinogalactanase*
Agr. Biol. Chem., Vol. 35, No. 12, 1891-1898
- Esteban, R.; Villanueva, J.R.; Villa, T.G. (1982): *β -D-Xylanases of
Bacillus circulans WL-12*
Canadian J. Microbiol., 28, 733-739
- Everaerts, F.M.; Beckers, J.L.; Verheggen, T. (1976): *Isotachophoresis:
Theory, Instrumentation, and Applications*
Elsevier Scientific Publ. Comp., Amsterdam, Oxford, New York
- Fährnich, P. (1983): *Persönliche Mitteilung*
- Fengel, D. (1970): *Molekularer und übermolekularer Aufbau von Holz*
Umschau, Heft 14, 434-441
- Flannigan, B. and Sellars, P.N. (1978): *Production of Xylolytic Enzymes
by Aspergillus fumigatus*
Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, 71, Nr. 3,
353-358

- Frankena, J.; van Verseveld, H.W.; Stouthamer, A.H. (1985):
A Continuous Culture Study of the Bioenergetic Aspects of Growth and Production of Exocellular Protease in Bacillus licheniformis
Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 169-176
- Frankena, J.; Koningstein, G.M.; van Verseveld, H.W.; Stouthamer, A.H. (1986): *Effect of different limitations in chemostate cultures on growth and production of exocellular protease by Bacillus licheniformis*
Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 106-112
- Frederick, M.M.; Kiang, C-H.; Frederick, J.R.; Reilly, P.J. (1985):
Purification and Characterisation of Endo-Xylanases from Aspergillus niger. 1. Two Isoenzymes Active on Xylane Backbones near Branch Points
Biotech, Bioeng., Vol. 27, 525-532
- Ghose, T.K.; Bisaria, V.S. (1984): *Measurement of Hemicellulase Activities (Part 1 - Xylanases)*
Biotechnology Commission, International Union of Pure & Applied Chemistry, New Dehli
- Gorbacheva, I.V. and Rodionova, N.A. (1977): *Studies on xylan degrading enzymes, 1. Purification and characterisation of Endo-1,4- β -Xylanase from Aspergillus niger Str. 14*
Biochemica et Biophysica Acta, 484, 79-93
- Görn, W. (1978): *Xylan-abbauende Enzyme aus Trichoderma koningii, Versuche zur Isolierung und Charakterisierung*
Diplomarbeit, Technische Universität Berlin
- Grunow, R. (1981): *Synthese von extrazellulären Enzymen durch Bacillus-Zellen - genetische Grundlagen und Möglichkeiten über Beeinflussung*
in: Abhandlungen der Akad. der Wissenschaften der DDR, Abt. Math. Naturwiss./Technik (3N, Mikrob. Enzymprod.), S.77-122
- Gwinner, E. (1978): *Bioenergie, Biomasse, Biotechnologie*, Band 1 der Schriftreihe Chemische Industrie, Handelsblatt GmbH, Verlag für Wirtschaftsinformation
- Hanlon, G.W.; Hodges, N.A.; Russel, A.D. (1982): *The Influence of Glucose, Ammonium and Magnesium Availability on the Production of Protease and Bacitracin by Bacillus licheniformis*
Journ. of Gen. Microbiology, 128, 845-851

- Heineken, F.G. and O'Connor, R.J. (1972): *Continuous Culture Studies on the Biosynthesis of Alkaline Protease, Neutral Protease and α -Amylase by Bacillus subtilis NRRL-B3411*
Journal of General Microbiology, 73, 35-44
- Iizuka, H. and Kawaminami, T. (1969): *Studies on Xylanase from Microorganisms - Part 2: Isolation and Selection of Xylanase-producing Microorganisms and the Identification of a New Species of Streptomyces*
Agr. Biol. Chem., Vol. 33, No. 9, 1257-1263
- Imsande, J.; Gillin, F.D.; Tanis, R.J.; Atherly, A.G. (1970): *Properties of Penicillinase from Bacillus cereus 569*
J. Biol. Chem., 245, 2205-2212
- Ingle, M.B. and Boyer, E.W. (1976): *Production of industrial Enzymes by Bacillus species*
in: Schlesinger, D. (Hrsg.): Microbiology, 420-426, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ingold, Dr. W., AG: *PO₂ - Anleitung zur PO₂-Elektrode*, Dr. W. Ingold AG, CH-8902 Urdorf/Schweiz
- Jacob, F. and Monod, J. (1961): *Genetic Regulatory Mechanisms in the synthesis of Proteines*
Journ. Mol. Biol., 3, 318
- Jacob, H.-E. (1970): *Redox Potential*
in: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (Hrsg.): Methods in Microbiology, Vol. 2, 91-123, Academic Press, London, New York
- James, W. and Mandelstam, J. (1985): *Protease Production during Sporulation of Germination Mutants of Bacillus subtilis and the Cloning of a Functional gerE Gene*
Journal of General Microbiology, 131, 2421-2430
- John, M.; Schmidt, B.; Schmidt, J. (1979): *Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-Xylanases and a β -D-Xylosidase produced by a strain of Aspergillus niger*
Canadian Journal of Biochemistry, Vol. 57, No. 2, 125-134
- Kantengwa, S. and Ohia, M. (1985): *Role of glutamine synthetase in the initiation of sporulation in Bacillus poymyxa*
Arch. Microbiol., 141, 204-208

- Khan, A.W.; Tremblay, D.; LeDuy, A. (1986): *Assay of Xylanase and Xylosidase Activities in Bacterial and Fungal Cultures*
Enzyme Microb. Technol., vol 8, June, 373-377
- Kjaergaard, L.; Joergensen, B.B. (1979): *Redox Potential as a State Variable in Fermentation Systems*
Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 9, 85-94
- Kjaergaard, L.; Joergensen, B.B. (1980): *The Redox Potential, a hitherto seldom used Parameter in Fermentation systems*
in *Advances in Biotechnology/Proceedings of Int.Ferment. Symp. 6. Meeting* (Hrsg.: Moo-Young, M. et al.)
- Kneifel, H. (1986): *Persönliche Mitteilung*
- Kratky, Z. and Biely, P. (1980): *Inducible β -Xyloside Permease as a Constituent of the Xylan-Degrading Enzyme System of the Yeast *Cryptococcus albidus**
Eur. J. Biochem., 112, 367-373
- Krieg, A. (1981): *The Genus Bacillus: Insect Pathogens*
in: *The Procaryotes - A Handbook on Habitus, Isolation and Identification of Bacteria*, Vol.2, 1743-1755, Hrsg.: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Kubicek, C.P. (1983): *Produktion und Eigenschaften von Hemicellulasen aus Mikroorganismen*, *Berichtsband zum Workshop über Verwertungsmöglichkeiten von Pentosen*, Wien, S. 11-125
- Laishley, E.J. and Bernlohr, R.W. (1968): *Regulation of Arginine and Proline Catabolism in Bacillus licheniformis*
J. Bacteriol., 96, 322-329
- Lehninger, A.L. (1979): *Biochemie*, 2. erweiterte Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, New York
- Leuthardt, F. (1977): *Intermediär-Stoffwechsel*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York
- Lopez, J.M. Marks, C.L.; Freese, E. (1979): *The Decrease of Guanin Nucleotides initiates Sporulation of Bacillus subtilis*
Biochimica et Biophysica Acta, 587, 238-352
- Mandelstam, J. (1969): *Regulation of Bacterial Spore Formation*
in: *Symposium of the Society for General Microbiology/Cambridge*, Band 19, 377-401

- Meers, J.L. (1972): *The Regulation of α -Amylase Production in Bacillus licheniformis*
Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 38, 585-590
- Michaelis, L.; Menten, M.L. (1913): *Die Kinetik der Invertinwirkung*
Biochemische Zeitschrift, 49, 333-369
- Moravkova, J. and Chaloupka, J. (1984): *Repression of the Synthesis of Extracellular and Intracellular Proteinases in Bacillus megaterium*
Folia Microbiol., 29, 273-281
- Nakane, A. (1978): *Proteases Produced by a Proteolytic Mutant of Clostridium botulinum type E*
J. Gen. Microbiol., 107, 85-91
- Nakanishi, K.; Yasni, T.; Kobayashi, T. (1976): *Inducers for the Xylanase Production by Streptomyces sp.*
J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 11, 801-807
- Nakanishi, K. and Yasni, T. (1980): *Production of Xylanase by Streptomyces sp., Using Non-metabolizable Inducer*
Agric. Biol. Chem., 44(11), 2729-2730
- Notario, V.; Villa, T.G. Villaneva, J.R. (1979): *Cell Wall-associated 1,4- β -D-Xylanase in Cryptococcus albidus var. aerius: in situ Characterization of the Activity*
Journal of General Microbiology, 114, 415-422
- Okazaki, W.; Akiba, T.; Horikoshi, K.; Akahoshi, R. (1984): *Production and properties of two types of xylanases from alkalophilic thermophilic Bacillus ssp.*
Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 335-340
- Panbangred, W.; Shinmyo, A.; Kinoshita, S.; Okada, H. (1983): *Purification and Properties of Endoxylanase produced by Bacillus pumilis*
Agric. Biol. Chem., 47(5), 957-963
- Peiris, S.P.; Rickard, P.A.D.; Dunn, N.W. (1982): *Comparison of the Xylanolytic and Cellulolytic Activities of Cellulomonas*
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 169-173
- Pressler, G. (1967): *Regelungstechnik — Band 1: Grundelemente*
BI-Hochschultaschenbücher, 3. Auflage 1967
- Prestidge, L.; Gage, V.; Spizizen, J. (1971): *Protease Activities during the Course of Sporulation in Bacillus subtilis*
J. Bacteriol., 107, 815-823

- Priest, F.G. (1977): *Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus Bacillus*
Bacteriological Reviews, Vol. 41, No. 3, 711-753
- Priest, F.G. (1983): *Enzyme Syntheses: Regulation and Process of Secretion by Microorganisms*
in: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Hrsg.: W.M. Fogarty, Appl. Science Publ., London
- Priest, F.G. and Thirunavukkarasu, M. (1985): *Synthesis and localisation of α -amylase and α -glucosidase in Bacillus licheniformis grown in batch and continuous culture*
J. of Applied Bacteriology, 58, 381-390
- Puls, J.; Sinner, M.; Dietrichs, H.H. (1978): *Trägergebundene xylanolytische Enzyme - 1. Wirkungsweise xylanolytischer Enzyme*
Starch/Stärke 30, Nr. 9, 294-299
- Radjai, M.K.; Hatch, R.T. Cadman, T.W. (1984): *Optimization of Amino Acid Production by Automatic Self-Tuning Digital Control of Redox Potential*
Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 14, 657-679
- Reilly, P.J. (1981): *Conversion of Agricultural By-Products to Sugars*
Final Report, prepared for the National Science Foundation
Washington, DC, National Technical Information Service, U.S. Department of Commerce, Springfield, VA 22101
- Reuß, M. (1979)a: *Verfahrenstechnik mikrobieller Prozesse*
Skriptum zur Vorlesung Fermentationstechnik 1
Technische Universität Berlin
- Reuß, M. (1979)b: *Reaktionstechnik mikrobieller Prozesse*
Skriptum zur Vorlesung Fermentationstechnik 2
Technische Universität Berlin
- Robison, P.D. (1984): *Cellulase and Xylanase Production by Trichoderma reesei Rut C-30*
Biotechnology Letters, Vol. 6, No. 2, 119-122
- Schäffer, P.; Millet, J.; Aubert, J.-P. (1965): *Catabolic Repression of Bacterial Sporulation*
Microbiology, Vol. 54, 704-711
- Schimz, K.L. (1983): *Persönliche Mitteilung*
- Schlegel, H.G. (1976): *Allgemeine Mikrobiologie*, 4. überarbeitete Auflage,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Schlegel, H.G. (1985): *Allgemeine Mikrobiologie*, 6. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Schmid, G. (1986): *Charakterisierung von definierten Cellulasen mit löslichen Cellodextrinen*, Dissertation, Bonn
- Schmidt, A. (1983): *Pentosen - Prinzipielle Überlegungen zur Herstellung und Verwertung*
in: *Berichtsband zum Workshop über Verwertungsmöglichkeiten von Pentosen*, Wien; S. 1-12
- Schmidt, J.; John, M.; Wandrey, C.; Sahm, H. (1982): *Abbau von Hemicellulose durch ein leistungsstarkes Xylanase-System*
in: *Dechema-Monographien, Band 94: Neuentwicklungen in der Biotechnologie*
- Sekiguchi, J. and Okada, H. (1972): *Regulation of α -Amylase production in a *Bacillus subtilis* Marburg strain - 1. Isolation of Mutants which Produce high Levels of α -Amylases and Analysis of their Enzymes*
J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 12, 801-809
- Shimizu, Y; Nishino, T.; Murao, S. (1984): *Inhibition of Sporulation of *Bacillus subtilis* by MAPI, a Serine Protease Inhibitor, and Interaction of MAPI with Membrane Bound Protease*
Agric. Biol. Chem., 48(2), 365-372
- Sippola, M. and Mäntsälä, P. (1981): *Coproduction of Several Exoenzymes in *Bacillus subtilis**
FEMS Microbiology Letters, 10, 303-306
- Stevens, B.J.H. and Payne, J. (1977): *Cellulase and Xylanase Production by Yeast of the Genus *Trichosporon**
Journal of General Microbiology, 100, 381-393
- Stüttgen, E. and Sahm, H. (1982): *Purification and Properties of Endo-1,4- β -Xylanase from *Trichoderma cutaneum**
European J. of Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 93-99
- Thirunavukkarasu, M. and Priest, F.G. (1980): *Regulation of α -Amylase synthesis in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346*
FEMS Microbiology Letters, 7, 315-318
- Thompson, B.G.; Gerson, D.F. (1985): *Elektrochemical Control of Redox Potential in Batch Cultures of *Escherichia coli**
Biotechnol. Bioeng., Vol. 27, 1512-1515

- Timell, T.E. (1964): *Wood Hemicelluloses - part 1*
in: *Advances in Carbohydrate Chemistry* Vol. 19, 246-309,
Hrsg.: M.L. Wolfrom
- Welker, N.E. and Campbell, L.L. (1963): *Induction of α -Amylase of
Bacillus stearothermophilus by Maltodextrines*
J. Bacteriol., 86, 687-691
- Welker, N.E. and Campbell, L.L. (1967 a): *Unrelatedness of Bacillus
amyloliquefaciens and Bacillus subtilis*
Journal of Bacteriology, Vol. 94, No. 4, 1124-1130
- Welker, N.E. and Campbell, L.L. (1967 b): *Comparison of the α -Amylase of
Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens*
J. of Bacteriology, vol. 94, No.4, 1131-1135
- Whistler, R.L. and Richards, E.L. (1970): *Hemicelluloses in the
Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry* (Hrsg. W. Pigman and D.
Horton) 2. Auflage, S. 447-469, Academic Press, New York, London
- Wicker, U. (1984): *Isolierung und Charakterisierung einer thermostabilen
Xylanase von Bacillus stearothermophilus*
Dissertation, Universität Düsseldorf
- Wood, W.A. (1961): *Fermentation of Carbohydrates and Related Compounds
in: The Bacteria - A Treatise on Structure and Function*
Vol. 2: Metabolism, 59-150, Hrsg.: J.C. Gunsalus and R.Y. Stanier,
Academic Press, New York, London
- Yasui, T.; Nguyen, B.T.; Nakanishi, K. (1984): *Inducers for Xylanase
Production by Cryptococcus flavus*
J. Ferment. Technol., Vol. 62, No. 4, 353-359
- Yoneda, Y. And Marno, B. (1975): *Mutation of Bacillus subtilis causing
hyperproduction of α -amylase and protease and its synergistic effect*
J. Bacteriol., 124, 48-54

B. Liste der verwendeten Chemikalien**Merck AG, Darmstadt:**

Ammoniumsulfat p.A.
 Calciumchlorid · 2 H₂O p.A.
 Citronensäure · 1 H₂O p.A.
 Dikaliumhydrogenphosphat p.A.
 Eisen(II)sulfat · 7 H₂O p.A.
 Glycerin 87% reinst
 Hefeextrakt, gepulvert
 Kaliumdihydrogenphosphat p.A.
 Magnesiumnitrat · 6 H₂O p.A.
 Maleinsäure z. Synth.
 Mangan(II)sulfat · 1 H₂O p.A.
 Natriumhydroxid Plättchen p.A.
 Natriumnitrat · 7 H₂O p.A.
 ortho-Phosphorsäure 85% p.A.
 Stärke löslich (nach Zulkowsky) p.A.
 Trichloressigsäure p.A.
 D(+)-Xylose f. Biochem. Zwecke

Boehringer, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat · 3 H₂O, krist. Dinatriumsalz
 Albumin aus Rinderserum, lyophilisiert
 Glycerokinase aus Candida Mycoderma, Suspension
 Myokinase aus Schweinemuskel, Suspension
 NADH Dinatriumsalz, Grad II, 98%
 Phosphoenolpyruvat Monokaliumsalz, kristallin
 Pyruvatkinase/Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Susp.
 Triäthanolamin-hydrochlorid, kristallin

Serva, Heidelberg:

Azocasein Natriumsalz, lyophilisiert, reinst
 Silicon-Antischaum-Emulsion M 30
 Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, rein, >99%

Roth, Karlsruhe:

Xylan aus Haferspelzen 95%, Charge 2133601
 Polypropylenglycol P 2000

Bio-Rad, München:

Protein assay kit

C. Liste der verwendeten Geräte

Fermenter Biostat ER-5:

B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Pilot-Shake (System Kühner)

B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Prozeßregelsystem 99 UCB

Foxboro GmbH, Düsseldorf

Elektronischer Kompaktregler Typ SD

Hartmann & Braun AG, Frankfurt

Waage-Füllstandsregelung Typ 3520.03

Toledo GmbH, Köln

Dosiersystem YPP01

Sartorius AG, Göttingen

Magnetisch-induktiver Durchflußmesser Altoflux X-1000

Krohne Meßtechnik GmbH, Duisburg

Schlauchpumpe 501 U50, U100, U170

Watson-Marlow Ltd., Falmouth, GB

Zweistrahl-Spektralphotometer UV-150-02

Shimadzu Co. Kyoto, Japan

Spektralphotometer PMQ II

Zeiss AG, Oberkochen

Spektralphotometer PM 6

Zeiss AG, Oberkochen

Multiple Gas Analyzer 1200

Perkin-Elmer, Pomona, Calif., USA

Kühlzentrifuge J2-21

Beckman Instruments, München

Laborzentrifuge Biofuge A

Heraeus-Christ GmbH, Osterode

Gaschromatograph 5790 A

Hewlett Packard, USA

HPLC-Flüssigchromatograph 1084 B

Hewlett Packard, USA

Tachophor 2127

LKB, Bromma, Schweden

Ultraschallgerät Cell Disruptor B15 mit Standard ½"-Horn

Branson Sonifier, USA

