



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

**Xylosevergärung mit dem
thermophilen Bakterium
Thermoanaerobacter finnii**

von

Ulrike Schmid

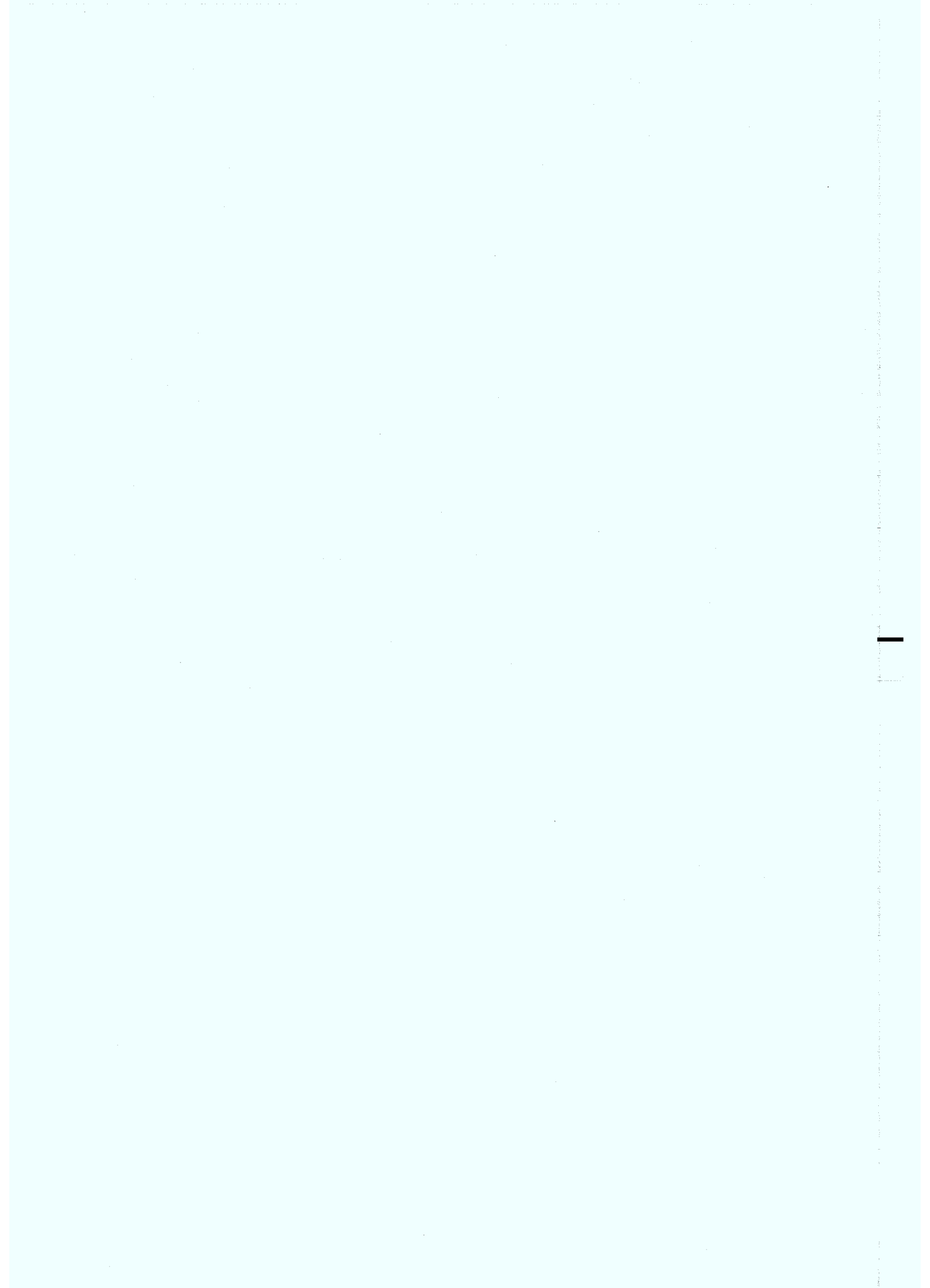
**Jül-2168
Dezember 1987
ISSN 0366-0885**

**Xylosevergärung mit dem
thermophilen Bakterium
Thermoanaerobacter finnii**

von

Ulrike Schmid

D 10 (Diss. Uni. Düsseldorf)



Fermentation of xylose with the thermophilic bacterium

Thermoanaerobacter finnii

This study presents results of the fermentation of xylose with the thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter finnii*, especially the effects of substrate concentration on end product formation.

1. Comparative studies on differences in morphological and physiological features, GC-content and DNA-homologies of *AKO-1* with other thermophilic bacteria were performed. The newly isolated bacterium *AKO-1* is closely related to the nonspore-former *Thermoanaerobacter ethanolicus*. It was classified as *Thermoanaerobacter finnii*.
2. Fermentation of xylose yields ethanol, acetate, L-lactate, H₂ and CO₂ in varying amounts depending on the substrate concentration. Batch fermentations with increasing xylose concentrations higher than 66 mM resulted in a decrease of the ethanol yield from 1.25 to 0.85 mol/mol xylose (maximum ethanol yield is 1.66 mol/mol xylose) and in an increase in lactate formation. Fed-batch-fermentations with stationary concentrations of xylose between 20 and 60 mM lead to a very low lactate production (2mM), so that from 200 mM of xylose 230 mM ethanol were produced, corresponding to 70% of the maximal achievable yield. Increasing xylose consumption rates lead to increasing lactate formation rates (from 0.04 to 1.52 mmol/l·h), whereas the ethanol formation rate remained largely constant (5.2 and 4.6 mmol/l·h respectively). The inhibitory effect of ethanol on growth and product formation was circumvented by continuous removal of the produced alcohol from the culture broth by an inert gas stream. That way xylose consumption could be raised from 200 to 400 mM.
3. Enzymatic studies showed that *T. finnii* catabolises xylose to xylulose and xylulose-5-phosphate which is then degraded to pyruvate via the pentosephosphate pathway and glycolysis. Fructose-1,6-bisphosphate has been shown to be an activator

of the lactate-dehydrogenase and causes a decrease of the K_m values for NADH and pyruvate. The lactate-dehydrogenase has a pH-optimum at pH7.0 and is completely inhibited by 2 mM NADPH. The activity of the ferredoxin-NAD-reductase (1.1 U/mg protein) was 10 times higher than the ferredoxin-NADP-reductase activity. For the first time a transhydrogenase activity (0,9 U/mg protein) was detected in thermophilic ethanol producing bacteria, which transferred electrons from NADH to NADP. The activity of the acetaldehyde-dehydrogenase in *T. finnii* was very low (0.03 U/mg protein) compared to the other catabolic enzyme activities.

4. The intracellular pyridine nucleotide levels were between 1.5 to 4 nmol NADPH/mg dry weight and 0.6 to 2 nmol NADH/mg dry weight, whereas the NAD and NADP levels reached only 0.1 to 1.2 and 0.5 to 1.2 nmol/mg dry weight, respectively. The intracellular fructose-1,6-bisphosphate concentrations ranged between 1.2 and 8.4 nmol/mg dry weight. These fructose-1,6-bisphosphate levels are sufficient for complete activation of the lactate-dehydrogenase, so that presumably the lactate formation depends not only on the intracellular fructose-1,6-bisphosphate level, but also on the intracellular concentration of pyruvate.

Abkürzungen

APAD	Acetylpyridin-adenindinucleotid, oxidiert
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
cpm	counts per minute
D	Durchflußrate
E	Extinktion
ΔE	Extinktionsänderung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
FMN	Flavinmononucleotid
GDH/TIM	Glycerin-3-P-Dehydrogenase/ Triosephosphatisomerase
h	Stunde
HE	Hefeextrakt
IS	Interner Standard
K_i	Inhibitorkonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KPP	Kaliumphosphatpuffer
min	Minute
MV	Methylviologen
NAD(P)	β -Nicotinamid-adenindinucleotid(phosphat) oxidiert
NAD(P)H	β -Nicotinamid-adenindinucleotid(phosphat) reduziert
$OD_{600 \text{ nm}}$	optische Dichte bei 600 nm
1xSSC	Standard Saline Citrat (0,15 M NaCl + 0,015 M Trinatriumcitrat, pH 7,0
T.	Thermoanaerobacter
Ta.	Thermoanaerobium
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
1. Organismen	7
2. Nährmedien	7
3. Anzucht und Kulturbedingungen	10
3.1. Stammhaltung	10
3.2. Kultivierung unter pH-statisierten Bedingungen	10
3.3. Fed-Batch-Kultur im 6 l Bioengineering-Fermenter ...	11
3.4. Wachstum in pH-statisierter Fed-Batch-Kultur mit kontinuierlichem Alkoholabzug (Strip-Destillation)..	11
3.5. Kontinuierliche Kultur	12
4. Versuchsbedingungen mit konzentrierten Zell- suspensionen	13
5. Bestimmung des Bakterienwachstums	13
6. Analytik der Fermentationsprodukte	13
7. Bestimmung von Enzymaktivitäten	16
7.1. Herstellung von Rohextrakten	16
7.2. Biuret-Proteinbestimmung	17
7.3. Anaerobe Testbedingungen	18
7.4. Testansätze	19
8. DNA-Analysen	29
8.1. DNA-Isolierung	29
8.2. Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA	31
8.3. Bestimmung von DNA-Renaturierungsraten	32
9. Zellwandanalysen	33
10. Elektronenmikroskopie	35
11. Bioluminometrische Bestimmung von Adenosinnucleo- tiden mit Luciferin/Luciferase	35
12. Bioluminometrische Bestimmung von NADH und NADPH ...	39
12.1. Extraktion von Pyridinnucleotiden und deren Umsetzung	39
12.2. Bestimmung der NAD(P)H:FMN-Reduktase	41
12.3. Bestimmung der Luciferase-Aktivität	42
12.4. Spezifische enzymatische Umsetzungen	44
12.5. Bioluminometrische Bestimmung von NADH und NADPH ...	45
13. Fructose-1,6-diphosphat-Bestimmung	47
14. Chemikalien	48

	Seite
III. Ergebnisse	50
1. Untersuchungen zur systematischen Einordnung von <i>T. finnia</i>	50
1.1. Temperaturresistenz	51
1.2. Zellwandanalysen	52
1.3. Bestimmung des GC-Gehaltes	53
1.4. DNA-DNA-Hybridisierung	54
1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den taxonomischen Untersuchungen	55
2. Einfluß der Substratkonzentration auf die Endproduktbildung	57
2.1. Vergärung von Xylose-Glucose-Gemischen	57
2.2. Vergärung von Xylose in pH-statisierter Batch-Kultur	59
2.3. Fed-Batch-Fermentationen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen	60
2.3.1. Einfluß von Hefeextrakt, Eisensulfat und Ammonium- chlorid auf Wachstum und Endproduktbildung	63
2.3.2. Untersuchungen zur C-Bilanz in Fed-Batch- Fermentationen.....	65
2.4. Xylosevergärung mit konzentrierten Zell- suspensionen von <i>T. finnia</i>	66
2.5. Fed-Batch-Fermentationen mit kontinuierlichem Alkoholabzug	69
3. Untersuchungen zu Enzymaktivitäten im Xylosemetabolismus	73
3.1. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Xylosemetabo- lismus und der Glycolyse	74
3.2. Ferredoxin-abhängige Enzymaktivitäten	76
3.3. Nachweis der Acetaldehyd-Dehydrogenase, Transhydroge- nase und Acetatkinase in Rohextrakten von <i>T. finnia</i> ..	78
3.4. Charakterisierung der L-Lactat-Dehydrogenase von <i>T. finnia</i>	81
3.4.1. pH-Optimum	82
3.4.2. Reaktionsgeschwindigkeit der Lactat-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der FDP-Konzentration	82

	Seite
3.4.3. K_M -Werte für Pyruvat und NADH in Abhängigkeit von der FDP-Konzentration	83
3.4.4. Einfluß verschiedener Metabolite auf die Lactat- Dehydrogenase-Aktivität	86
4. Bestimmung von intrazellulären Metabolit-Pools	88
4.1. Ausarbeitung des Testsystems für die biolumino- metrische Bestimmung von intrazellulären NAD(P,H)- Pools	88
4.1.1. Testsystem mit definierten Luciferase- und FMN- Reduktase-Konzentrationen	88
4.1.2. Untersuchungen zur Vollständigkeit der enzymatischen Umsetzungen für die NAD(P,H)-Bestimmung und die Stabilität der Nucleotide während der Extraktion ...	91
4.1.3. Untersuchungen zur Extraktionsmethode	92
4.1.4. Nachweisgrenzen und Reproduzierbarkeit der NAD(P,H)-Bestimmungen	93
4.2. Intrazelluläre Poolbestimmungen in Fed-Batch-Kulturen mit unterschiedlichem Substratangebot	94
4.3. Intrazelluläre Poolbestimmungen von kontinuierlichen Kulturen bei verschiedenen Durchflußraten	99
IV. Diskussion	102
V. Zusammenfassung	113
VI. Literaturverzeichnis	115

I. EINLEITUNG

Xylose gehört zu den am weitesten verbreiteten Kohlenhydrate in der Natur und ist Hauptbestandteil pflanzlicher Hemicellulosen. Den Hauptanteil der Hemicellulosen bilden die Xylane, die aus etwa 200 Xyloseeinheiten bestehen, die β -1,4-glycosidisch miteinander verknüpft sind. An diese Hauptkette können über Seitenketten noch weitere Zucker wie Arabinose, Glucose und Glucuronsäure gebunden sein, die zum Teil noch methyliert oder acetyliert sind (Sahm,1979; Biely,1985). Xylane können bis zu 25 % der Biomasse von Harthölzern und bis zu 35 % bei Stroh ausmachen (Magee und Kosaric,1985), und fallen so in großen Mengen in land- und forstwirtschaftlichen Rückständen an. Große Mengen Xylose werden in der Zellstoffindustrie als Bestandteil der Sulfitablauge freigesetzt, die bisher als Abfall betrachtet wird (Biely, 1985). Hemicellulosen können relativ einfach durch Säure- oder enzymatische Hydrolyse in Monosaccharide gespalten werden. Die Säurehydrolyse ist sehr schnell und effektiv (80 % Ausbeute an Pentosen), jedoch werden Zersetzungsprodukte wie Furfural gebildet, welches besonders auf Hefen sehr toxisch wirkt (Jeffries,1983). Die unerwünschte Furfuralbildung läßt sich aber durch enzymatische Spaltung der Hemicellulosen vermeiden.

Das große Vorkommen von Xylose, vor allem als bisher ungenutztes Abfallprodukt, macht eine Umsetzung in nützliche Produkte, wie Ethanol, interessant. Da Ethanol nahezu alle Eigenschaften besitzt, welche konventionelle Flüssigkraftstoffe auszeichnen, kann Ethanol auf dem Brennstoffsektor eingesetzt werden (Giesel,1984). Ethanol ist außerdem aufgrund seiner chemischen Struktur und Reaktivität ein wichtiger Ausgangsstoff für chemische Synthesen (von Bremen und Schmoltzi,1986).

Bisher erfolgt die fermentative Ethanolproduktion durch Hefen, wie *Saccharomyces*-, *Torula*- und *Kluveromyces*-Arten und neuerdings mit dem Bakterium *Zymomonas mobilis*. Diese Mikroorganismen haben aber nur ein sehr begrenztes Substratspektrum und

können Xylose nicht oder nur sehr schlecht verwerten. Über 60% aller Hefen können Xylose nur aerob verwerten (Barnett, 1976). Erste Erfolge, mit Hefen Xylose zu vergären, wurden erzielt, als entdeckt wurde, daß viele Hefen Xylulose, das Ketoisomer von Xylose, zu Ethanol abbauen können (Wang et al., 1980a; Chiang et al., 1981; Gong et al., 1981a und 1983; Jeffries, 1981). Da das Enzym Xyloseisomerase zu diesem Zeitpunkt bereits in großen Mengen produziert wurde, wurde der Xyloseabbau zu Ethanol in zweistufigen Prozessen mit Xyloseisomerisierung und Fermentation von mehreren Arbeitsgruppen entwickelt (Wang et al., 1980b; Chiang et al., 1981; Suihko und Poutanen, 1984). Mit diesem Verfahren konnten Ethanolkonzentrationen bis zu 6,3% (w/v) aus 150 g/l Zucker erzielt werden, das entspricht einer Ausbeute von 80% (Chiang et al., 1981). In erneuten Screeningverfahren wurden Hefen gefunden die Xylose direkt zu Ethanol vergären können. Zu diesen Organismen gehören *Pachysolen tannophilus* (Schneider et al., 1981; Slininger et al., 1982), *Candida tropicalis* (Jeffries, 1981), *Candida shehatae* (du Preez und van der Walt, 1983) und *Pichia stipitis* (Toivola et al., 1984). Diese Organismen benötigen für die Umsetzung von Xylose zu Ethanol geringe Mengen an Sauerstoff (du Preez und van der Walt, 1983; Dellweg et al., 1982). Unter strikt anaeroben Bedingungen sind Wachstum und Alkoholbildung stark beeinträchtigt, und bis zu 80% der Xylose werden als Xylitol ausgeschieden (Dellweg et al., 1982). Die Ursache für diesen Sauerstoffeffekt liegt in der Coenzym-Spezifität der Enzyme des Xylosemetabolismus. Bruinenberg et al. (1983a) konnten zeigen, daß der Abbau von Xylose über die NADPH-abhängige Xylosereduktase und NAD-abhängige Xylitol-Dehydrogenase unter anaeroben Bedingungen zu einer Überproduktion an NADH führt, wodurch die Stoffwechselaktivität blockiert wird. In Gegenwart von Sauerstoff wird NAD über die Elektronentransportkette regeneriert. In weiteren Screeningverfahren wurden Stämme isoliert, bei denen die Xylosereduktase und Xylitol-Dehydrogenase die gleiche Coenzym-Spezifität besitzen (Toivola et al., 1984; du Preez und Prior, 1985; Parekh und Wayman, 1986). Mit diesen Organismen wird Xylose mit 75-90% Ausbeute zu Ethanol abgebaut (du Preez und Prior, 1985; du Preez et al., 1986; Parekh und Wayman, 1986; Woods und Millis, 1985).

Im Vergleich zu den Hefen haben Bakterien ein breites Substratspektrum, und können neben Hexosen und Pentosen, Disaccharide wie Cellobiose und Lactose, Stärke und Xylan verwerten. Einige Clostridien-Arten besitzen Cellulasen und Xylanasen. Mesophile Bakterien wie *Sarcina ventriculi* und *Bacillus macerans* vergären Pentosen wie Arabinose und Xylose zu Ethanol und Acetat (Finn et al., 1984; Schepers et al., 1987). Eine definierte Mischkultur aus *Clostridium saccharolyticum* und *Zymomonas anaerobia* kann Mischungen aus Glucose, Cellobiose und Xylose, wie sie in hydrolisierten cellulosehaltigen Materialien vorkommen, zu Ethanol und Acetat abbauen (Asther und Khan, 1984 und 1985). Weitere anaerobe Pentoseverwerter sind z.B. *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymixa* und *Clostridium acetobutylicum* (Gong et al., 1981b).

Bedeutung beim Abbau von Xylose zu Ethanol kommt thermophilen Bakterien zu. Zu den Organismen, die signifikante Mengen an Alkohol bilden, gehören *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobium brockii* und *Bacillus stearothermophilus* (Wiegel et al., 1979; Wiegel und Ljungdahl, 1981; Avgerinos et al., 1981; Zeikus et al., 1979). Die Ethanolproduktion mit thermophilen Bakterien bietet eine Reihe von Vorteilen (Wiegel, 1980; Payton, 1984):

- Hohe Temperaturen erleichtern die Produktgewinnung. Bereits durch ein geringes Vakuum oder durch einen inerten Gasstrom können leicht flüchtige Fermentationsprodukte wie Ethanol kontinuierlich aus dem Medium entfernt werden, wodurch gleichzeitig die hemmende Wirkung des Ethanol auf das Wachstum umgangen wird.
- Durch eine geringere Sauerstofflöslichkeit bei hohen Temperaturen können anaerobe Bedingungen leichter hergestellt und erhalten werden.
- Hohe Produktausbeuten und wenig Biomassebildung.
- Geringere Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen.

Da im Allgemeinen höhere Temperaturen die chemischen und enzymatischen Reaktionen beschleunigen, wurde von den thermophilen Bakterien erhöhte Wachstums- und Produktbildungsrate erwartet. Thermophile Bakterien haben zwar eine spezifische Wachstumsrate die 1-10 mal schneller ist als die mesophiler Bakterien, die Ethanolbildungsrate bleiben aber mit 0,2 bis 0,8 g Ethanol/g TG·h zum Teil weit hinter denen mesophiler Ethanolproduzenten wie *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* mit 0,5 bis 5 g Ethanol/g TG·h zurück (Sonnleitner und Fiechter, 1983). Die Ethanolbildung durch thermophile Bakterien wird durch zwei Faktoren bestimmt. Der erste Faktor ist die mangelnde Ethanoltoleranz der Bakterien. Thermophile Bakterien wie *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* und *Thermoanaerobacter ethanolicus* werden bereits durch 1 Vol.% Ethanol gehemmt (Zeikus et al., 1979; Avgerinos et al., 1981; Lovitt et al., 1984; Wiegel und Ljungdahl, 1981). Im Vergleich dazu tolerieren *Zymomonas mobilis* und Hefen bis zu 14 % Ethanol (Herrero, 1983). Durch Mutation und Selektion ist auch bei thermophilen Bakterien in mehreren Fällen die Ethanoltoleranz auf bis zu 10 Vol.% erhöht worden (Avgerinos et al., 1981; Carreira et al., 1982; Mancuso, 1982). Der zweite Faktor, der die Ethanolbildung beeinflusst, ist der Kohlenstoff- und Elektronenfluß in den Bakterien. Der Xyloseabbauweg in thermophilen anaeroben Bakterien ist nur teilweise aufgeklärt. Es wird angenommen, daß Xylose zunächst zu Xylulose isomerisiert, anschließend zu Xylulose-5-Phosphat aktiviert und über den nicht-oxidativen Pentosephosphatweg zu Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat abgebaut wird (siehe Abb.1; Zeikus et al., 1981; Zeikus, 1985). Der weitere Abbau zu Pyruvat, dem zentralen Metaboliten im Stoffwechsel von Ethanolbildnern, erfolgt über Reaktionen der Glykolyse (Lee und Ordal, 1967; Lamed und Zeikus, 1980b; Wiegel, 1980;). In *Zymomonas mobilis* und Hefen wird Pyruvat direkt zu Acetaldehyd decarboxyliert. Die hierfür verantwortliche Pyruvatdecarboxylase gilt als das Schlüsselenzym für hohe Ethanolausbeuten. In thermophilen Bakterien ist das Haupthindernis für gute Ethanolausbeuten die Möglichkeit von Pyruvat aus verschiedene Endprodukte zu bilden. So kann Pyruvat entweder zu L-Lactat reduziert, oder oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert werden. Hier spalten sich die Wege in

Richtung Ethanol- und Acetatbildung, wobei ATP regeneriert wird. Das Verhältnis der Endprodukte zueinander wird durch Faktoren wie Substrat- und Produktkonzentrationen und Medienzusammensetzung bestimmt. Insbesondere die Substratkonzentration beeinflusst die Zusammensetzung der Endprodukte, wobei sich durch steigende Substratkonzentrationen die Ethanolausbeute verschlechtert (Murray und Khan, 1983; Carreira und Ljungdahl, 1983b; Brener und Johnson, 1984).

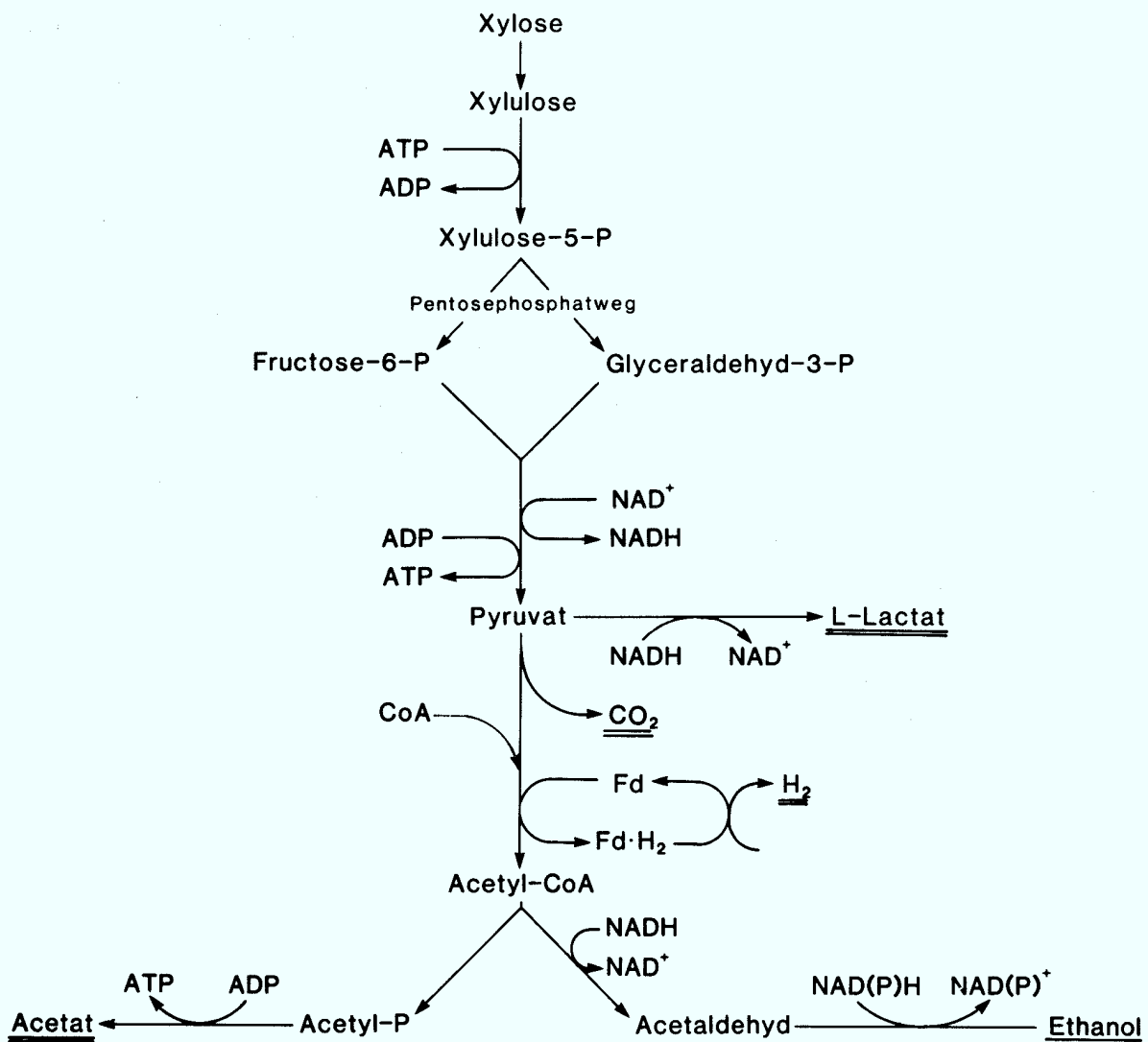


Abb.1: Xyloseabbauweg anaerober thermophiler Bakterien
(nach Zeikus et al., 1981)

Von *T. finnii* sind bisher nur einzelne Schritte im Xylosemetabolismus, wie die Transaldolase als Markerenzym des Pentosephosphatweges, die Lactat-Dehydrogenase und die Alkohol-Dehydrogenase untersucht worden (Schmid, 1984). Die Lactat-Dehydrogenase wird durch FDP aktiviert, wie es bereits schon für die Lactat-Dehydrogenasen von anderen thermophilen Bakterien beschrieben worden ist (Lamed und Zeikus, 1980b; Ben-Bassat, 1980; Carreira et al., 1982; Freier, 1984; Germain et al., 1986).

T. finnii besitzt sowohl eine NADH- als auch NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität, wobei die NADH-abhängige Aktivität nur ca 10% der NADPH-abhängigen Aktivität ausmacht. Beide zeigen eine viel größere Aktivität gegenüber sekundären Alkoholen wie 2-Propanol oder 2-Butanol als gegenüber Ethanol oder Acetaldehyd (Schmid, 1984).

Von Schoberth wurde vor einigen Jahren aus methanbildenden thermophilen Pellets das Eubakterium *AKO-1* isoliert (Sprey et al., 1982). Es handelt sich hierbei um ein strikt anaerobes, sporenbildendes, Gram-variables Stäbchen mit einem Temperaturmaximum bei 72°C. In physiologischen Eigenschaften wie Substrat- und Produktspektrum unterscheidet es sich kaum von den thermophilen Stämmen *Thermoanaerobacter ethanolicus* und *Thermoanaerobium brockii*. Die Klassifizierung dieses Neuisolates wurde in dieser Arbeit durchgeführt. Der Stamm wurde in die Gattung *Thermoanaerobacter* eingeordnet.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Vergärung von Xylose durch *Thermoanaerobacter finnii* im Hinblick auf Substratkonzentrationen und Endproduktzusammensetzung untersucht werden, insbesondere die Regulation der Lactatbildung. Durch Abzug des Alkohols aus dem Kulturmedium sollte die geringe Ethanoltoleranz dieses Organismus umgangen werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen wurden mit folgenden Bakterienstämmen durchgeführt:

Thermoanaerobacter finnii (AKO-1) DSM 3389

Thermoanaerobacter ethanolicus DSM 2246

Thermoanaerobium brockii DSM 1457

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem mit *Thermoanaerobacter finnii* DSM 3389 gearbeitet, das von Schoberth aus Pellets einer anaeroben Anreicherungskultur, die Essigsäure zu Methan umsetzte, isoliert worden ist (Sprey et al., 1982). Die beiden anderen Stämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen in Göttingen bezogen.

2. Nährmedien

Medium I (nach Wiegel et al., 1979, modifiziert)

KH ₂ PO ₄	1,5	g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	4,2	g
NH ₄ CL	0,5	g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,18	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13	g
Na-Thioglycolat	0,5	g
Hefeextrakt (Difco)	2,0	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,5	mg
Resazurin (0,1 % w/v)	1,0	ml
Spurenlösung I	5,0	ml
Spurenlösung II	0,1	ml
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml
pH 7,2 mit konz. NaOH einstellen		

Spurenlösung I (Wolfe's Mineral Solution)

MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,475 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,17 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,05 g
ZnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,18 g
HBO ₃	0,03 g
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,08 g
HCl konz.	1 Tropfen
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

Spurenlösung II

Na ₂ SeO ₃	1,7 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,4 g
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

Anzuchtmedium

Das Medium enthält alle Komponenten wie Medium I, nur die Hefeextraktkonzentration wurde auf 6 g/l erhöht.

Fermentationsmedium (Abänderungen nach Mancuso, 1982)

KH ₂ PO ₄	0,75 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
NH ₄ Cl	0,5 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13 g
Na-Thioglycolat	0,5 g
Hefeextrakt (Difco)	6,0 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,5 mg
Resazurin (0,1 % w/v)	1,0 ml
Spurenlösung I	5,0 ml
Spurenlösung II	0,1 ml
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
pH 7,2 mit wenig konz. NaOH einstellen	

Hefeextrakt-Lösung für die Fed-Batch-Fermentationen

(Mancuso, 1982)

Hefeextrakt (Difco)	10,0	g
NH ₄ Cl	0,5	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	10,0	mg
H ₂ O bidest	ad 50	ml

Die Herstellung der Nährmedien und die Kultivierung der Organismen erfolgte nach einer modifizierten Hungate-Technik (Hungate, 1950). 10 ml Kulturen wurden in Bellco-Röhrchen (18 x 142 mm, Fa. Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey), verschlossen mit Butylgummistopfen und Aluminiumkappen, gezüchtet. Versuche mit 100 und 500-1000 ml-Kulturen erfolgten in Glaskolben (270 bzw. 2000 ml Gesamtvolumen; hergestellt in der Glasbläserei der KFA Jülich) mit zwei Öffnungen, die ebenfalls mit Gummistopfen und Aluminiumkappen verschlossen wurden.

In die Glasgefäße wurde frisch zubereitetes Medium ohne C-Quelle gegeben und 10-15 min in einem Wasserbad aufgeköcht, um den gelösten Sauerstoff auszutreiben. Anschließend wurden die Kulturgefäße in einem Eisbad, unter gleichzeitiger Begasung mit Argon, abgekühlt, das zur Eliminierung letzter Sauerstoffreste über heiße Kupferspäne (350 °C) geleitet wurde. Die abgekühlten Kulturgefäße wurden nun verschlossen, und für 20 min bei 121 °C sterilisiert.

Für Massenanzuchten wurde als Kulturgefäß eine 10 l- Flasche mit Gummistopfen verwendet. Der Gummistopfen enthielt Bohrungen für ein Ernterohr und ein Gaszufuhr-bzw.-ableitungsrohr. Das Medium wurde aerob eingefüllt, 35 min autoklaviert und anschließend unter Argonbegasung, über einen Wattefilter, abgekühlt. War das Medium nach dem Abkühlen noch nicht vollends reduziert, wurden steril wenige Körnchen Na-Dithionit zugegeben. Die separat dem Medium zuzusetzenden Lösungen wurden durch Evakuieren mittels einer Wasserstrahlpumpe und anschließendem Begasen mit Argon anaerobisiert, bevor sie autoklaviert und dem Medium mit sterilen Spritzen (Braun, Melsungen) zugesetzt wurden.

3. Anzucht und Kulturbedingungen

3.1. Stammhaltung

Alle 2 - 4 Wochen wurde *T. finnii* in 0,5 % (w/v) xylosehaltiges Medium I, *T. ethanolicus* und *Ta. brockii* in 0,5 % (w/v) glucosehaltiges Medium I überimpft, für 16 h bei 69 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Für längere Aufbewahrungszeiten wurden 1 ml einer exponentiell wachsenden Kultur zu 1 ml sterilem Glycerin in anaeroben Kulturröhrchen gegeben und bei - 18 °C aufbewahrt. Diese Kulturen waren mindestens ein halbes Jahr haltbar.

Die Reinheitskontrolle erfolgte mit einem Zeiss Phasenkontrastmikroskop, oder durch Bestimmung der Endprodukte.

3.2. Kultivierung unter pH-statisierten Bedingungen

Für pH-statische Batch- und Fed-Batch-Fermentationen wurde ein Glasgefäß mit einem Gesamtvolumen von 1,65 l (Herstellung durch die Glasbläserei der KFA Jülich) mit einem Temperiermantel und 8 Öffnungen an der Oberseite, sowie einer seitlichen Öffnung, verwendet. Das Gefäß wurde mit 1 l Fermentationsmedium autoklaviert (25 min, 121 °C) und während des Abkühlens auf 69 °C über einen sterilen Wattefilter mit Argon begast. Die Abluft wurde über einen Rückflußkühler, der mit -4°C kaltem Glycerin-Wasser-Gemisch (1:1) gekühlt wurde, geleitet, um den in der Gasphase befindlichen Alkohol zu kondensieren. Die pH-Regelung bei pH 7,2 (pH-Elektrode der Fa. Ingold AG, Frankfurt; pH-Meter und pH-Regler der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) erfolgte durch Zudosieren von steriler 5 N NaOH. Die Kultur wurde mit einem Magnetrührer bei 75 Upm gerührt. Xylose wurde separat anaerobisiert und sterilisiert und mittels einer Plastikspritze in den Fermenter gegeben. Die Kultur wurde mit 10 % (v/v) Inokulum einer Vorkultur, die sich in der exponentiellen Phase befand, angeimpft. Die Probenentnahme erfolgte mit sterilen Spritzen durch Entnahme von ca 5 ml Kultur über die seitliche Öffnung, die mit einem Gummistopfen verschlossen war. Bei den Fed-Batch-Fermentationen wurde 50%-ige (w/v) Xylose-Lösung und

Hefeextraktlösung (5 ml Hefeextrakt-Lösung pro 5 g zugefütterter Xylose) mittels steriler Plastikspritzen zugegeben.

3.3. Fed-Batch-Fermentation im 6 l Bioengineering-Fermenter

Für Fermentationen mit 5-6 l Arbeitsvolumen wurde ein Fermenter der Fa. Bioengineering AG (Wald, Schweiz) mit 6 l Arbeitsvolumen verwendet. Der Fermenter wurde mit Medium ohne C-Quelle in-situ sterilisiert (20 min, 121 °C) und während des Abkühlens auf Betriebstemperatur (68 °C), sowie während der Fermentation über einen Sterilfilter mit Argon begast. Xylose wurde vor dem Animpfen steril zugegeben. Der pH-Wert wurde durch automatische Zudosierung von 5 N NaOH auf pH 7,2 ± 0,1 konstant gehalten. Die Kultur wurde mit 120 Upm gerührt. Als Inokulum wurde 0,5 l Vor-kultur (exponentielle Phase) verwendet. Xylose-Lösung und Hefeextrakt-Lösung (5 ml pro 5 g zugefütterte Xylose) wurde steril mit Spritzen über ein Septum zugegeben.

3.4. Wachstum in pH-statisierter Fed-Batch-Kultur mit kontinuierlichem Alkoholabzug (Strip-Destillation)

Für die Fermentationen mit kontinuierlichem Alkoholabzug wurde oben beschriebener 1,65 l-Glasfermenter mit 1 l Arbeitsvolumen benutzt. Durch einen Gasstrom (Argon) wurde der bei 69°C in die Gasphase übergegangene Alkohol aus dem Fermenter entfernt. Der Gasstrom wurde über eine Claisenbrücke und einen Intensivrückflußkühler geleitet. Der kondensierte Alkohol wurde in einem Rundkolben aufgefangen. Der Aufbau der Versuchsanlage ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Für die Berechnung der Gesamtethanolmenge wurde das Volumen und die Konzentration des Ethanol-Wasser-Gemisches bestimmt und auf 1 l Fermentervolumen umgerechnet.

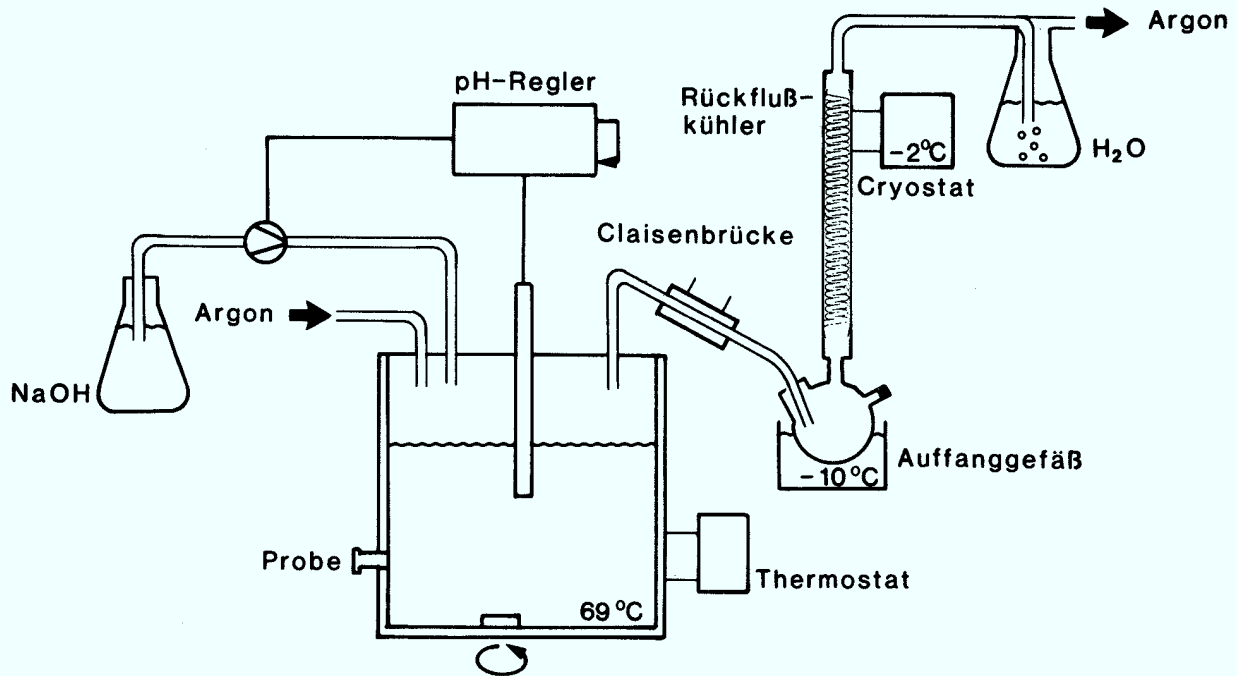


Abb.2: Versuchsaufbau zu den Fermentationen mit kontinuierlichem Alkoholabzug

3.5. Kontinuierliche Fermentation

Die kontinuierlichen Kulturen wurden in einem in-situ sterilisierbaren 1,6 l Kleinfermenter der Fa. Bioengineering AG (Wald, Schweiz) mit 1,3 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Die Betriebstemperatur betrug 68 °C, die Rührung erfolgte bei 130 Upm und der pH wurde durch Zudosierung von 5 N NaOH auf $7,1 \pm 0,1$ konstant gehalten. Die Durchflußrate $D(h^{-1})$ wurde über die Zuflußgeschwindigkeit des Nährmediums (Fermentationsmedium) geregelt. Frisches Medium wurde über eine Membranpumpe (Typ FE211, Fa. Braun, Melsungen) aus 20 l- Vorratsgefäßen in den Fermenter gepumpt. Das Kulturvolumen wurde durch ein Überlaufrohr, das mit einer Schlauchpumpe verbunden war, konstant gehalten. Die abgepumpte Flüssigkeit wurde in sterilen Gefäßen aufgefangen.

4. Versuchsbedingungen mit konzentrierten Zellsuspensionen

1 l Kulturen (OD_{600nm} ca. 0,8-0,9) wurden steril und anaerob in einer Beckmann J21 C Zentrifuge bei 6000 x g abzentrifugiert, ein mal mit anaeroben 0,1 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und in ca 50 ml Anzuchtmedium mit 10 bzw. 30 g/l Xylose suspendiert und in 250 ml Kolben bei 69 °C im Wasserbad inkubiert. Der pH wurde durch Zugabe von steriler 2 N NaOH auf $pH\ 7,2 \pm 0,3$ konstant gehalten.

5. Bestimmung des Bakterienwachstums

Trübungsmessung

Die Trübungsmessungen von 10 ml Kulturen erfolgten direkt in einem Spektralphotometer Spectronic 88 (Fa. Bausch & Lomb, Rochester, New York) bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Die Trübungsmessung von 100-1000 ml Kulturen, sowie den Fermenterkulturen erfolgte in einem Beckmann Spektralphotometer Modell 35 (Beckmann Instruments Inc., Fullerton, Kalifornien) bei 600 nm gegen H_2O bidest. Bei Zelldichten über 0,3 wurde mit H_2O bidest entsprechend verdünnt.

Trockengewichtsbestimmung

30-50 ml Kultur wurden 15 min bei 6000 x g abzentrifugiert (Minifuge 2 von Heraeus Christ GmbH, Osterode) und das Pellet zweimal mit H_2O bidest gewaschen. Die Zellen wurden dann in ca 2 ml H_2O bidest suspendiert und in vorgetrocknete Aluminiumschälchen pipettiert. Nach dem Trocknen für 12 h bei 105 ° und dem Abkühlen im Exsikkator wurde die Gewichts Differenz bestimmt.

6. Analytik der Fermentationsprodukte

Nachweis von Ethanol und Acetat mittels Gaschromatographie

Die von *T. finnii* gebildeten Endprodukte Ethanol und Acetat wurden mit einem Gaschromatographen der Fa. Hewlett Packard (USA), Typ 5840 A mit Flammenionisationsdetektor, angeschlossenem Automatic Sampler, Typ 7672 A quantitativ bestimmt. Die Analysenbedingungen waren:

Säule: Porapak QS 80-100 mesh, $\frac{1}{4}$ inch x 91,5 cm
 Säulentemperatur: 135 °C (isotherm)
 Trägergas: Stickstoff (30 ml/min)
 FID-Temperatur: 230 °C
 Einspritzblock: 250 °C, mit auswechselbarem Glasinlet
 Probevolumen: 1 μ l
 Retentionszeiten: Ethanol ca 0,8 min
 Acetat ca 2,5 min

Probenvorbereitung

Die Kulturproben wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 3 min abzentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes zusammen mit 0,5 ml Interner Standard-Lösung (100 ml 0,2 N HCl + 0,2 ml Methanol) in die Probegefäße gegeben.

Die Eichung erfolgte mittels einer Eichlösung bestehend aus 20 mM Acetat und 17,15 mM Ethanol.

L-Lactat-Bestimmung (nach Gutmann und Wahlefeld, 1974)

L-Lactat wurde enzymatisch in einem optischen Test mittels einer L-Lactat-Dehydrogenase (aus Kaninchenmuskel) bestimmt. Damit die Reaktion von L-Lactat zu Pyruvat ablaufen kann, wurden Pyruvat und die entstehenden H⁺-Ionen aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, was mittels des Glycin-Hydrazin-Puffers pH 9 erreicht wurde. Pyruvat wurde als Hydrazon und die H⁺-Ionen durch das alkalische Milieu abgefangen.

Glycin-Hydrazin-Puffer: 22,8 g Glycin
 50 ml Hydrazinhydrat 24%
 550 ml H₂O bidest
 mit wenig konz. NaOH auf pH 9 einstellen

Bestimmungsansatz:

0,75 ml Glycin-Hydrazin-Puffer pH 9
 0,05 ml 42 mM NAD-Lösung
 0,05 ml Probe
 bzw. bei Leerwert H₂O
 bzw. Standard-Lösung (0,12 g L-Lactat/l)

Nach Mischen wurde die Extinktion 1 bei 340 nm in Halbmikro-Plastikküvetten in einem Beckmann Spektralphotometer bestimmt. Zu dieser Mischung wurde 0,005 ml L-LDH-Suspension (Kristallsuspension, 5 mg/ml) zugegeben, gemischt und für 50-60 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Extinktion 2 bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel, wobei ΔE , die Differenz zwischen Extinktion 1 und Extinktion 2 ist, korrigiert um den ΔE -Wert des Leerwertes, $\epsilon_{\text{NAD}} = 6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und die Schichtdicke 1 cm beträgt:

$$\text{Lactatkonzentration in g/l} = \frac{\text{Gesamtvolumen} \times 90,1 \times \Delta E}{\epsilon \times 1 \text{ cm} \times 0,05 \text{ ml} \times 1000}$$

Bestimmung des Restzuckergehaltes in Kulturfiltraten

a) Dinitrosalicylsäure-Methode nach Miller (1959)

Mit diesem Test wurden reduzierende Zucker in Kulturfiltraten nachgewiesen.

DNS-Reagenz: 1 g 3,5-Dinitrosalicylsäure
 in 20 ml 2 N NaOH lösen
 50 ml H₂O bidest
 30 g K-Na-Tartrat
 ad 100 ml H₂O bidest

0,5 ml Probe wurden mit 0,5 ml DNS-Reagenz versetzt, 10 min in kochendem Wasser erhitzt und anschließend 10 min im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 5,5 ml H₂O bidest wurde bei 546 nm in einem Eppendorf Photometer gegen eine Blindprobe gemessen, die anstelle des Kulturfiltrates Wasser enthielt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die für Xylosekonzentrationen von 0,2-2 mg/ml erstellt worden war.

b) Zuckernachweis mit Hilfe eines Zuckeranalysators

Mit dem Zuckeranalysator Biotronic LC 2000 werden oxidierbare Zucker nach Voelter et al. (1974) an einem stark basischen Ionenaustauscher getrennt und mit Cu-Bicinchoninat zu einem Farbstoff umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch gemessen wird. Die Durchführung erfolgte wie in der Firmenvorschrift angegeben. Die Elution erfolgte mit 0,2 M Kalium-Borat-Puffer pH 8,15 (60 min) und 0,4 M Kalium-Borat-Puffer pH 9,45 (120 min).

Der Zuckernachweis mit dem Biotronik-Zuckeranalysator ZA 5100 erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Die Elution erfolgte mit 0,2 M Kalium-Borat-Puffer pH 8,15 (30 min) und 0,7 M Kalium-Borat-Puffer pH 9,45 (60 min). Die aufgetrennten Zucker wurden mit Orcin-Schwefelsäure-Reagenz zu Furfural-/Orcinol-Komplexen umgesetzt, und die Konzentration photometrisch bestimmt.

7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

7.1. Herstellung von Rohextrakten

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohextrakten von *T. finnis* wurden Zellen in 10 l Flaschen angezogen und in der späten exponentiellen Phase oder frühen stationären Phase unter anaeroben Bedingungen durch Zentrifugation bei 6000 rpm in einer Beckmann Kühlzentrifuge Modell J-21C sedimentiert. Das Zellmaterial wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluß erfolgte jeweils am gleichen Tag wie die Enzymbestimmungen. Der Aufschluß wurde unter anaeroben Bedingungen (nach Giesel, 1982) durchgeführt: 0,4 g Bakterienfeuchtmasse wurden zunächst anaerob 1 x mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und in einer Heraeus-Christ-Kühlzentrifuge bei 6000 rpm, 10 min abzentrifugiert.

Die gewaschenen Zellen wurden mit 1,6 ml Lysepuffer für 20-30 min bei 35 °C inkubiert. Der Lysegrad wurde mikroskopisch kontrolliert.

Lysepuffer:	10	ml	0,1 M KPP, pH 7,0
	16	mg	Lysozym (= 350000 U)
	1,6	mg	DNase (= 3200 U)

Für zellfreie Extrakte wurde das Lysat abzentrifugiert (Heraeus-Christ-Kühlzentrifuge, 6000 rpm, 10 min).

Für die Bestimmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität wurde der Lyseansatz mit 10 mM KPP pH 7,0 durchgeführt (nach Rudolph et al., 1968). Ansonsten wurde wie oben beschrieben vorgefahren.

Für einige enzymkinetische Messungen wurde entsalzter Rohextrakt verwendet. Hierzu wurde 5 ml Rohextrakt auf eine Säule (1,5 cm Durchmesser) mit Polyacrylamidgel (P-6DG) mit einer Ausschlußgrenze von 1000-6000 daltons gegeben, die mit 200 ml 0,1 M KPP pH 7 äquilibriert worden war. Das Gesamtvolumen der Säule betrug 19,4 ml, das Elutionsvolumen 5,6 ml. Die Eichung erfolgte mit 5 ml Dextran-Blau 2000 (1 mg/ml, filtriert). Die Proteinlösung wurde um den Faktor 1,12 verdünnt.

7.2. Biuret-Proteinbestimmung (Gornall et al., 1949)

Diese Methode ist für Proteinbestimmungen in Proben mit 1-10 mg Protein/ml geeignet. Zu 0,1 ml Probe wurden 1,9 ml H₂O bidest gegeben, mit 1 ml 3 N NaOH versetzt, 5 min in einem kochendem Wasserbad erhitzt, und unter fließendem kaltem Wasser abgekühlt. Zu diesem Ansatz wurde 1 ml einer 2,5 %-igen (w/v) Kupfersulfatlösung gegeben, 5 min stehengelassen und dann abzen-

trifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 546 nm gegenüber einem Blindwert mit H₂O statt der Proteinlösung in einem Photometer der Fa. Eppendorf (Photometer M 1101) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit Rinderserumalbumin für den Bereich 2-8 mg Gesamtprotein erstellt worden war.

7.3. Anaerobe Testbedingungen

Pufferlösungen wurden in mit Gummistopfen verschlossenen Saugflaschen anaerobisiert. Sie wurden unter Rühren etwa 20 min lang abwechselnd mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und mit Argon begast. Für den enzymatischen Test in der Küvette, wurden die gefüllten Küvetten mit einem Gummistopfen verschlossen, durch die eine Kanüle gebohrt wurde. Unter Klopfen wurde die Küvette etwa 10 min lang abwechselnd evakuiert und begast. Sämtliche bei den Tests verwendeten Reagenzien wurden nach obigem Verfahren in mit Septen verschlossenen Rollfläschchen sauerstofffrei gemacht. Restsauerstoff aus Pufferlösungen und Testansatz wurde mit Hilfe des GGK-Systems (Glucose-Glucoseoxidase-Katalase) entfernt (Bühler, 1981). Glucose, Glucoseoxidase und Katalase reagieren mit O₂ nach folgender Gleichung:



während eines Reaktionscyclus' wird pro mol Glucose ein halbes mol O₂ verbraucht.

Zu je 20 ml Pufferlösung, die nach obiger Methode bereits vorbehandelt war, wurde zugesetzt:

300	mg	D-Glucose (= 83 mM in Puffer)
0,02	ml	Katalase (20 mg/ml = 750 U/ml Puffer)
0,02	ml	Glucoseoxidase (24 mg/ml = 5 U/ml Puffer)

In den nachfolgenden Enzymbestimmungen sind die Testansätze mit GGK bezeichnet, in denen dieses sauerstoffabfangende System enthalten ist.

Rohextrakt und Reagenzien wurden in die bereits anaerobisierten

Küvetten mittels gasdichten Mikroliterspritzen (Fa. Hamilton, Darmstadt) gegeben, die zuvor mit Argon gespült worden waren. Vor Reaktionsstart wurden die Küvetten jeweils für 5-10 min thermoäquilibriert.

Die nachfolgend beschriebenen Bestimmungen wurden an einem Eppendorf Photometer 1101 M mit Küvettenwechselautomat 2705 und einem Eppendorf Kompensationsschreiber 6512 durchgeführt. Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei 40 °C und 365 nm. Zur Berechnung der Enzymaktivitäten wurde für NADH ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 3,41 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für NADPH von $\epsilon = 3,42 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zugrundegelegt (Bergmeyer, 1975). Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als die Menge Enzym, die die Bildung bzw. den Verbrauch von 1 μmol Produkt bzw. Substrat pro Minute katalysiert. Die spezifische Aktivität ist definiert als die Anzahl von Enzymeinheiten pro mg Protein.

7.4. Testansätze

Xyloseisomerase

Die Aktivität der Xyloseisomerase wurde nach Yamanaka(1966) bestimmt. Da Xylose bei der Bestimmung der gebildeten Xylulosemenge stört, wurde jeweils ein Ansatz ohne Rohextrakt zur Bestimmung des Blindwertes mitgeführt.

Reaktionsansatz:		Konz. im Test in mM
0,50 ml	50 mM Maleat/NaOH pH 6,8	33
0,05 ml	10 mM MnCl_2 oder CoCl_2 oder MgCl_2	0,66
0,10 ml	100 mM Xylose	13,3
0,05 ml	Rohextrakt	
ad 0,75 ml	H_2O bidest	

Nach 10 min Inkubation bei 60-85 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml 50%(w/v) Trichloressigsäure abgestoppt. Nach

Abkühlen der Probe im Eisbad wurde das gefällte Protein abzentrifugiert. Die gebildete Xylulosemenge wurde mit der Cystein-Carbazol-Methode von Dische und Borenfreund (1951) bestimmt. Dafür wurde 0,5 ml Probe mit 0,1 ml 1,5%(w/v) Cystein-HCl (frisch angesetzt), 3 ml 12 M H₂SO₄ und 0,1 ml 0,12%(w/v) Carbazol (in absolutem Ethanol gelöst) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde die Extinktion der Lösung gegen einen Leerwert ohne Xylulose bei 560 nm gemessen. Die gebildete Xylulosemenge wurde über eine Eichkurve mit 0,1 - 1 µmol/ml Xylulose ermittelt (Abb.3).

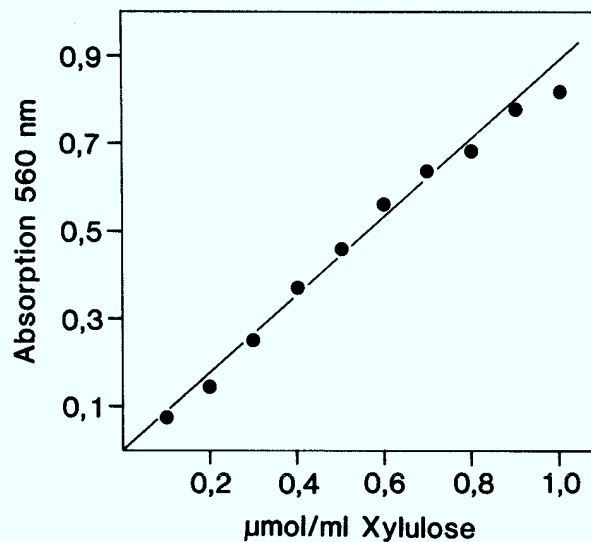


Abb.3: Eichgerade zur Bestimmung von Xylulose im Testansatz

Xylulosekinase

Der Test erfolgte nach der Methode von Neuberger(1981), indem das Reaktionsprodukt ADP über Hilfsenzyme und NADH-Oxidation nachgewiesen wurde. Störende ATPase-Aktivitäten wurden in Parallelansätzen ohne Xylulose bestimmt und von den Testansätzen mit Xylulose subtrahiert. Die Messung erfolgte bei 365 nm, 40 °C und unter anaeroben Bedingungen.

Testansatz:		Konz. im Test in mM
0,800 ml	50 mM Tris-HCl pH 7,9	44
	50 mM KCl	44
	1 mM EDTA	0,9
0,01 ml	500 mM MgCl ₂	5,5
0,01 ml	50 mM ATP	0,55
0,01 ml	100 mM Phosphoenolpyruvat	1,1
0,01 ml	100 mM Dithiothreitol	1,1
0,01 ml	33 mM NADH	0,36
0,03 ml	30 mM Xylulose	1,0
0,01 ml	L-Lactat-Dehydrogenase / Pyruvatkinase (1:5 verd.)	1,2 U 1,1 U
0,01 ml	Rohextrakt	

Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Methode von Lamed und Zeikus (1980a), bei 40 °C und unter anaeroben Bedingungen.

Testansatz:		Konz. im Test in mM
0,900 ml	100 mM Tricin pH 8,1	92
	2 mM Dithiothreitol	1,8
0,02 ml	700 mM Na-Arsenat	14,3
0,01 ml	500 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat	5,1
0,01 ml	200 mM Fructose-1,6-diphosphat	2,05
0,02 ml	50 mM NAD	1,02
0,01 ml	Aldolase (90 U/ml)	0,9 U
0,005 ml	Rohextrakt	

Phosphofruktokinase

Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von Bruinenberg (1983b), bei 40 °C und unter anaeroben Bedingungen.

Testansatz:			Konz.im Test in mM
0,90	ml	50 mM Tris-HCl pH 7,5	47
		0,2mM Dithiothreitol	0,2
		5 mM MgCl ₂	4,7
0,01	ml	25 mM NADH	0,26
0,01	ml	200 mM Fructose-6-phosphat	2,1
0,01	ml	15 mM ATP	0,15
0,01	ml	FDP-Aldolase (90 U/ml)	0,9 U
0,01	ml	GDH/TIM-Suspension	1,7 U / 5 U
0,01	ml	Rohextrakt	

Pyruvatkinase

Die Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Lamed und Zeikus (1980a) bei 40 °C und unter anaeroben Bedingungen.

Testansatz:			Konz.im Test in mM
0,90	ml	100 mM Tris-HCl pH 7,5	94
		15 mM MgCl ₂	14
		10 mM KCl	9,4
		1 mM Dithiothreitol	0,9
0,02	ml	250 mM ADP	5,2
0,01	ml	100 mM Phosphoenolpyruvat	1,0
0,01	ml	25 mM NADH	0,3
0,01	ml	L-Lactat-Dehydrogenase (1:5 verd.)	5,5 U
0,01	ml	Rohextrakt	

Acetatkinase

Beide Richtungen, der von der Acetatkinase katalysierten Reaktion, wurden für die Bestimmung der Enzymaktivität nach Lamed und Zeikus (1980a) gemessen.

a) Acetyl-phosphat nach Acetat

Das in der Reaktion gebildete ATP wurde im optischen Test durch Umsetzung von Glucose zu Glucose-6-phosphat und anschließender Oxidation zu Gluconat-6-phosphat mit NADP kontinuierlich bei 40°C und unter anaeroben Bedingungen gemessen.

Testansatz	Konz.im Test in mM
0,90 ml 100 mM Tris-HCl pH 7,2	91
3 mM MgCl ₂	2,7
0,01 ml 200 mM Glucose	2,0
0,02 ml 25 mM NADP	0,5
0,02 ml 100 mM ADP	2,0
0,01 ml 400 mM Acetyl-P	4,0
0,02 ml 1:2 Mischung aus Hexokinase	2 U
Glucose-6-P-Dehydrogenase	2 U
0,01 ml Rohextrakt	

b) Acetat nach Acetyl-phosphat

Die Bildung von ADP wurde durch die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und Reduktion von Pyruvat mit NADH zu L-Lactat im kontinuierlichen Test bei 40 °C verfolgt.

Testansatz	Konz.im Test in mM
0,90 ml 100 mM Tris-HCl ph 7,9	93
40 mM MgCL ₂	37
0,01 ml 200 mM ATP	2,1
0,01 ml 100 mM Phosphoenolpyruvat	1,0
0,01 ml 25 mM NADH	0,3
0,02 ml 1000 mM K-Acetat	20,7
0,015 ml Pyruvatkinase / LDH	je 2 U
0,01 ml Rohextrakt	

Hydrogenase

Die Hydrogenase-Aktivität wurde über die Reduktion von Methylviologen (MV) durch Wasserstoff bzw. die Oxidation von reduziertem Methylviologen und H₂-Entwicklung gemessen. Die Oxidation bzw. Reduktion von Methylviologen kann photometrisch bei 578 nm ($\epsilon_{578} = 9,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt werden. Die Bestimmung erfolgte bei 40 °C und unter anaeroben Bedingungen.

a) Wasserstoffbildung aus MV_{red}

Die Bestimmung erfolgte in modifizierter Form nach Lamed und Zeikus (1980a). Methylviologen wurde durch Na-Dithionit reduziert.

Testansatz	Konz.im Test in mM
2,10 ml 100 mM Tris-HCl mit GGK pH 7,6	97
0,004 ml 14 M Mercaptoethanol	26
0,05 ml 87 mM Methylviologen	2
einige Körnchen Na-Dithionit bis der Küvetteninhalt tief blau gefärbt war	
0,02 ml Rohextrakt	

b) Reduktion von MV durch Wasserstoff

Die Bestimmung erfolgte in modifizierter Form nach Ragsdale und Ljungdahl (1984)

Testansatz	Konz.im Test in mM
2,10 ml 50 mM Tris-HCl mit GGK, pH 8,6; H ₂ -gesättigt	49
0,004 ml 14 M Mercaptoethanol	26,5
0,05 ml 87 mM Methylviologen einige Körnchen Na-Dithionit bis der Küvetteninhalt leicht blau gefärbt war	2
0,005 ml Rohextrakt	

Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Methode von Lamed und Zeikus (1980a), wobei die störende Hydrogenaseaktivität durch Zugabe von Kohlenmonoxid (in Form von Kohlenmonoxid-gesättigtem Testpuffer) inhibiert wurde (nach Ragsdale und Ljungdahl, 1984).

Testansatz	Konz.im Test in mM
2,10 ml 100 mM Tris-acetat pH 7,5	90,5
0,05 ml 87 mM Methylviologen	1,9
0,05 ml 500 mM Pyruvat	10,8
0,05 ml 10 mM Co A	0,2
0,05 ml 100 mM Tris-acetat pH 7,5; CO-gesättigt	
0,02 ml Rohextrakt	

Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen

Die Bestimmung der Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen erfolgte mit Abwandlungen nach Jungermann et al. (1973). Der natürliche Elektronencarrier Ferredoxin wurde durch Methylviologen ersetzt. Der Elektronenfluß von NADH und NADPH zu Methylviologen und umgekehrt, wurde durch Messung der Extinktion bei 578 nm ($\epsilon_{578} = 9,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt. Die Oxidation von reduziertem Methylviologen durch die Hydrogenase wurde durch Zugabe von Kohlenmonoxid blockiert (Ragsdale und Ljungdahl, 1984).

a) Oxidation von MV_{red} mit NAD(P)

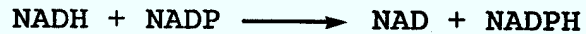
Testansatz	Konz. im Test in mM
2,10 ml 100 mM Tris-acetat mit GGK, pH 7,5	93
0,05 ml 100 mM Methylviologen mit wenig Na-Dithionit tief blau reduziert	2,2
0,05 ml 50 mM NAD bzw. NADP	1,1
0,05 ml 100 mM Tris-acetat pH 7,5 ; CO-gesättigt	
0,015 ml Rohextrakt	

b) Reduktion von MV_{ox} mit NAD(P)H

Testansatz	Konz. im Test in mM
2,10 ml 100 mM Tris-acetat mit GGK, pH 7,5	93
0,05 ml 100 mM Methylviologen mit wenig Na-Dithionit bis zu einer leichten Blaufärbung reduziert	2,2
0,05 ml 50 mM NADH bzw. NADPH	1,1
0,05 ml 100 mM Tris-acetat pH 7,5 ; CO-gesättigt	
0,01 ml Rohextrakt	

Transhydrogenase

Die Transhydrogenase katalysiert die reversible Reduktion von NADP durch NADH (Rydström, 1979) gemäß der Gleichung:



Für die Aktivitätsbestimmung kann ein Substrat durch ein Substratanalogon mit einem anderen Absorptionsspektrum ersetzt werden, wie z.B. 3-Acetylpyridin-adeninucleotid (APAD), das ein deutlich unterschiedliches Absorptionsmaximum besitzt, so daß effektiv eine Extinktionszunahme meßbar ist. Bei 375 nm beträgt der Extinktionskoeffizient für das Paar NADH/APAD 5,1, und für das Paar NADPH/APAD 6,2 (Rydström, 1979).

Testansatz			Konz. im Test in mM
0,95 ml	50 mM Tris-HCl mit GGK, pH 8,0		48,5
	1 mM EDTA		1,0
0,01 ml	20 mM APAD		0,2
0,01 ml	20 mM NADH bzw. NADPH		0,2
0,01 ml	Rohextrakt		

Acetaldehyd-Dehydrogenase

Die Bestimmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase erfolgte nach Rudolph et al. (1968), wobei ein Acetyl-CoA-regenerierendes System nach Jungermann et al. (1973) mit verwendet wurde. Es wurde die Reaktion von Acetyl-CoA nach Acetaldehyd und die weitere Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol gemessen.

Testansatz			Konz. im Test in mM
0,90 ml	50 mM KPP pH 7,0		45,4
	10 mM Mercaptoethanol		9,1
0,02 ml	4,3mM CoA		0,09
0,02 ml	50 mM NADH		1,0
0,01 ml	1 M Acetyl-Phosphat		100,0
0,01 ml	Phosphotransacetylase (500 U/ml)		5 U
0,03 ml	Rohextrakt		

Die Aktivität der Rückreaktion (Acetaldehyd nach Acetyl-CoA) wurde nach Lamed (1980a) gemessen. Hierbei stört allerdings die NADH-abhängige ADH, so daß nur eine Teilaktivität bestimmt werden konnte, und zwar diejenige die über die ADH-Aktivität hinausging.

Testansatz			Konz. im Test in mM
0,90 ml	50 mM KPP pH 8,5		50
	10 mM Mercaptoethanol		10
0,05 ml	4,3mM CoA		0,22
0,02 ml	50 mM NAD		1,0
0,01 ml	0,5 M Acetaldehyd		5,0
0,01 ml	Phosphotransacetylase (500 U/ml)		5 U
0,01 ml	Rohextrakt		

L-Lactat-Dehydrogenase

Für die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität wurde der Testansatz nach Lamed und Zeikus (1980b) verwendet. Die Bestimmung erfolgte unter aeroben Bedingungen, da die NADH-Oxidase-Aktivität unter diesen Pufferbedingungen sehr gering war.

Testansatz	Konz. im Test in mM
0,95 ml 100 mM Imidazol-HCl pH 7,0	96
0,01 ml 400 mM Pyruvat	4
0,01 ml 70 mM NADH	0,7
0,01 ml 50 mM Fructose-1,6-diphosphat	0,5
0,01 ml Rohextrakt	

8. DNA-Analysen

8.1. DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA erfolgte nach der Methode von Marmur (1961) mit Abwandlungen nach Huß et al. (1983). 8-15 g Bakterienfeuchtmasse wurden in 100 ml Saline-EDTA (0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA, pH 8,0) suspendiert, Lysozym dazugegeben (ca 1 mg/ 10 ml) und für 15 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 25%-igem SDS bis zu einer Konzentration von 2 % und 5 M NaCl bis zu einer Konzentration von 1 M ausgefällt. Aus diesem Lyseansatz wurde die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform, 30 min Schütteln und Abzentrifugieren (10 min Christ-Zentrifuge, 6000 rpm) abgetrennt, wobei die Oberphase die DNA enthielt. In weiteren Reinigungsschritten wurde die DNA-Lösung von kontaminierenden Proteinen und Zellwandbestandteilen gereinigt. Zunächst wurde die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen 2-Propanol ausgefällt, auf einen Glasstab aufgewickelt und wieder in 0,1 x Standard-Saline-Citrat-Puffer (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Trinatriumcitrat, pH 7,0) unter leichtem Schütteln gelöst. Durch Zugabe von 10 x SSC wurde die Salzkonzentration auf 1 x SSC erhöht und anschließend insgesamt drei mal die DNA mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt, wobei jeweils die Oberphasen vereinigt wurden, während die Unterphase und die Interphase erneut extrahiert wurden. Zu den vereinigten Oberphasen wurde dann 5 M NaCl bis zu einer Konzentration von 1 M NaCl und 4 %-ige CTAB-Lösung (N-Cetyl-N,N,N-trimethylammonium-bromid in 1 M NaCl) bis

zu einer Konzentration von 1% gegeben. Die CTAB-Salze der DNA wurden durch Erniedrigung der NaCl-Konzentration mit H₂O bidest auf 0,6 M selektiv gefällt. Die DNA wurde kurz abzentrifugiert und erneut in 1 M NaCl gelöst. Anschließend wurde die DNA wieder 2 x mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt, bis die Zwischenschicht nach der Zentrifugation nicht mehr zusammenhängend war. Aus der DNA-haltigen Oberphase wurde die DNA mit 0,6 Vol 2-Propanol gefällt, auf einen Glasstab aufgewickelt und in 0,1 x SSC gelöst, und mit 10 x SSC die Salzkonzentration auf 1 x SSC erhöht. Diese DNA-Lösung wurde einer RNase-Behandlung (10 µg RNase /ml, 1,5 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubieren) und einer Proteinase K-Verdauung (50 µg/ml, 4 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubieren) unterworfen. Diese Lösung wurde erneut mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt bis keine Interphase mehr erkennbar war. Die Oberphase wurde mit 1/9 Volumen Na-Acetat/EDTA pH7,0 (3 M Na-Acetat+0,002 M EDTA) versetzt, und die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen 2-Propanol gefällt und in 3 ml 0,1 x SSC gelöst.

Die so gereinigte DNA wurde für die Bestimmung des GC-Gehaltes zwei mal gegen 1 x SSC dialysiert. Für die Renaturierungsexperimente wurde die DNA drei mal mittels einer French Pressure Cell mit ca $1,5 \times 10^6$ Pa fragmentiert und anschließend gegen 2 x SSC dialysiert. Die gereinigte hochmolekulare DNA-Lösung wurde über wenigen Tropfen Chloroform bei 4 °C aufbewahrt, die fragmentierte DNA bei -18 °C.

Photometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration der DNA

Um die Qualität der DNA festzustellen, wurde ein Spektrum in 1 x SSC zwischen 215 und 300 nm aufgenommen. Die Absorptionsverhältnisse A_{260} / A_{230} sowie A_{260} / A_{280} erlauben eine Aussage hinsichtlich der Protein- bzw. RNA-Kontamination und sollen größer als 2 bzw. 1,8 sein (Marmur, 1961).

Die Konzentration der DNA läßt sich nach Cryer et.al.(1975) bestimmen, wonach einer Absorption bei 260 nm von 1 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

8.2. Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA

Hochmolekulare, gereinigte DNA-Lösung in 1 x SSC wurde auf eine Absorption von 0,4 ($\approx 20 \mu\text{g/ml}$) bei 260 nm eingestellt. Die GC-Bestimmung erfolgte mit einem microprozessorgesteuerten UV-Vis Spektralphotometer der Firma IMA-Gilford mit integriertem Thermoprogrammer. Die Meßdaten, wurden über einen digitalen X-Y-Plotter (Hewlett Packard 7225) ausgegeben.

Die Schmelzkurven wurden über einen Temperaturbereich von 75-90 °C erstellt, mit einem Temperaturanstieg von 0,25 °C/min. Der Plotter zeichnete sowohl die einzelnen Schmelzkurven ($A_{260\text{nm}}$), als auch die 1. Ableitung davon (Abb.4) auf.

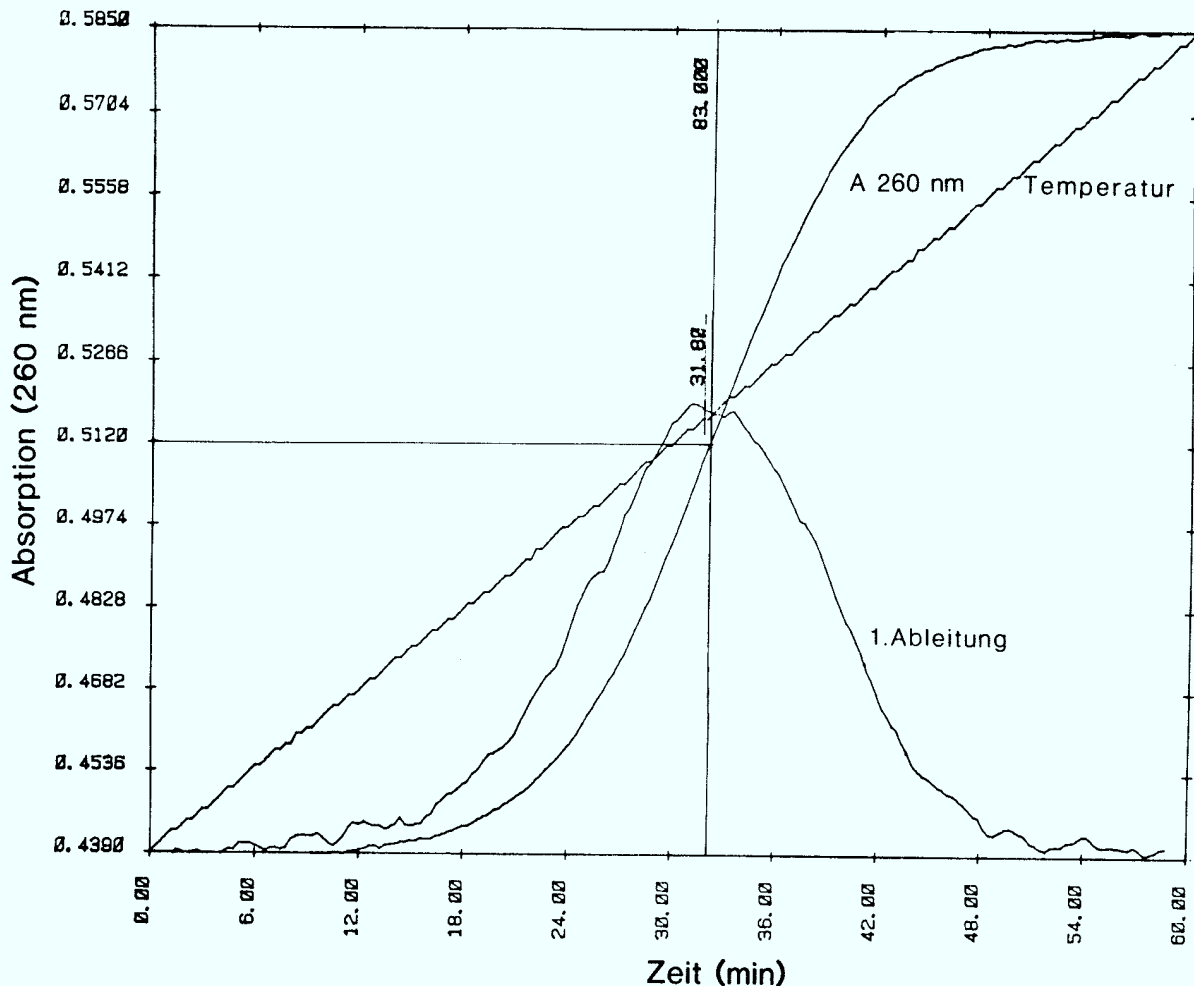


Abb.4: Schmelzkurve einer DNA-Probe. Die Auswertung des Schmelzpunktes (83°C) erfolgt über die halbmaximale Extinktionszunahme sowie über das Maximum der 1. Ableitung. Beide Methoden ergeben in diesem Beispiel denselben Schmelzpunkt.

Zur Berechnung des GC-Gehaltes diene entweder der Schmelzpunkt T_M , das ist diejenige Temperatur, bei der eine halbmaximale Absorptionszunahme, ausgehend vom nativen Grundzustand der DNA, erreicht wird, oder das Maximum der 1. Ableitung davon. Die Berechnung des GC-Gehaltes in 1 x SSC erfolgte nach der Gleichung von de Ley (1970):

$$\% \text{ GC} = 2,44 \cdot (T_M - 69,4)$$

8.3. Bestimmung von DNA-Renaturierungsraten

Die Bestimmung der Renaturierungsraten erfolgte am gleichen Gerät wie die Bestimmung des Schmelzpunktes der DNA (siehe Abschnitt 8.2.). Zur Bestimmung der Renaturierungsraten wurde die Methode nach de Ley et al. (1970) mit den Bedingungen von Huß et al. (1983) verwendet. Die vier Küvetten, welche verschlossen werden konnten, enthielten entweder 2 x SSC als Leerwert, DNA-Lösung von Stamm A, das gleiche Volumen DNA-Lösung von Stamm B, und eine Mischung gleicher Volumen von DNA des Stammes A und B. Die DNA-Lösungen von Stamm A und B hatten gleiche Gewichtskonzentrationen. Die DNA wurde in den Küvetten bei 100 °C für 10 min denaturiert. Die Renaturierungsreaktion wurde durch schnelles Abkühlen der Lösungen auf die optimale Renaturierungstemperatur T_{OR} gestartet; $T_{OR} = 0,51 \cdot \%(G+C) + 47,0$ (Gillis et al., 1970). Die Absorption bei 260 nm wurde über 30 min alle 15 sec aufgezeichnet (Abb.5). Die Renaturierungsrate v' wurde als Absorptionsabnahme / min ($\Delta A/t$), zwischen 10 und 30 min nach Reaktionsstart berechnet. Die Bindungsrate ($\%D$) wurde nach folgender Gleichung nach de Ley et al. (1970) berechnet:

$$\% D = 100 \times (4v'_M - v'_A - v'_B) / 2\sqrt{(v'_A \times v'_B)}$$

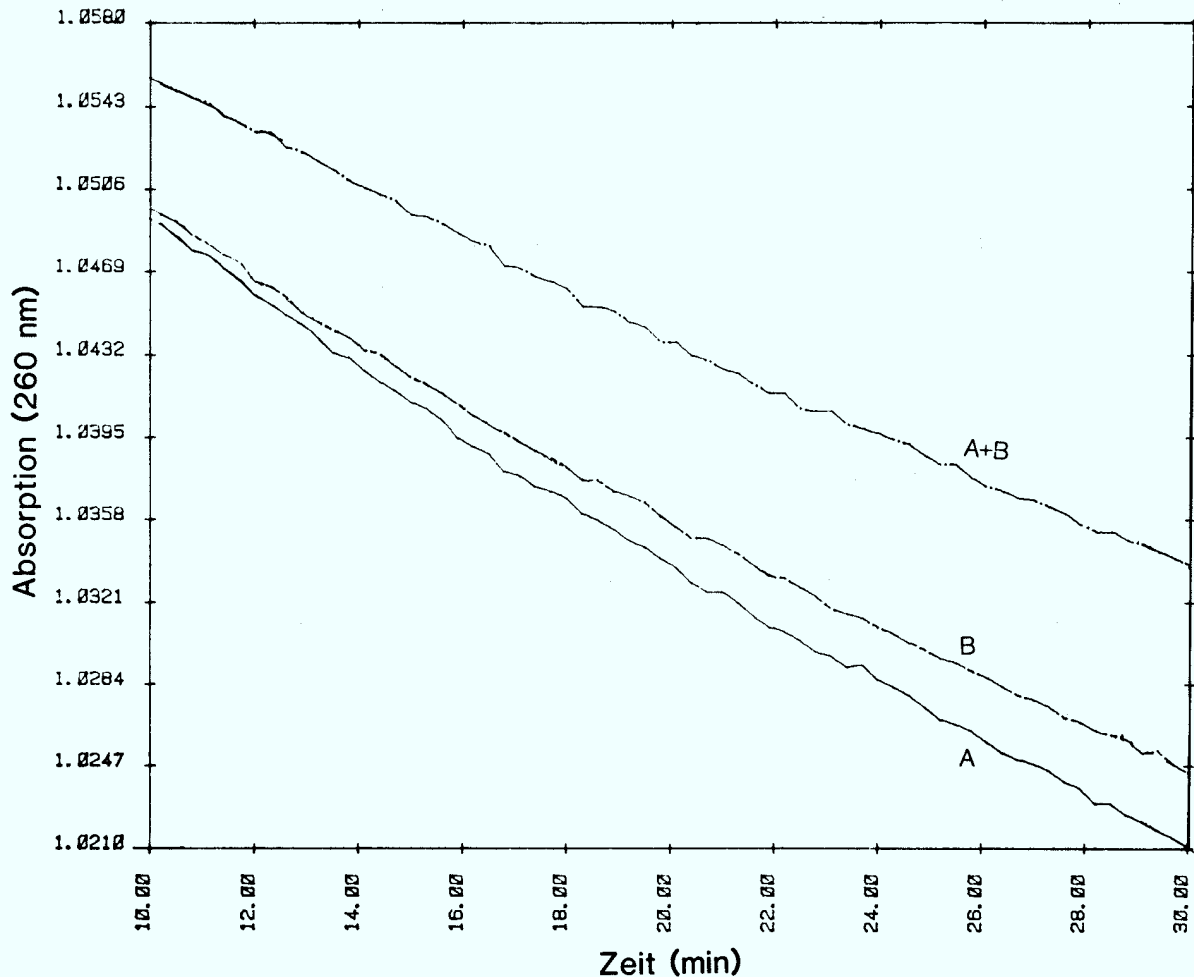


Abb.5: Hybridisierungsbeispiel mit den drei Renaturierungskurven. — = DNA (A); --- = DNA (B); - - - = Mischung aus (A) und (B)

9. Zellwandanalysen (nach Schleifer und Kandler, 1967)

Isolierung von Zellwänden

Ca 2 g Bakterienfeuchtmasse wurden mit Lysozym aufgeschlossen (siehe Abschnitt 7.1.), die Rohzellwände abzentrifugiert (18000 rpm, 20 min) und einmal mit H₂O bidest. gewaschen. Zur Inaktivierung von lytischen Enzymen wurde das Pellet in 100 ml 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 suspendiert und für 20 min bei 100 °C erhitzt. Zu der Zellwandsuspension wurde dann 2 Spatelspitzen Trypsin gegeben, kurz aufgerührt und zur Vermeidung von

Bakterienwachstum mit 1,5 ml Toluol versetzt. Zur tryptischen Verdauung inkubierte man über Nacht bei 37 °C im Schüttelbad. Die tryptisch verdauten Zellwände wurden abzentrifugiert (20 min, 12000 rpm) und viermal mit H₂O bidest gewaschen. Das Sediment wurde in 5 ml Wasser aufgenommen, bei -20 °C eingefroren und 30 Stunden lyophilisiert. Die lyophilisierten Zellwände wurden bis zur weiteren Verwendung im Exsikkator aufbewahrt.

Bestimmung von Zellwandteichonsäuren

10 mg Zellwand wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml 2 N HCl versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge, 5 min) enthielt der Überstand die Zellwandteichonsäuren. Dieser Überstand wurde 3 Stunden im Einschlußrohr bei 100 °C hydrolysiert und dann mit N₂ abgeblasen.

Für die chromatographische Trennung wurden die Proben zusammen mit Vergleichssubstanzen auf Kieselgelplatten (Merck, SL 60) aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten Glycerin (Merck, 1:10 verdünnt) und Anhydroribit (30 mg Ribit mit 3 ml 4 N HCl bei 100 °C für 16 Stunden inkubiert, abgeblasen und in 3 ml H₂O aufgenommen).

Die Trennung erfolgte mit Isopropanol/Wasser/Eisessig (75:15:10) als Laufmittel, die Laufzeit betrug ca 1 Stunde. Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme zunächst mit einer frisch angesetzten 1,5%-igen Natriumperjodat-Lösung angesprüht und anschließend mit SO₂ (Messer, Griesheim) behandelt, bis die Braunfärbung verschwand. Dann wurde das Chromatogramm mit fuchsinschwefliger Säure (Schiff'sches Reagenz) entwickelt. Glycerin erschien innerhalb von 5 min als violetter Fleck, Anhydroribit erst nach ca 20 min als dunkelblauer Fleck, auf gleicher Höhe wie Glycerin. Läßt man das Chromatogramm einige Zeit im Dunkeln liegen, so verschwindet der violette Fleck für Glycerin völlig, während der dunkelblaue Fleck des Anhydroribit erhalten bleibt.

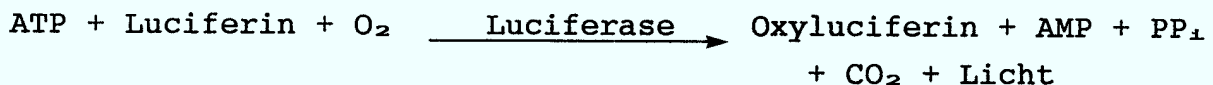
10. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend mit Uranylacetat negativ kontrastiert (Scherer und Bochem, 1983). Nach Entwässerung der Zellen wurden sie in 'low-viscosity medium' (Spurr, 1969) eingebettet und mit einem LKB 8800 Ultratome III (LKB, Bromma, Schweden) Ultradünnschnitte angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf 200-mesh Kupfergittern gesammelt und mit Bleiacetat nachkontrastiert (Venable und Coggeshall, 1965). Alle Proben wurden mit einem Philips EM 400 Elektronenmikroskop untersucht.

11. Bioluminometrische Bestimmung von Adenosinnucleotiden mit Luciferin/Luciferase

Prinzip der Messung:

ATP-abhängige Luciferasen aus Leuchtkäfern, die pro mol ATP eine definierte Anzahl von Lichtquanten erzeugen, können zur quantitativen Bestimmung von ATP eingesetzt werden:



Das Integral der Lichtemission über die Zeit ist - da ein Luciferase-Rohpräparat verwendet wurde - in den ersten 4 sec linear abhängig von der ATP-Konzentration (im Bereich von 10^{-12} mol ATP/ml Testansatz).

Probenentnahme und Extraktion (nach Schimz et al., 1981)

Um einen schnellen Aufschluß der Zellen zu gewährleisten, wurden 5 ml eiskalte 35 %-ige (v/v) Perchlorsäure in einer 20 ml Plastikspritze vorgegeben und dazu ca 5 ml Kultur über ein Septum direkt aus dem Fermenter aufgezogen. Die so aufgenommene Probe wurde in ein vorgewogenes, eisgekühltes Zentrifugenglas gespritzt, und für 15 min ins Eisbad gestellt. Zur Ermittlung des genauen Probevolumens wurde die Gewichts Differenz bestimmt.

Der Extrakt wurde mit 15 ml 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert (endgültiger pH=7,4), das Präzipitat durch Zentrifugation (10 min, 3000 rpm, bei Raumtemperatur) entfernt, und der Überstand bis zur Nucleotidbestimmung bei -18 °C aufbewahrt. Um den Nucleotidgehalt von intakten Zellen zu bestimmen, wurde a) von der Gesamtkultur und b) von Kulturfiltrat (10 min, 6000 g, 4°C) ein Extrakt hergestellt.

Messung:

Lösungen für die Nucleotidbestimmung:

Puffer: 50 mM Tris
 3,5 mM MgSO₄ · 7 H₂O
 2,5 mM K₂SO₄
 0,6 mM EDTA

Der pH-Wert wurde von ca 9,77 mit konz. Schwefelsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Enzyme: a) Firefly Lantern Extract

Zu einem Fläschchen mit 50 mg lyophilisiertem Rohextrakt FLE 50 (Sigma, München) wurde 5 ml destilliertes Wasser gegeben und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4 °C) abgetrennt.

b) Pyruvatkinase (10 mg/ml, aus Kaninchenmuskel) und Myokinase (5 mg/ml, aus Schweinemuskel)

Diese beiden Enzyme waren jeweils in Ammoniumsulfatlösung suspendiert. Das Protein wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 3000 rpm, 10 min, Raumtemperatur) und die Ammoniumsulfat-Lösung durch Puffer (s.o.) ersetzt.

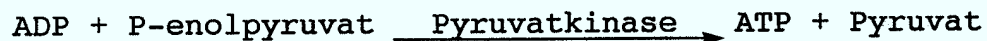
Reagenzien:

a) Phosphoenolpyruvat-Reagenz
 20 mg K⁺-PEP wurden in 3 ml einer wässrigen Lösung bestehend aus 370 mg MgSO₄ · 7 H₂O und 400 mg KCl unmittelbar vor Gebrauch gelöst.

b) Standardlösungen (IS)

1 mM Standard-Lösungen von ATP, ADP und AMP wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und bei - 18 °C aufbewahrt. Für die Nucleotidbestimmung wurden diese Standardlösungen 1:10 bzw. 1:20 mit Wasser verdünnt.

ADP und AMP werden vor der Bestimmung enzymatisch in ATP überführt:



Die Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip von Spielmann et al. (1981) mit den Testbedingungen von Schimz et al. (1981).

		ATP	ATP+IS	ADP	ADP+IS	AMP	AMP+IS
Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1100 µl enthält:							
Extrakt	µl	500	500	500	500	500	500
Puffer	µl	500	490	490	480	480	470
PEP-Reagenz	µl	100	100	100	100	100	100
Interner Standard	µl	0	10	0	10	0	10
Pyruvatkinase	µl	0	0	10	10	10	10
Myokinase	µl	0	0	0	0	10	10
Inkubation bei Raumtemperatur							
ca 25 °C	min	0	0	15	15	45	45

Bestimmungsansatz

500 μ l Reaktionsansatz
 wurden in einer Küvette vorgegeben
 280 μ l Luciferin/Luciferase-Lösung und
 2200 μ l Puffer
 wurden zusammen zum Zeitpunkt Null in die Küvette
 injiziert

Die Lichtemission wurde mit einem Biolumineszenzmessgerät (Bioluminescence Analyzer XP2000, Skaan AG, Basel) während der ersten 4 Sekunden nach der Injektion gezählt und integriert. Die Berechnung der Nucleotidkonzentrationen erfolgte anhand der internen Standards, nach folgender Formel, wobei berücksichtigt wurde, daß in den Ansätzen zur Bestimmung von ADP bzw. AMP die Summe aller 2 bzw. 3 Nucleotide bestimmt wurde.

$$\text{nmol AXP/ml Kultur} = \frac{X_0 \times V_f \times \text{IS (nmol AXP/ml BA)}}{X_{\text{IS}} - X_1}$$

$$X_{\text{IS}} - X_1$$

X_0 = counts ATP bzw. counts ADP-ATP bzw. AMP-ADP

V_f = Verdünnungsfaktor aus Extraktion, Umsetzung, Bestimmung

IS = Konzentration des internen Standards / ml Bestimmungsansatz (nmol/ml)

X_{IS} = counts AXP+IS

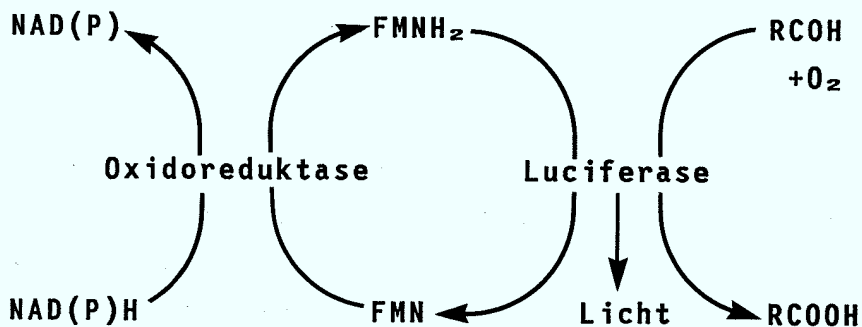
X_1 = counts AXP

Zur Berechnung der Nucleotidkonzentration von intakten Zellen wurden die Werte für Kulturfiltrat abgezogen.

Die Berechnung des 'Energy Charge' erfolgte nach Atkinson (1968).

12. Bioluminesmetrische Bestimmung von NADH und NADPH

Das Biolumineszenzsystem aus Bakterien der Gattungen *Vibrio* und *Beneckea* besteht aus zwei Enzymen, einer FMN-Reduktase, die FMN mit NADH oder NADPH zu FMNH₂ reduziert. FMNH₂ wird dann in einer gemischten Oxidation zusammen mit einem längerkettigen aliphatischen Aldehyd (C₁₀, C₁₂ oder C₁₄) von der Luciferase umgesetzt, wobei ein Teil der Reaktionsenergie als Licht frei wird. In der Natur dient der C₁₄-Aldehyd, der Myristinaldehyd, als Substrat. Mit Hilfe der beiden Enzyme aus Photobakterien, der FMN-Reduktase und der Luciferase, gelingt es, NADH- und NADPH-Konzentrationen sehr spezifisch und sehr empfindlich zu bestimmen.



12.1. Extraktion von Pyrimidinnucleotiden und deren Umsetzung

Die oxidierten Pyrimidinnucleotide werden in saurem Milieu extrahiert, wobei die reduzierten Nucleotide zerstört werden. Umgekehrt sind die reduzierten Nucleotide in stark alkalischem Milieu stabil, während hier die oxidierten Nucleotide zerstört werden. Um den Pyrimidinnucleotidgehalt von intakten Zellen zu bestimmen, wurden sowohl Proben der Gesamtkultur als auch des Kulturfiltrates (10 min, 6000xg, 4 °C) jeweils sauer und alkalisch extrahiert.

Saure Extraktion:

Die saure Extraktion der oxidierten Nucleotide mit Perchlorsäure erfolgte nach der Methode von Schimz et al. (1981). Die Probenentnahme erfolgte wie bei der Adeninnucleotidbestimmung.

- 1 Teil eiskalte Perchlorsäure 35 %
- 1 Teil Kultur
15 min im Eisbad stehen lassen und mit
- 3 Teilen 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung
in der Kälte neutralisieren. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min, 3000 rpm, bei Raumtemperatur) abgetrennt, und der Überstand bei -18°C aufbewahrt.

Alkalische Extraktion:

Die alkalische Extraktion der reduzierten Nucleotide erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Williamson und Corkey (1973), wobei die Gesamtkultur extrahiert wurde. Die Probenentnahme erfolgte wie bei der Adeninnucleotidbestimmung.

- 10 ml Kultur
- 10 ml 0,3 M alkoholische (50 % Ethanol) KOH-Lösung
vorgewärmt auf 50 °C
2 min homogenisieren
8 min im 50 °C Wasserbad inkubieren
abkühlen und mit
- 0,5 ml Perchlorsäure 35 %
in der Kälte neutralisieren. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min, 3000 rpm, bei Raumtemperatur) abgetrennt. Der Überstand wurde bis zur weiteren Umsetzung im Eisbad aufbewahrt.

Enzymatische Umsetzung von NAD(P)H zu NAD(P):

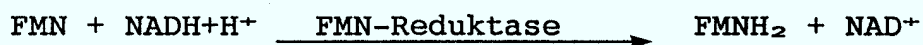
Da NADH und NADPH in den Extrakten nicht sehr stabil sind, wurden sie enzymatisch in die stabileren oxidierten Nucleotide überführt (nach Wimpenny und Firth, 1972), so daß der Extrakt bei -18 °C bis zur Bestimmung aufbewahrt werden konnte.

20,50 ml KOH/EtOH-Extrakt
 0,05 ml 1 M α -Ketoglutarat in 1 M Ammoniumchlorid pH 7,0
 0,03 ml Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber (= 72 U)
 15 min bei Raumtemperatur
 0,10 ml 5 N Salzsäure
 10 min bei 50 °C inkubieren
 abkühlen und mit
 0,09 ml 5 N Natronlauge
 langsam neutralisieren.

Der so umgesetzte Extrakt konnte bei -18 °C mehrere Wochen bis zur Nucleotidbestimmung aufbewahrt werden.

12.2. Bestimmung der NAD(P)H:FMN-Reduktase-Aktivität

Dieser Test dient zur genauen Aktivitätsbestimmung der FMN-Reduktase (nach Boehringer, Mannheim, Kontroll-Labor, Nr.476 480). Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:



Gemessen wurde die Extinktionsabnahme bei 365 nm in einem UV-Spektrophotometer UVIKON 810 von Kontron bei 25 °C. Ca alle 4 Wochen wurde die Aktivität neu bestimmt.

Lösungen:

FMN-Reduktase aus Photobacterium fischeri

ca. 3 mg Lyophilisat wurden in 1 ml einer Glycerin-Lösung, 40%(v/v), enthaltend 1 mM EDTA, 0,1 mM Dithioerythrit und 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 gelöst.

Testansatz:

2,75 ml Puffer (50 mM KPP, pH 7; 0,1 mM EDTA)
 0,100 ml NADH (15 mg/ml H₂O)
 0,100 ml Albumin (30 mg/ml H₂O)
 0,050 ml FMN (5 mg/ml H₂O)
 mischen, temperieren (25 °C), Vorreaktion verfolgen
 ($\Delta E \approx 0,010/\text{min}$). Reaktion starten mit
 0,050 ml FMN-Reduktase-Lösung
 Die Extinktionsänderung $\Delta E/\text{min}$ wurde aus dem
 linearen Bereich berechnet.

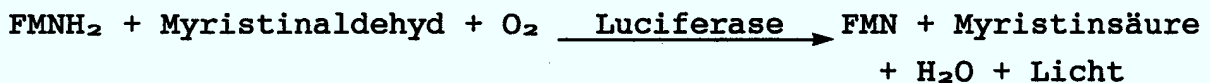
Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{3,05 \cdot \Delta E/\text{min}}{\epsilon \cdot 0,05 \cdot 1} \quad [\text{U/ml Probe}]$$

$$\epsilon_{365 \text{ nm}} = 3,4 \quad [\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

12.3. Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte nach folgendem Prinzip:



wobei das gebildete Licht in einem Szintillationszähler gemessen wurde (nach Boehringer Vorschrift für das Kontroll-Labor, Nr. 5401).

Lösungen:**Myristinaldehyd-Lösung:**

100 mg Myristinaldehyd bis zum Flüssigwerden erwärmen und mit 100 ml 50°C warmer 5 % (w/v) Albumin-Lösung, die 1 % (v/v) Triton X100 enthält, unter starkem Rühren mischen (Lösung ist 2 Wochen stabil).

FMN-Reduktase:

ca 3 mg Lyophilisat in 1 ml Glycerin-Lösung (siehe FMN-Reduktase-Bestimmung) lösen und so mit 50 % (v/v) Glycerin verdünnen, daß die Volumenaktivität 10 U/ml beträgt (Aktivitätsbestimmung siehe Abschnitt 12.2)

Luciferase-Lösung:

20 mg Lyophilisat (aus *Photobacterium fischeri*,) in 2 ml bidest. Wasser lösen und 1:40 000 mit eiskaltem Testpuffer (80 mM KPP pH 7,0; 20% (v/v) Glycerin; 0,2 mM Mercaptoethanol) verdünnen.

Ausführung:

Gerät: Szintillationszähler von Packard, Modell 4530.

Programm Priostat, 3H-Kanal

Temperatur: 25 °C

Testansatz:

1,44-1,52 ml 80 mM KPP, pH 7,0; 20 % (v/v) Glycerin;

0,2 mM Mercaptoethanol

0,050 ml 0,5 mM FMN

0,200 ml Myristinaldehyd-Lösung

0,200 ml 2 mM NADH

0,010 ml FMN-Reduktase

0,02-0,1 ml Luciferase-Probe

mischen und sofort in die Zählkammer stellen.

Für die Berechnung dienen die cpm bei $\leq 2\% \sigma$

Für 0,02-0,1 ml Luciferaseprobe wurde eine Eichkurve erstellt (Abb.6). Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{cpm/ml Stammlösung} = 40\ 000 \times 1/\text{Probevolumen} \times \text{cpm/Probevolumen}$$

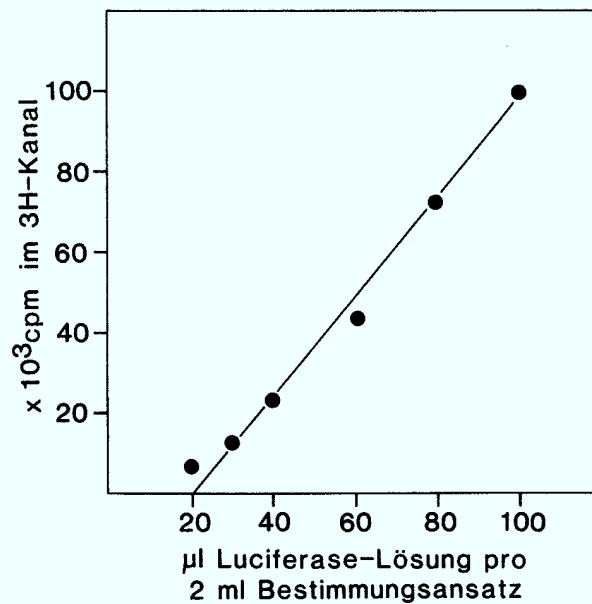


Abb.6: Eichgerade zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität

12.4. Spezifische enzymatische Umsetzungen

Umsetzung von NAD zu NADH:

NAD in den Perchlorsäureextrakten und den umgesetzten Ethanol/KOH-Extrakten muß vor der bioluminometrischen Bestimmung in NADH überführt werden. Zu 1 ml Perchlorsäureextrakt wurden 0,01 ml Alkohol-Dehydrogenase-Lösung (aus Hefe, 882 U/ml entspricht 9 U/0,01 ml) und 0,04 ml Ethanol abs. zugegeben und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Für die Umsetzung von NAD in den Ethanol/KOH-Extrakten wurde kein Ethanol zugegeben.

Umsetzung von NADP zu NADPH:

Sowohl NADP⁺ aus den Perchlorsäure-Extrakten als auch aus den umgesetzten Ethanol/KOH-Extrakten wurde enzymatisch zu NADPH überführt.

1,000 ml	Extrakt
0,020 ml	0,5 M Glucose-6-Phosphat
0,0125ml	Glucose-6-P-DH aus Hefe (1 mg/ml)

Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur

12.5. Bioluminometrische Bestimmung von NADH und NADPH**Erforderliche Lösungen:****Luciferase:**

20 mg Lyophilisat wurden in 2 ml H₂O bidest gelöst. Diese Lösung ist bei -18 °C über mehrere Monate stabil. Die Aktivität des Enzyms wurde wie in Abschnitt 12.3 bestimmt, und mit H₂O bidest auf $2,95 \times 10^8$ cpm/15 µl verdünnt.

FMN-Reduktase:

ca 3 mg Lyophilisat wurden in 1 ml einer 40%(v/v) Glycerin-Lösung mit 1 mM EDTA, 0,1 mM Dithioerythrit und 50 mM KPP pH 7,0 , gelöst und nach der Aktivitätsbestimmung (siehe Abschnitt 12.2.) auf 2 U/ml mit Glycerin-Lösung verdünnt.

Mix(129 µl):

34 µl	Aqua bidest.
50 µl	150 mM KPP pH7,0
30 µl	1 mM Dithioerythrit in 150 mM KPP pH 7,0
3 µl	2,5 µMol/ml FMN in KPP pH 7,0
12 µl	Myristinaldehyd-Lösung (siehe Abschnitt 12.3.)

Enzymgemisch:

15 µl	Luciferase-Lösung (= $2,95 \times 10^8$ cpm)
7 µl	FMN-Reduktase-Lösung (= 12 mU)

Interne Standards (IS):

Eine frisch angesetzte 8 mM NADH-Lösung wurde mit H₂O bidest auf 50 pmol/50 µl oder 100 pmol/50 µl verdünnt. NADPH wurde entsprechend auf 200 pmol bzw. 400 pmol/50 µl verdünnt.

Bestimmungsansatz:

Die Bestimmung der Pyridinnucleotide erfolgte mit einem LKB-Wallac Luminometer 1251 (Fa. LKB-Wallac, Bromma, Schweden).

Geräteeinstellung: Temperatur: 25 °C
 Delay time: 0,2 sec
 Integration time: 0
 Factor: 0

Von jedem Extrakt (Kultur und Kulturfiltrat) wurde gleichzeitig eine Umsetzung von NAD nach NADH und NADP nach NADPH gemacht. Eine Probe als Blindwert (ohne Zusätze) wurde ebenfalls für 15 min inkubiert.

In 4 ml Polystyren-Küvetten wurde folgende Mischung pipettiert:

		NAD(P)H	NAD(P)H IS 1	NAD(P)H IS 2	Blindwert
umgesetzter Extrakt	µl	50	50	50	-
nicht umges. Extrakt	µl	-	-	-	50
150 mM KPP pH 7,0	µl	50	-	-	50
Interner Standard	µl	-	50	50	-
Mix	µl	129	129	129	129
Im Luminometer 5 min vortemperieren. Zugabe von					
Enzymmischung	µl	21	21	21	21

Gemessen wurde die maximale Lichtausbeute (in mV).

Die Berechnung der Nucleotidkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{nmol NAD(P)H}}{\text{ml Kultur.}} = \frac{\text{Probe (mV)} - \text{Blindwert (mV)} \times \text{IS (pmol/50µl)}}{\text{IS (mV)}} \times \frac{1}{0,05} \times \text{Verd.Faktor}$$

Für die Berechnung der Nucleotidmenge in intakten Zellen wurden die Werte um die Kulturfiltratwerte korrigiert.

13. Fructose-1,6-diphosphat-Bestimmung

Probenahme und Extraktion (nach Yamada und Carlsson, 1975)

100 ml Kultur wurden unter anaeroben Bedingungen dem Fermenter entnommen und in einem eisgekühlten Zentrifugenbecher 10 min, 12000 rpm, 4°C, abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Pellet wurden 2,5 ml 7,5 % (w/v) Perchlorsäure zugegeben. Diese Suspension wurde 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend 10 min, 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,5 ml 1 M Triethanolaminhydrochlorid versetzt und der pH bei 0°C mit wenigen Tropfen 5 M K₂CO₃ auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen des Extraktes bestimmt. Die FDP-Konzentration im Überstand wurde innerhalb einer Stunde enzymatisch bestimmt.

Enzymatische Bestimmung (nach Michal und Beutler, 1974)

Die Bestimmung erfolgte photometrisch in einem Eppendorf-Photometer bei 30 °C. Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 365 nm.

375 µl	0,4 M Triethanolamin-Puffer, pH 7,4 mit 40 mM EDTA
375 µl	Extrakt
50 µl	NADH (7 mg/1,5 ml 0,4 M Triethanolamin-Puffer)
20 µl	GDH/TIM (1:4 verdünnt mit H ₂ O)
10 µl	Aldolase (1:2 verdünnt mit H ₂ O)

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\mu\text{mol FDP/ml Extrakt} = \frac{\text{EX}_{365 \text{ nm}} \times \text{Gesamtvol.}}{3,41 \times 1 \times 2 \times \text{Probevol.}}$$

14. Chemikalien

Außer den hier aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Boehringer, Mannheim:

Adenosin-5'-diphosphat, Natriumsalz

Adenosin-5'-monophosphat, freie Säure

Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz

Acetyl-Coenzym A, Trilithiumsals

Acetylpyridin-adenin-dinucleotid (APAD), freie Säure

Aldolase (EC 4.1.2.13)

Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1)

Coenzym A, Trilithiumsals

Dithiothreitol

DNase I (EC 3.1.21.1)

Flavin-mononucleotid, Mononatriumsals

Fructose-1,6-diphosphat, Tetracyclohexylammoniumsals

Fructose-6-phosphat, Dinatriumsals

Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4)

Glucose-6-phosphat, Mononatriumsals

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (1.1.1.49)

Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3)

GDH/TIM (EC 1.1.1.8/EC 5.3.1.1)

Hexokinase (EC 2.7.1.1)

Katalase (EC 1.11.1.6)

α -Ketoglutarat, Dinatriumsals

Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)

Luciferase (EC 1.14.14.3)

Lysozym (EC 3.2.1.17)

Myokinase (EC 2.7.4.3)

NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (EC 1.6.8.1)

NAD, Lithiumsals

NADH, Dinatriumsals

NADP, Dinatriumsals

NADPH, Tetranatriumsals

Phosphoenolpyruvat, Monokaliumsals

Phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8)

Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)

Rinderserumalbumin

Trypsin

Sigma, Deisenhofen

Acetyl-phosphat, Lithiumkaliumsalz

Carbazol

Firefly Lantern Extract (FLE-50)

Methylviologen

Ribit

Triton X-100

D-Xylulose

Fluka, Buchs

Xylose, purum

Myristinaldehyd

Na-Thioglycolat

Serva, Heidelberg

Brenztraubensäure, Natriumsalz

RNase

Natriumperjodat

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur systematischen Einordnung von *T. finni*.

Das unter dem Namen *AKO-1* beschriebene anaerobe thermophile Bakterium war bisher nicht eindeutig klassifiziert worden (Sprey et al., 1982). *AKO-1* unterscheidet sich nur wenig in physiologischen und enzymatischen Eigenschaften von zwei ebenfalls neu isolierten thermophilen Bakterien (Schmid, 1984), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Wiegel und Ljungdahl, 1981) und *Thermoanaerobium brockii* (Zeikus, 1979). Alle drei Stämme können eine Reihe von Mono- und Disacchariden, Pyruvat und Mannitol zu Ethanol, Acetat, L-Lactat, Kohlendioxid und Wasserstoff vergären (Schmid, 1984). *AKO-1* unterscheidet sich von den anderen beiden Stämmen durch die Bildung von Sporen, die aber in einer Kultur nur vereinzelt gebildet werden und nicht in UV-Licht fluoreszieren (Abb.7).

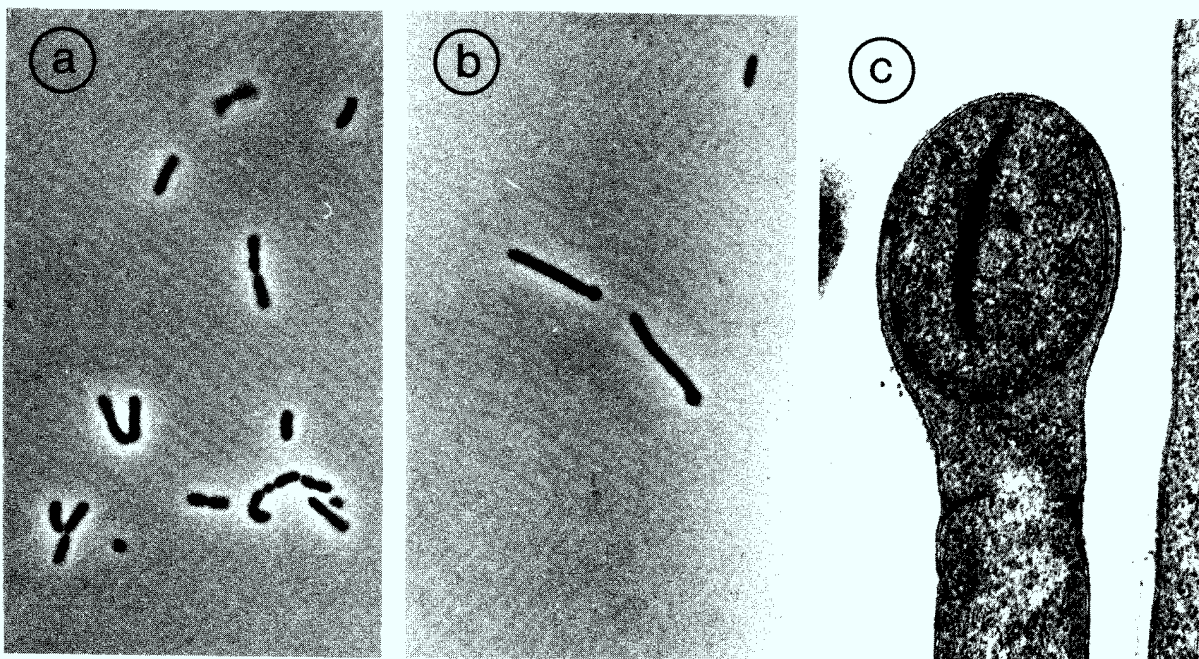


Abb. 7: a) Lichtmikroskopische Aufnahme einer *AKO-1*-Kultur
 b) Zellen mit Sporen (beide 6250fach vergrößert)
 c) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Spore im Querschnitt (x 64400, Aufnahme wurde von H.-P.Bochem gemacht).

Die weiteren taxonomischen Untersuchungen sollten nun zeigen, inwieweit *AKO-1* mit *Thermoanaerobacter ethanolicus* und *Thermoanaerobium brockii* verwandt ist.

1.1. Temperaturresistenz

Nach Inkubation von *AKO-1* bei 90 °C für 6 bis 23 Stunden zeigte sich bei der anschließenden Inkubation bei 69 °C nach 17-20 Stunden gutes Wachstum (Tab.1). Es bestand kein Unterschied in der Temperaturresistenz zwischen frisch angimpften Kulturen und log-Phase-Kulturen. Während der Inkubation bei 90 °C fand kein Wachstum statt und es konnte keine vermehrte Sporenbildung festgestellt werden, so daß Sporenbildung als Ursache für die Temperaturresistenz entfällt.

T. ethanolicus und *Ta. brockii* wuchsen bereits nach 3 Stunden Inkubation bei 90 °C nicht mehr. Diese geringere Temperaturresistenz steht in Übereinstimmung mit Messungen von Wiegel und Ljungdahl (1981) und Zeikus et al. (1979).

Tabelle 1: Temperaturresistenz von *AKO-1*, *T. ethanolicus* und *Ta. brockii*.

Die Kulturen wurden nach der Inkubation bei 90 °C auf frisches Medium überimpft, bei 70 °C inkubiert und das Wachstum gemessen.

Stamm	Inkubation bei 90 °C (h)	Wachstum bei 70 °C (ΔOD_{600nm})
<i>T. ethanolicus</i>	3	≤ 0,1
<i>Ta. brockii</i>	3	≤ 0,1
<i>AKO-1</i>	5,75	0,67
	23	0,72

1.2. Zellwanduntersuchungen

AKO-1 und *T.ethanolicus* zeigen eine Gram variable Färbung, während *Ta.brockii* Gram positiv ist. Die Zellwandteichonsäuren von Gram positiven Bakterien enthalten große Mengen an Glycerin und Ribit. Zellwandanalysen der drei Stämme erbrachten nur geringe Mengen an Ribit und Glycerin für *AKO-1* und *T.ethanolicus*.

Ta.brockii enthielt vor allem Ribit und weniger Glycerin. Für *T.ethanolicus* ist der geringe Gehalt an Ribit und Glycerin bereits von Wiegel und Ljungdahl (1981) beschrieben worden.

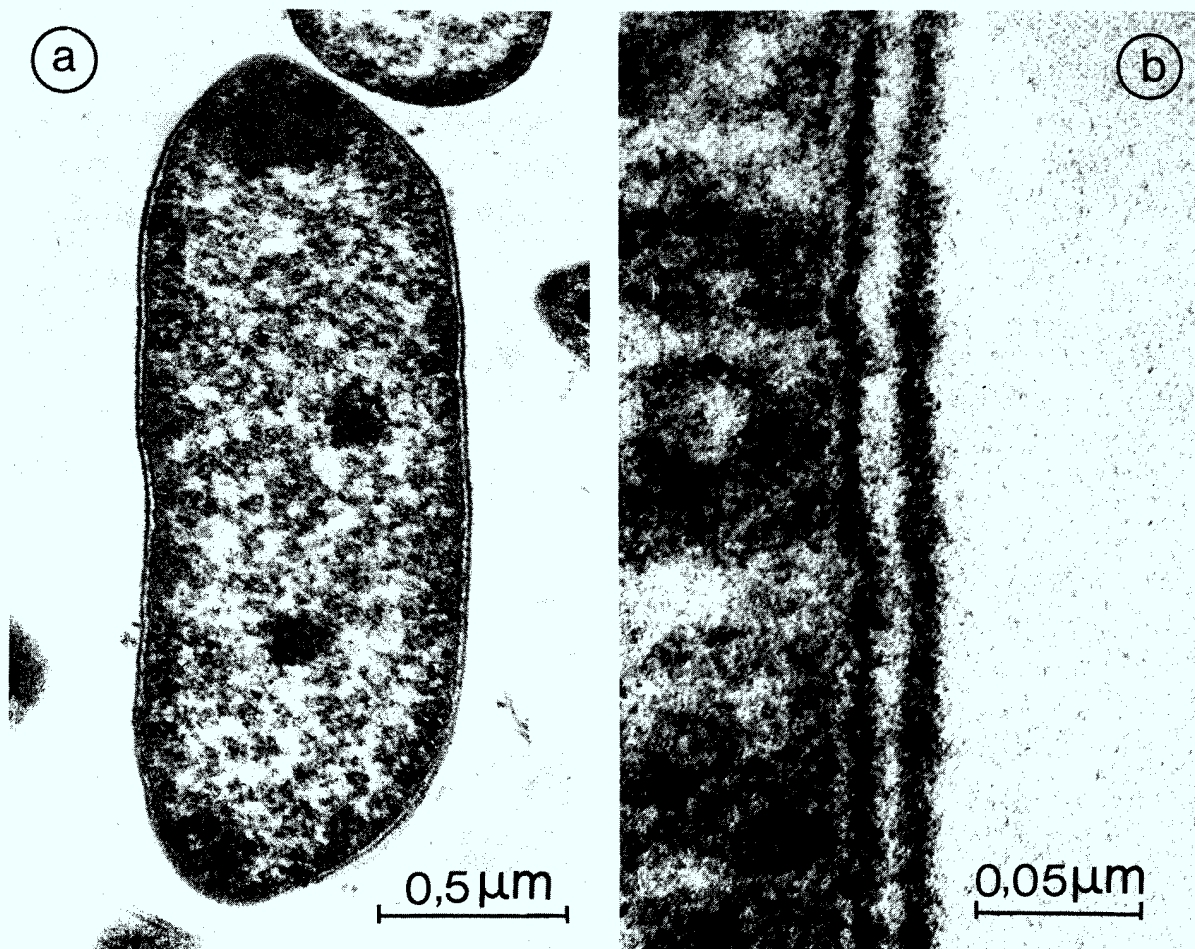


Abb.8: a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *AKO-1*
(54000fach vergrößert)
b) Vergrößerter Zellwandausschnitt von *AKO-1*
(455000fach vergrößert; die Aufnahmen wurden von
H.-P.Bochem gemacht)

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellwand von *AKO-1* weisen einen einschichtigen Aufbau auf (Abb.8), wie die Zellwand von *Ta.brockii* (Zeikus et al. 1979). *T.ethanolicus* besitzt dagegen eine doppelschichtige Zellwand, wie sie typisch für Clostridien ist (Wiegel und Ljungdahl,1981; Sleytr und Glauert, 1976).

1.3.Bestimmung des GC-Gehaltes

Der Guanin- und Cytosinanteil bakterieller DNA erstreckt sich über einen weiten Bereich von 25-75% (Bak et al.,1972), und kann als taxonomischer Marker herangezogen werden. Gleicher oder ähnlicher GC-Gehalt ist kein Beweis, aber eine Voraussetzung für eine enge phylogenetische Beziehung.

Für die Bestimmung der GC-Gehalte mußte zunächst die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA bestimmt werden. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, entsprechen die DNA-Präparationen den Reinheitskriterien, wonach das Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} größer 1,8 und A_{260}/A_{230} größer 2 sein soll (Marmur, 1961).

Tabelle 2: Konzentration und Reinheit der DNA-Präparationen.
Die Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 8.1. beschrieben.

	<i>AKO-1</i>	<i>T.ethanolicus</i>	<i>Ta.brockii</i>
Konz.der DNA (mg/ml)	1,04	1,02	1,3
A_{260} / A_{280}	1,93	1,87	1,89
A_{260} / A_{230}	2,44	2,49	2,51

Für die Bestimmung des GC-Gehaltes bedient man sich der Abhängigkeit des Schmelzpunktes der DNA vom GC-Gehalt (de Ley,1970). Die GC-Gehalte der untersuchten Organismen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Alle Werte wurden um den Differenzbetrag zwischen Meßwert und Literaturwert für *E.coli* B korrigiert (de Ley,

1970). Danach bestehen kaum Unterschiede im Schmelzpunkt bzw. GC-Gehalt der DNA zwischen den drei Stämmen.

Tabelle 3: Schmelzpunkt und GC-Gehalt der DNA von *AKO-1*, *T.ethanolicus* und *Ta.brockii* in 1 x SSC.

Die Werte wurden um den Differenzbetrag zwischen Meßwert und Literaturwert für *E.coli* B (de Ley, 1970) korrigiert.

Stamm	Schmelzpunkt in °C	GC-Gehalt (%)
<i>AKO-1</i>	83,1	31,5
<i>T.ethanolicus</i>	83,0	31,3
<i>Ta.brockii</i>	83,0	31,3
<i>E.coli</i> B gemessen	91,5	53,8
Literaturwert	90,7	52,0

1.4. DNA-DNA-Hybridisierung

Mit Hilfe der DNA-DNA-Hybridisierungen können Verwandtschaftsverhältnisse, insbesondere zwischen Prokaryonten, aufgeklärt werden. Sie erlauben eine systematische Einteilung der Organismen auf Art-, Subspezies- und zum Teil auf Gattungsebene. Eine Abgrenzung auf Familien- und Gattungsniveau ermöglicht die DNA-rRNA-Hybridisierung.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungsexperimente nach der 'optischen Methode' von de Ley et al. (1970) zusammengefaßt. Die DNA-Homologie zwischen *AKO-1* und *T.ethanolicus* betrug 75 %, zwischen *AKO-1* und *Ta.brockii* 67% und zwischen *T.ethanolicus* und *Ta.brockii* 65%. Die Kontrollexperimente mit *Peptococcus indolicus* erbrachten Homologiewerte von 21 bzw. 26%. Diese Werte liegen in einem Bereich, der durch unspezifische Bindungen zustande gekommen ist, da mit dieser Methode erst ab Homologiewerten ≥ 30 % eindeutige Aussagen zur Verwandtschaft gemacht werden können. Die ermittelten Homo-

logiewerte deuten auf eine sehr nahe Verwandtschaft zwischen *AKO-1* und *T.ethanolicus* hin, jedoch sind diese Stämme nicht identisch (persönliche Mitteilung von V.Huß).

Ebenfalls weisen diese Daten auf eine sehr nahe Verwandtschaft zwischen *Ta.brockii* und *T.ethanolicus* hin (67% Homologie), obwohl sie bisher in zwei unterschiedliche Gattungen eingeteilt wurden.

Tabelle 4: DNA-DNA-Homologiewerte

Gereinigte DNA von *Peptococcus indolicus* wurde freundlicherweise von Dr.V.Huß zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 8.3. beschrieben.

Hybridisierung	Homologie (%)
<i>AKO-1</i> x <i>T.ethanolicus</i>	75
<i>AKO-1</i> x <i>Ta.brockii</i>	63
<i>AKO-1</i> x <i>Peptococcus indolicus</i>	21
<i>T.ethanolicus</i> x <i>Ta.brockii</i>	65
<i>T.ethanolicus</i> x <i>Peptococcus indolicus</i>	26

1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den taxonomischen Untersuchungen.

Der Vergleich von *AKO-1* mit *T.ethanolicus* und *Ta.brockii* zeigte sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zwischen den drei Organismen auf.

Kaum Unterschiede bestanden zwischen *AKO-1* und *T.ethanolicus* im Substrat- und Produktspektrum (Schmid,1984), sowie im %GC-Verhältnis. Die große DNA-Homologie zwischen beiden Stämmen zeigt ebenfalls nahe Verwandtschaft an. Unterschiede bestehen vor allem im Zellwandaufbau und in der Temperaturresistenz. Während *AKO-1* einen einschichtigen Zellwandaufbau wie *Ta.brockii* aufweist, besitzt *T.ethanolicus* einen doppelschichtigen Zellwandaufbau wie *Clostridium thermohydrosulfuricum* und *Clostridium thermosaccharolyticum* (Sleytr und Glauert,1976). Ein weiterer Unterschied zwischen *AKO-1*, *T.ethanolicus* und *Clostridien* ist

die Temperaturresistenz der vegetativen Zellen (Wiegel et al., 1979).

Aufgrund der physiologischen Eigenschaften und der DNA-Homologie von 75 % zwischen *AKO-1* und *T.ethanolicus* wurde *AKO-1* in die Gattung *Thermoanaerobacter* eingeordnet und als *Thermoanaerobacter finnij* bei der DSM mit der Nummer 3389 deponiert.

Von Patel et al.(1986) und Weimer (1985) wurden kürzlich Neuisolate beschrieben, die ebenfalls in die Gattung *Thermoanaerobacter* eingeordnet wurden. Eine Klassifizierung auf Spezies-Ebene wurde aber bisher nicht vorgenommen.

2. Einfluß der Substratkonzentration auf die Endproduktbildung

2.1. Vergärung von Xylose-Glucose-Gemischen

T. finnis hat ein sehr breites Substratspektrum und kann eine Reihe von Mono- und Disacchariden sowie Pyruvat und Mannit zu Ethanol, Acetat, L-Lactat, Kohlendioxid und Wasserstoff vergären (Schmid et al., 1986). Ähnliche Substratspektren wurden für *T. ethanolicus* und *Ta. brockii* beschrieben (Wiegel und Ljungdahl, 1981, Zeikus et al., 1979). Glucose und Xylose sind schnell verwertbare Kohlenstoffquellen für *T. finnis*. Hauptendprodukt der Glucosevergärung (30 mM) ist L-Lactat gefolgt von Ethanol und Acetat (Bartsch, 1985). Xylose (33 mM) wurde überwiegend zu Ethanol abgebaut (Schmid, 1984).

Die Abbildungen 9a und b zeigen die Vergärung von Xylose-Glucose-Gemischen (je 2,5 g/l), die mit unterschiedlichen Vorkulturen beimpft wurden. Auf Xylose vorkultivierte Zellen bau

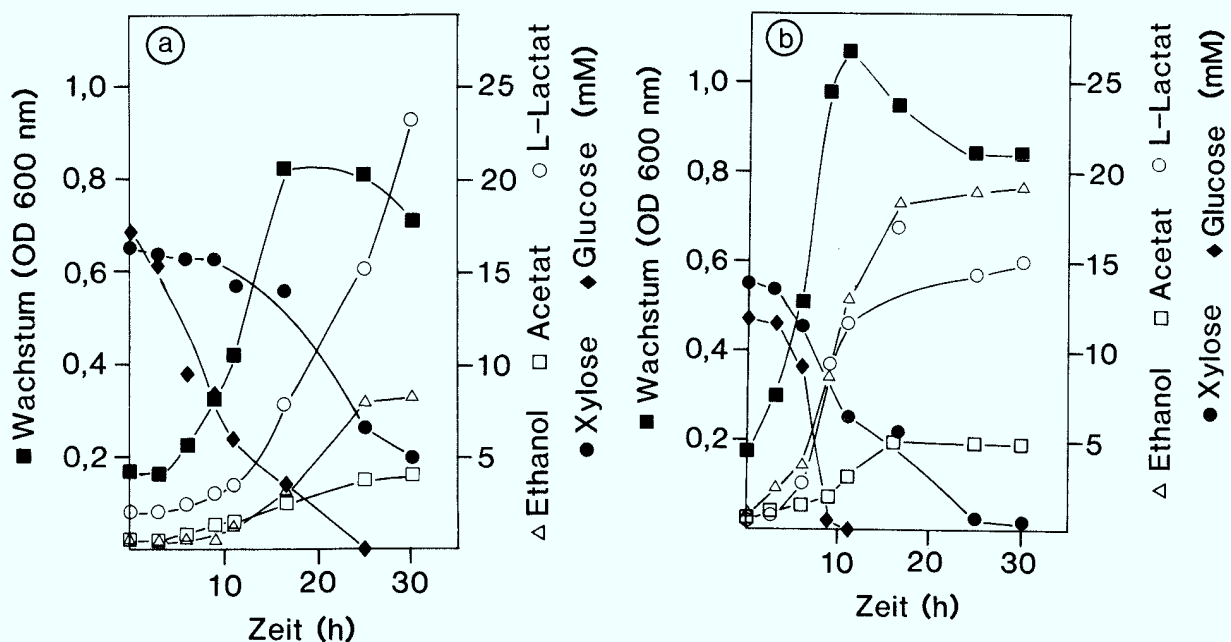


Abb.9: Vergärung eines Xylose-Glucose-Gemisches (je 2,5 g/l). Die Vorkultur war a) auf Glucose und b) auf Xylose gewachsen. Der pH fiel während der Fermentation von 7,0 auf 5,0 ab.

ten Xylose und Glucose etwa gleich schnell ab, während auf Glucose vorkultivierte Zellen zunächst Glucose abbauten, und erst wenn ca 70 % der Glucose abgebaut war, wurde Xylose verbraucht.

In Tabelle 5 ist die Bilanz für den Abbau der Xylose-Glucose-Gemische aufgeführt. Hier zeigte es sich, daß die unterschiedlichen Vorkulturen auch Einfluß auf das Produktspektrum haben. Mit Glucose vorkultivierte Zellen bildeten größere Mengen an L-Lactat, so daß das Ethanol-/Lactat-Verhältnis nur 0,3 betrug im Vergleich zu 1,3 mit Xylose vorkultivierten Zellen. Dies dürfte auf eine Aktivierung der Lactat-Dehydrogenase durch FDP zurückzuführen sein.

Tabelle 5: Endproduktbildung beim Wachstum auf Xylose-Glucose-Gemische. Die Zuckerkonzentration betrug jeweils 2,5 g/l.

	Vorkultur auf Xylose	Vorkultur auf Glucose
Zuckerverbrauch		
Xylose (mM)	13,2	11,3
Glucose (mM)	11,7	17,1
Ethanol (mM)	19,2	8,3
Acetat (mM)	4,9	4,1
L-Lactat (mM)	15,0	23,3
EtOH / Lac	1,3	0,3
EtOH Ausbeute %	49	22,5
C-Bilanz	86	67

2.2. Vergärung von Xylose in pH-statisierter Batch-Kultur

Die Vergärung von Xylose in nicht-pH-statisierten Batch-Kulturen wurde bereits untersucht (Schmid,1984). Hier hat es sich gezeigt, daß bei der Vergärung von 66 mM Xylose die Lactatbildung mit der Abnahme des pH im Medium korreliert. Blieb der pH in stark gepuffertem Medium über 6,0 wurde ein Ethanol-/Lactat-Verhältnis von 10 erhalten, im Vergleich dazu betrug das Ethanol-/Lactat-Verhältnis nur 1,75 in schwach gepuffertem Medium mit einem pH von 4,9 am Ende der Fermentation. Dies wurde auf die größere Aktivität der Lactat-Dehydrogenase bei niedrigerem pH, wie sie für *Ta.brockii* beschrieben ist, zurückgeführt (Lamed und Zeikus,1980b).

Abbildung 10 zeigt Wachstum und Endproduktbildung von *T. finnii* in pH-statisierter Batch-Kultur mit 66 mM Xylose. Aus 62 mM verbrauchter Xylose wurden 52 mM Ethanol, 16 mM Acetat und 11 mM L-Lactat gebildet. Die Ethanolausbeute betrug 0,85 mol Ethanol pro mol verbrauchte Xylose, das entspricht 51 % der Theorie (100% = 1,66 mol Ethanol/mol Xylose). Daraus ist ersichtlich, daß die Lactatbildung durch statischen pH nicht unterdrückt werden konnte.

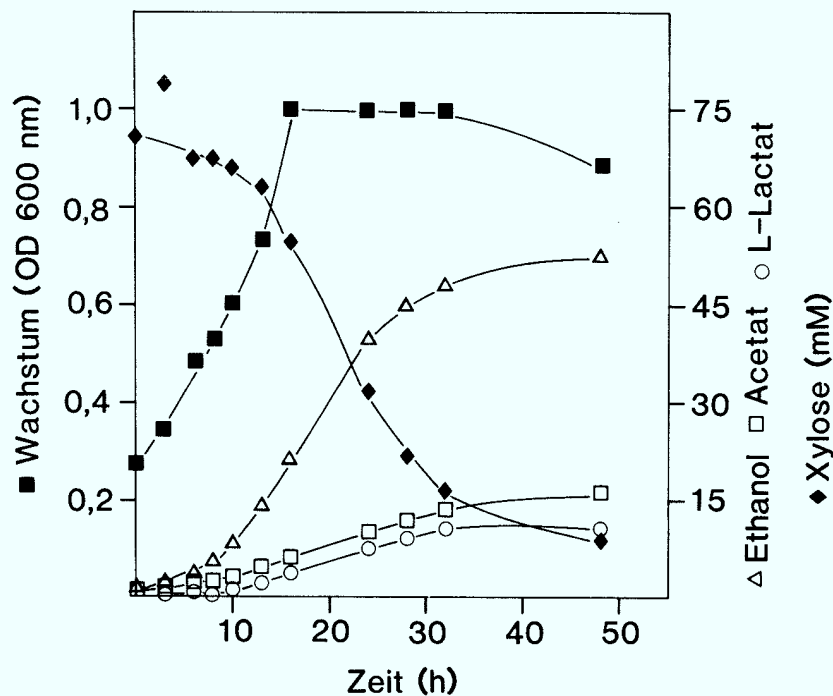


Abb.10: Vergärung von 70 mM Xylose durch *T. finnii* .

Der pH-Wert wurde während der Fermentation auf 6,8 konstant gehalten

2.3. Fed-Batch-Fermentationen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen

Substratkonzentration über 10 g/l führten bei thermophilen und mesophilen Ethanolproduzenten wie *T. ethanolicus*, *Ta. brockii*, *Clostridium thermosaccharolyticum* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* zu einer erhöhten Lactatbildung (Ljungdahl et al., 1981; Lamed und Zeikus, 1980a; Freier, 1984 und Mancuso, 1982). Avgerinos et al. (1981) und Mancuso (1982) fütterten deshalb Xylose während der Fermentation in kleinen Mengen zu, so daß die Xylosekonzentration in der Kultur zwischen 20 und 60 mM lagen. Auf diese Weise konnte die Lactatbildung reduziert werden. Auch bei der Hefe *Pachysolen tannophilus* wurde von Woods und Millis (1985) durch Zufütterung von Xylose die Ethanolausbeute positiv beeinflusst. Fed-Batch-Fermentationen haben den weiteren Vorteil, daß die Bildung von Karamellisierungsprodukten, hervorgerufen durch hohe Zuckerkonzentrationen und hohe Temperaturen (Bridson und Brecker, 1970) eingeschränkt wird.

Abbildung 11 zeigt eine Fed-Batch-Fermentation von *T. finnis* mit Xylosekonzentrationen von 20 bis 60 mM. Die erreichte optische Dichte war fast 2,5 mal so groß wie bei den Batch-Fermentationen. Nach 16,5 Stunden, mit Beginn der Zufütterung von Xylose, ging die Wachstumsrate von $0,125 \text{ h}^{-1}$ auf $0,02 \text{ h}^{-1}$ zurück. Nach Erreichen der maximalen OD von 2,8 nahm die OD langsam ab. Aber auch in der stationären Phase wurden Endprodukte gebildet. Aus insgesamt 200 mM Xylose wurden in 80 Stunden 230 mM Ethanol, 75 mM Acetat und nur Spuren an Lactat gebildet. Die Ethanolausbeute betrug 1,15 mol Ethanol/mol verbrauchte Xylose, das entspricht 70 % der Theorie. Die Lactatbildung konnte unter diesen Bedingungen weitestgehend unterdrückt werden, so daß das Ethanol-/Lactat-Verhältnis 93 betrug. Das Ethanol-/Acetat-Verhältnis betrug 3,1.

Nach Erreichen von ca. 200 mM Ethanol (=1,16 % v/v) ging die Ethanolbildung und der Xyloseverbrauch zurück. Der Grund hierfür dürfte die geringe Ethanoltoleranz von *T. finnis* sein. Die Wirkung von Ethanol auf das Wachstum wurde bereits untersucht. Wurde Kulturen extern Ethanol zugegeben, so betrug die Hemmung des Wachstums bei 1 % (v/v) Ethanol bereits 40 %, bei 2,5 % (v/v)

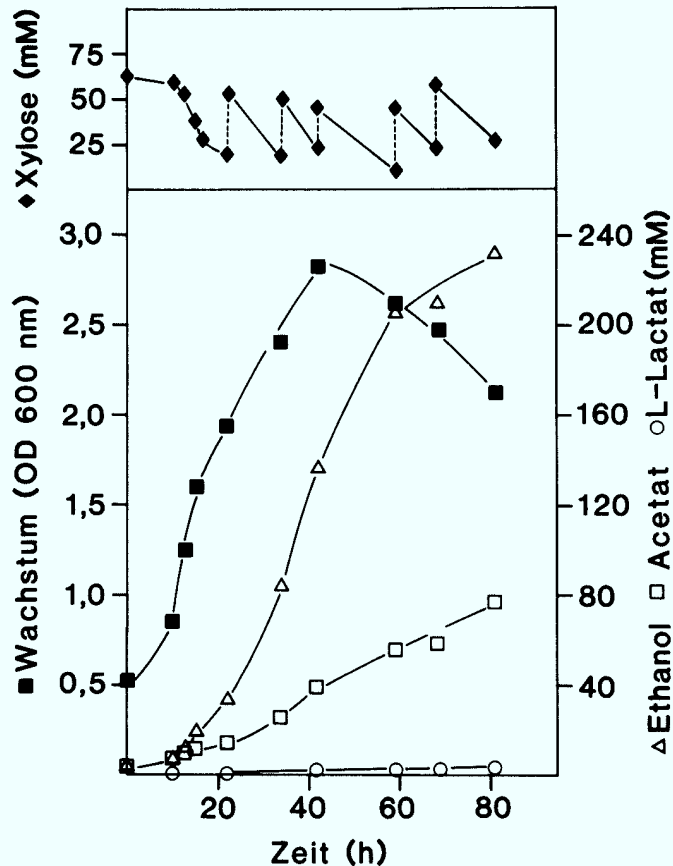


Abb.11: Zeitlicher Verlauf der Xyloseverwertung unter Fed-Batch-Bedingungen. Die Xylosekonzentration bewegte sich zwischen 20 und 60 mM.

Ethanol bereits über 70 % (Schmid,1984).

In einer weiteren Fed-Batch-Fermentation wurde die stationäre Xylosekonzentration bis auf 100 mM erhöht (Abb. 12). Dies bewirkte sowohl eine Zunahme der Wachstumsrate als auch der Xyloseverbrauchsrate (Tab. 6). Dieser erhöhte Substratverbrauch führte jedoch zu einer Erhöhung der Lactatbildung auf Kosten der Ethanolbildung, so daß das Ethanol-/Lactat-Verhältnis auf 1,9 zurückging. Das Ethanol-/Acetat-Verhältnis verschlechterte sich ebenfalls von 3,1 auf 1,6 im Vergleich zur Fed-Batch-Fermentation mit 20 bis 60 mM Xylose. Die Ethanolausbeute betrug in diesem Fall nur noch 0,56 mol/mol Xylose.

Vergleicht man die spezifischen Gärraten bei den unterschiedlichen Zufütterungsraten (Tab. 6), so fällt auf, daß die maxi

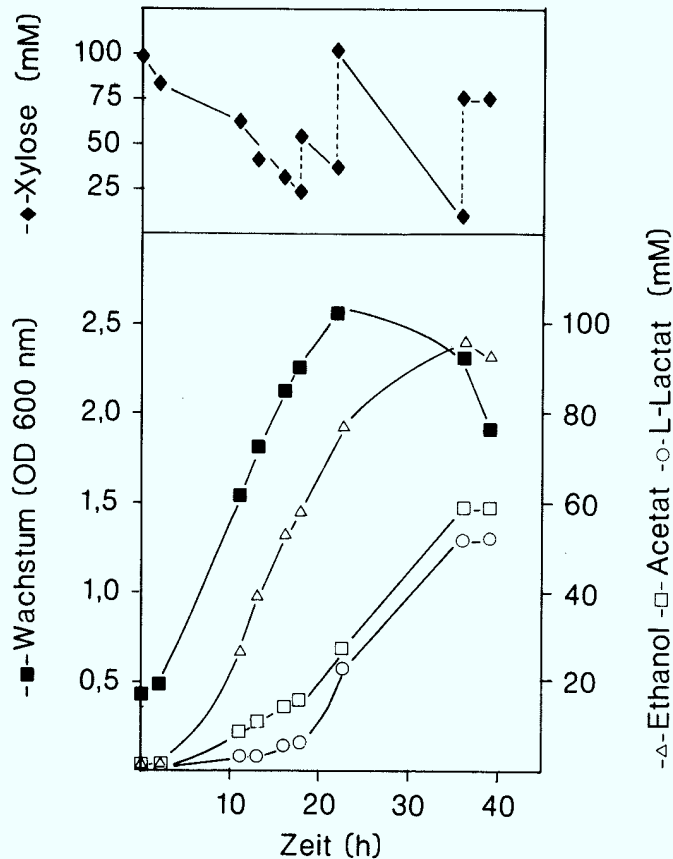


Abb.12: Zeitlicher Verlauf der Xyloseverwertung unter Fed-Batch-Bedingungen. Die Xylosekonzentration bewegte sich zwischen 15 und 100 mM.

male Ethanolbildungsrate in beiden Fällen mit 5,2 bzw. 4,56 mmol/l·h annähernd gleich ist, während im gleichen Maße wie die Xyloseverbrauchsrate zunahm, von 3,26 auf 5,11 mmol/l·h, stieg die Lactatbildungsrate von 0,03 auf 1,52 mmol/l·h an. Die Acetatbildungsrate blieb wiederum mit 1,13 bzw. 1,25 mmol/l·h annähernd gleich. Diese Daten zeigen, daß der Metabolitfluß in Richtung Ethanol und Acetat unabhängig von der Xyloseverbrauchsrate ist, und daß eine Erhöhung der Xyloseverbrauchsrate nur zu einem Metabolitfluß in Richtung Lactat führt.

Tabelle 6: Vergleich von Fed-Batch-Fermentationen mit niedriger und hoher stationärer Xylosekonzentration.

Xylosekonz. (mM)	20 - 60	11 - 100
Fermentationsdauer (h)	81	39
max. OD _{600nm}	2,8	2,5
Xyloseverbrauch (mM)	202	171
Ethanol (mM)	232,6	96,7
Acetat (mM)	75,5	59,0
L-Lactat (mM)	2,5	51,7
C-Bilanz (%)	91	73
mol EtOH / mol Xylose	1,15	0,56
EtOH-Ausbeute (%)	69	34
EtOH / Ac	3,1	1,6
EtOH / Lac	93	1,9
Spezif. Gärraten		
Ethanol (mmol/l·h) ¹	5,2	4,56
Acetat (mmol/l·h) ²	1,23	1,25
L-Lactat (mmol/l·h) ²	0,04	1,52
Xylose (mmol/l·h) ²	3,26	5,11

¹ maximale Ethanolbildungsrate

² Fermentationsraten zum Zeitpunkt der max. Ethanolbildungsrate

2.3.1. Einfluß von Hefeextrakt, Eisensulfat und Ammoniumchlorid auf Wachstum und Endproduktbildung

Zusätzlich zur Xylose wurde in den Fed-Batch-Fermentationen pro 5 g Xylose jeweils noch Hefeextrakt (1 g), Ammoniumchlorid (50 mg) und Eisensulfat (1 mg) zugefüttert, um eine mögliche Stickstoff- und Eisenlimitierung auszuschalten. Zeikus et al. (1981) konnten in einer kontinuierlichen Kultur von *Clostridium thermohydrosulfuricum* zeigen, daß Stickstofflimitierung die

Tabelle 7: Einfluß von Hefeextrakt, Eisensulfat und Ammoniumchlorid auf Wachstum und Endproduktbildung

Das Kontrollmedium enthielt neben 5 g/l Xylose 2 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l Ammoniumchlorid und 3 mg/l Eisensulfat. Die OD wurde nach 15-38,5 Stunden bestimmt.

Zusatz (g/l bzw. mg/l)	Wachstum ΔOD_{max}	Endproduktverhältnisse	
		EtOH/Ac	EtOH/Lac
Kontrolle	0,37	3,1	1,9
0,75 Ammoniumchlorid	0,42	3,7	2,5
1	0,41	3,3	2,5
4 Hefeextrakt	0,66	4,6	2,5
6	1,03	4,7	3,7
8	0,82	4,3	4,9
10	0,82	4,6	4,4
4 Eisensulfat	0,48	3,6	2,7
5	0,62	4,2	4,8
10	0,59	4,3	5,9
15	0,75	4,3	4,4
20	0,61	4,4	4,3
25	0,55	4,3	4,1
30	0,54	3,6	4,1

Lactatbildung begünstigt. Freier (1984) fand bei *Clostridium acetobutylicum* unter Eisenlimitierung eine sehr viel höhere Lactat-Dehydrogenase-Aktivität.

In 10 ml-Kulturen mit 33 mM Xylose wurde der Einfluß dieser Komponenten auf Wachstum und Endproduktbildung getestet (Tab. 7). Durch erhöhte Eisensulfatmengen (10-15 mg/l) und Hefeextraktmengen (≥ 6 g/l) verbesserte sich sowohl das Ethanol-/Acetat-Verhältnis, wie auch das Ethanol-/Lactat-Verhältnis, wobei sich das Ethanol-/Lactat-Verhältnis stärker verbesserte als das Ethanol-/Acetat-Verhältnis. Höhere Konzentrationen an

Eisensulfat (≥ 20 mg/l) führten zu keiner weiteren Verbesserung des Wachstums und des Ethanol-/Lactat-Verhältnisses, hemmten jedoch das Wachstum. Hefeextrakt förderte dagegen das Wachstum in Konzentrationen bis zu 6 g/l.

2.3.2. Untersuchungen zur C-Bilanz in Fed-Batch-Fermentationen

Die C-Bilanz errechnete sich aus der Summe an Ethanol, Acetat und L-Lactat im Vergleich zum gemessenen Xyloseverbrauch. Aus 1 mol Xylose können 1,66 mol Ethanol oder Acetat oder L-Lactat gebildet werden. Unberücksichtigt blieb die Biomasse. In anaeroben thermophilen Bakterien wie *Ta.brockii*, *T.ethanolicus* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* werden ca. 10% der Kohlenstoffquelle in die Biomasse eingebaut (Sonnleitner, 1983).

In vorangegangenen Fed-Batch-Fermentationen betrug die C-Bilanz nur 70%, das heißt nur 70 % des gemessenen Xyloseverbrauchs wurde in Form von Endprodukten wiedergefunden. Diese schlechten C-Bilanzen tauchten nur in Fermentationen mit einem Substratangebot zwischen 10 und 20 g/l auf. Weitere Endprodukte konnten gaschromatographisch nicht nachgewiesen werden. Der Verlust an Ethanol durch Verdampfen bei 69 °C wurde mittels Gaschromatographie überprüft. Nur wenige mmol/l Ethanol waren in der Gasphase nachweisbar. Die Xylosebestimmung mit Dinitrosalicylsäure (DNS) wurde durch Zuckeranalysen mit einem Biotronik-Zuckeranalysator und Bicinchoninat als Farbreagenz überprüft

Tabelle 8 zeigt im Vergleich die Zuckeranalysen von Proben aus verschiedenen Fed-Batch-Fermentationen mit 60-100 mM Substrat. Mit der DNS-Methode wurden zwischen der 3 bis 20fachen Menge an Xylose ermittelt, als mit dem Zuckeranalysator. Diese Differenzen kamen durch unterschiedliche Mengen an reduzierenden Zuckern, vor allem D-Xylulose, zustande, die während der Fermentation gebildet worden waren. Mit steigender Substratkonzentration nahm die gebildete Xylulosemenge zu, mit Rückgang der Xylosekonzentration in der Kultur wurde aber auch Xylulose abgebaut. Da die Analysen mit dem Zuckeranalysator erst zwei Monate nach Versuchsende gemacht wurden, kann es sein, daß die in Tabelle 8 angegebenen Mengen kleiner sind als die tatsächli-

chen, da Xylose und vor allem Xylulose, die sehr instabil ist, bereits zerstört worden war. Das Auftreten von Xylulose, die die Xylosebestimmung mittels DNS-Reagenz stört, kann eine Ursache für die Differenzen in der C-Bilanz sein.

Tabelle 8 : Vergleich der Zuckerbestimmung mittels DNA-Methode und Biotronik-Zuckeranalysator mit Cu-Bicinchoninat als Nachweisreagenz.

Probe	DNS-Methode (mM)	Zuckeranalysator			
		Xylose	Xylulose	Ribose	Arabinose
1 36 h	9,1	2,0	0,3	0,3	1,6
	87 h	84,2	29,6	10,3	5,5
2 27 h	41,3	16,6	2,6	1,1	4,6
	62 h	15,3	0,7	0,4	0,8

2.4. Xylosevergärung mit konzentrierten Zellsuspensionen von *T. finni*

Konzentrierte Zellsuspensionen bzw. ruhende Zellen bieten einige Vorteile. So kann damit die Raum-Zeit-Ausbeute drastisch erhöht werden, oder eine Wachstumshemmung durch Endprodukte umgangen werden. Die Möglichkeit, daß im nichtwachsenden Zustand manche Endprodukte nicht gebildet werden, wie z.B. Acetat, bei dessen Bildung ATP entsteht, das für das Wachstum benötigt wird, kann zu einer Erhöhung der Ausbeute führen (Wiegel et al., 1983).

Da es sich in den Fed-Batch-Fermentationen gezeigt hat, daß *T. finni* auch in der stationären Phase Ethanol bildet, wurde im folgenden untersucht, inwieweit die Ethanolbildung unter nichtwachsenden Bedingungen stabil ist, und ob auch hier mit der Methode des limitierenden Substratangebotes die Lactatbildung unterdrückt werden kann.

Die Ethanolbildung aus Xylose mit ruhenden Zellen ist bereits beschrieben worden, so z. B. die Vergärung von Glucose, Xylose und Stärke durch *T. ethanolicus* (Wiegel et al., 1983) und die Vergärung von Glucose-Xylose-Gemischen und Haferhydrolysat durch *Candida shehatae* ATCC 22984 (Wayman und Parekh, 1985).

Zellen von *T. finnis* aus der exponentiellen Phase wurden ca 20fach konzentriert und in verschiedenen Ansätzen entweder 66 mM Xylose vorgegeben und dann zugefüttert, so daß die Xylosekonzentration im Medium nicht über 66 mM anstieg, oder es wurden gleich zu Beginn 200 mM Xylose zugesetzt. Gleichzeitig wurden den Ansätzen unterschiedliche Hefeextraktmengen zugegeben. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, zeigte Hefeextrakt auch hier, wie in den Batch-Fermentationen, einen deutlichen Einfluß auf die Lactatbildung, den Xyloseverbrauch und die maximale Ethanolbildungsrate. Im Falle des Fed-Batch-Ansatzes verbesserte sich das Ethanol-/Lactat-Verhältnis von 1,7 bei 2 g/l Hefeextrakt auf 5,5 bei 6 g/l Hefeextrakt. Sowohl der Xyloseverbrauch als auch die maximale Ethanolbildungsrate stiegen in den Ansätzen mit bis zu 66 mM und 200 mM Xylose. Welche Komponente des Hefeextraktes die Ursache hierfür ist, ist unbekannt, da in den Ansätzen gar kein oder nur sehr geringes Wachstum stattfand und bei anderen thermophilen Bakterien sich gezeigt hatte, daß Hefeextrakt vor allem zum Wachstum benötigt wird (Mancuso, 1982; Murray und Khan, 1983).

Die Substratkonzentration beeinflusste auch hier wieder die Zusammensetzung der Endprodukte. Unter Fed-Batch-Bedingungen mit 13 bis 66 mM Xylose im Medium erhielt man ein besseres Ethanol-/Lactat-Verhältnis als mit 200 mM Substrat.

Im Gegensatz zu "ruhenden Zellen" von *T. ethanolicus*, die nur Spuren an Acetat bildeten (Wiegel et al., 1983) kam es bei *T. finnis* unter diesen Bedingungen zu beträchtlicher Acetatbildung, so daß das Ethanol-/Acetat-Verhältnis bei 30 g/l Xylose nur 1,2 betrug. Eine mögliche Ursache wäre, daß durch das ständige Nachtitrieren des pH per Hand und während der häufigen Probenentnahme Wasserstoff sehr gut entweichen konnte, und so die erhöhte Acetatbildung ermöglichte.

Tabelle 9: Xylosevergärung mit konzentrierten Zellsuspensionen von *T. finni*

Die Zellen wurden in Medium mit 0,2 bzw. 0,6% Hefeextrakt und 1 bzw. 3% Xylose suspendiert. In den Ansätzen mit 1% Xylose wurde Xylose periodisch nachgefüttert. Der pH wurde bei $7,2 \pm 0,3$ konstant gehalten.

	1% Xylose		3% Xylose		1% Xylose
	0,2% HE	0,6% HE	0,2% HE	0,6% HE	0,6% HE
	(Fed-Batch)				160 mM EtOH
Inkubationszeit(h)	10	10	9	7,5	9,5
Zellkonz.(g/l)	6,2	6,04	7,7	7,2	6,12
Ethanol (mM)	135,8	221,75	69,5	90,6	97,2
Acetat (mM)	43,5	55,2	56,6	73,5	62,5
L-Lactat(mM)	79,2	40,3	29,7	59,2	58,3
Xylose (mM)	198,7	236,8	197,2	223,4	205,0
C-Bilanz (%)	78	80	47,5	60	64
Ethanol/Acetat	3,1	4,0	1,2	1,2	1,6
Ethanol/Lactat	1,7	5,5	2,3	1,5	1,6
Spezif.Gärraten					
(mmol/g TG·h)					
Ethanol	3,4	5,4	2,3	3,74	5,33
Acetat	0,77	1,6	3,4	2,6	3,5
L-Lactat	1,4	1,4	1,74	2,9	3,72
Xyloseverbrauch	3,5	5,6	9,6	9,9	7,54

Insgesamt konnte die Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber den bisherigen Fermentationen um ca das sechsfache, von 5,2 auf 32,5 mmol Ethanol/l·h gesteigert werden. Die Ethanolbildungsraten waren allerdings nur in den ersten 1,5-4,5 Stunden linear und gingen dann auf 50-60%, nach 9-10 Stunden sogar auf 33% der Anfangsrate zurück. Ein Grund hierfür könnte die Hemmung durch Ethanol sein. Dies wurde in einem weiteren Ansatz, dem zu Beginn schon 160 mM Ethanol zugegeben wurden, überprüft (Tab. 9). Wurden nach 4 Stunden Inkubation ca. 240 mM Ethanol erreicht, ging der Xyloseverbrauch und die Endproduktbildung sehr stark zurück. An

welcher Stelle im Stoffwechsel bzw. in der Zelle der Alkohol eingreift ist nicht bekannt. Für *T. ethanolicus* ist beschrieben worden, daß die Ethanolbildung bis zu 10 Stunden linear verläuft, allerdings wurde in keinem Fall 200 mM Ethanol erreicht (Wiegel et al., 1983).

Beim Vergleich der spezifischen Fermentationsraten (mmol/g TG·h) zeigte es sich, daß bei einer Substraterhöhung die spezifische Ethanolbildungsrate zurückging, während die Acetat- und Lactatbildungsrate zunahm. Dieses Verhalten war auch bei den Fed-Batch-Fermentationen im 1l-Fermenter mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu beobachten.

2.5. Fed-Batch-Fermentationen mit kontinuierlichem Alkoholabzug

Bei den bisherigen Fermentationen nahm nach Erreichen von ca 200 mM Ethanol sowohl der Xyloseverbrauch als auch die Ethanolbildung ab. Die Ursache hierfür dürfte die geringe Ethanoltoleranz von *T. finnis* sein. Die Entfernung des Alkohols aus dem Medium ist eine Möglichkeit die geringe Ethanoltoleranz auszuschalten. Es gibt verschiedene Methoden um den Alkohol kontinuierlich aus der Kultur zu entfernen. Finn und Ramalingham (1977) und Cysewski und Wilke (1977) entzogen einer *Saccharomyces cerevisiae*-Kultur den gebildeten Alkohol mit Hilfe von Vakuum. Chung und Lee (1985) nutzten die selektive Adsorption von Ethanol an hydrophobe Silicalite um semikontinuierlich den Alkohol zu entfernen. Atkinson et al. (1975) nutzte bei der Glucosevergärung durch *Bacillus stearothermophilus* die hohe Inkubationstemperatur (60°C) aus, um kontinuierlich den Alkohol mittels eines N₂-Gasstromes zu entfernen. In allen Fällen konnte die hemmende Wirkung des Ethanol umgangen und insgesamt eine höhere Ethanolbildung erzielt werden.

Zur Entfernung des Alkohols im Verlaufe von Fed-Batch-Fermentationen mit *T. finnis* wurde das Verfahren nach Atkinson et al. (1975) ausgewählt, da der Alkohol bei 70°C schon leicht flüchtig ist und so bereits durch einen geringen Gasstrom ent-

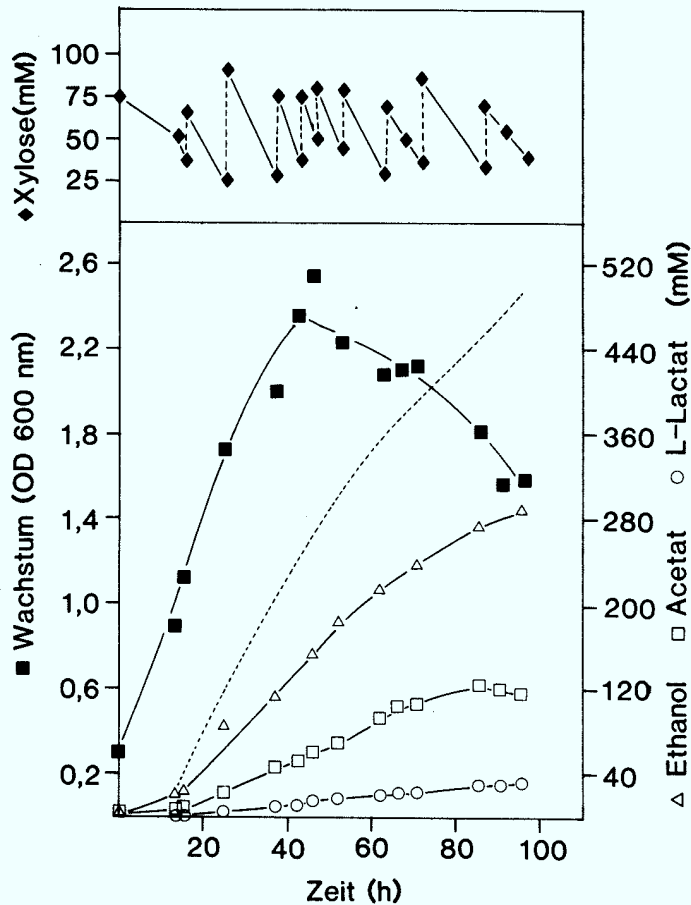


Abb.13: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung unter Fed-Batch-Bedingungen mit niedrigen stationären Xylosekonzentrationen, bei gleichzeitigem kontinuierlichem Alkoholabzug (Strip-Destillation). - Δ - nachgewiesene; ---- anhand des Zuckerverbrauchs errechnete Ethanolmenge.

fernt werden kann. Ein Problem hierbei ist allerdings den im Gasstrom gelösten Alkohol effektiv wieder durch Kondensation zurückzugewinnen.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen den Verlauf von Fed-Batch-Fermentationen mit kontinuierlichem Ethanolabzug bei hohen und niedrigen Substratkonzentrationen. Die Ethanolkonzentration im Medium lag in beiden Fällen während der gesamten Fermentationszeit unter 100 mM.

Wachstum und Biomassebildung wurden nicht beeinflusst, jedoch der Xyloseabbau. Dieser konnte von bisher 200-230 mM auf über

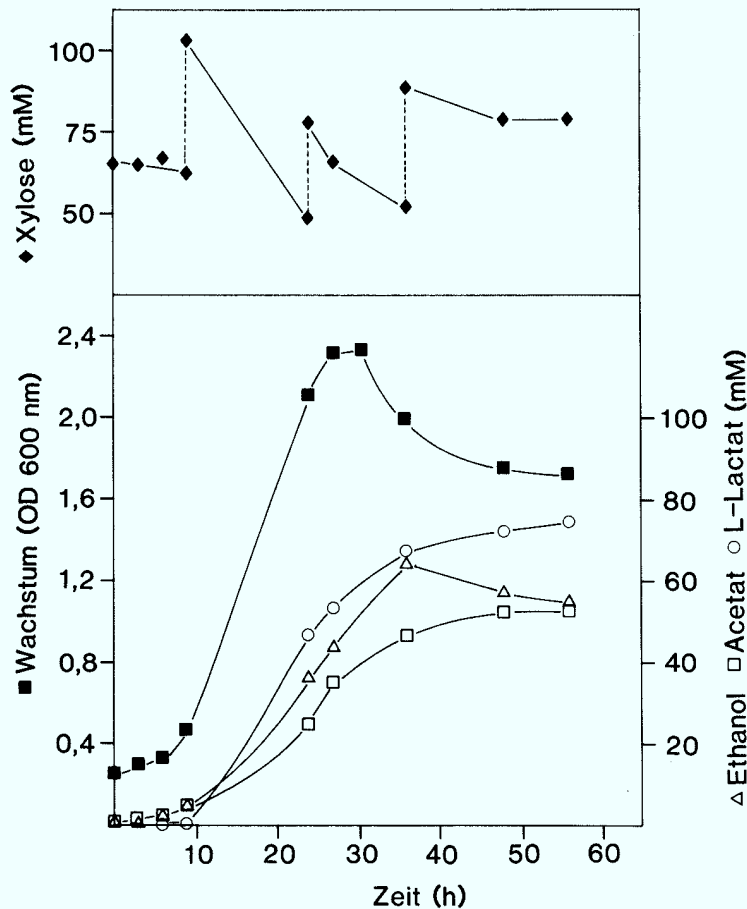


Abb.14: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung unter Fed-Batch-Bedingungen mit hohen stationären Xylosekonzentrationen, bei gleichzeitigem kontinuierlichen Alkoholabzug (Strip-Destillation). Die abgebildete Ethanolmenge beinhaltet nur die nachgewiesene Ethanolmenge.

400 mM gesteigert werden. Dies ging mit einer Verlängerung der Produktionsphase von 80 auf 100 Stunden einher. Die stationäre Xylosekonzentration hatte wieder einen starken Einfluß auf die L-Lactatbildung. Bei kleinen Zufütterungsraten blieb die Lactatbildung gering, so daß das Ethanol-/Lactat-Verhältnis 9,3 betrug im Vergleich zu 0,87 bei einem Substratangebot zwischen 50 und 150 mM (siehe Tabelle 10). Leider konnte die tatsächlich gebildete Menge Ethanol nicht bestimmt werden, da der im Gasstrom gelöste Alkohol nicht vollständig kondensiert und damit nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt sich an der schlechten C-Bilanz von 62% (Tab. 10). Anhand des Zuckerverbrauchs kann

Tabelle.10: Vergleich der Fed-Batch-Fermentationen mit kontinuierlichem Alkoholabzug bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Die Abschätzung der tatsächlich gebildeten Ethanolmenge erfolgte anhand des Zuckerverbrauchs. Die Werte in Klammern geben die Produktverhältnisse mit der geschätzten Ethanolmenge wieder.

stat. Xylosekonz. (mM)	30-90	50-150
Fermentationsdauer(h)	95	56
max.OD _{600nm}	2,4	2,3
max.EtOHkonz.im Medium(mM)	104	35
Ethanol, nachgewiesen (mM)	290	64,5
Ethanol, berechnet (mM)	480	150
Acetat (mM)	117	52,7
L-Lactat (mM)	31	74,4
Xyloseverbrauch (mM)	420,8	185,3
C-Bilanz (%)	62	62
mol Ethanol/mol Xylose	0,69(1,1)	0,35(0,8)
Ethanol/Acetat	2,5 (4,1)	1,2 (2,8)
Ethanol/Lactat	9,3 (15,5)	0,87(2,0)

man jedoch die tatsächlich produzierte Menge Ethanol abschätzen, vorausgesetzt keine anderen Produkte als Ethanol, Acetat und Lactat wurden gebildet. Im Falle der Fermentationen mit niedrigem Substratangebot betrug die gebildete Ethanolmenge 480 mM (=2,8%v/v) und im Falle der Fermentation mit hoher stationärer Xylosekonzentration 150 mM (=1% v/v) (Tabelle 10). Mit diesen Werten ergeben sich Ethanol-/Lactat-Verhältnisse von 15,5 bzw.2,0 und Ethanol-/Acetat-Verhältnisse von 4,1 bzw. 2,8 (siehe Tabelle 10). Diese Verhältnisse entsprechen in etwa den Verhältnissen in Fed-Batch-Fermentationen ohne Ethanolabzug. Das bedeutet, daß die im Medium vorhandene Ethanolkonzentration

keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der Endprodukte hat, und daß die Ethanolbildung keiner Endprodukthemmung unterliegt. Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an der NADPH-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase von *T.ethanolicus*, *Ta.brockii* und *T.finnii*, die auch noch in Gegenwart hoher Ethanolkonzentrationen aktiv ist (Bryant et al., 1981; Lamed, 1981 a und b; Schmid, 1984).

3. Untersuchungen zu Enzymaktivitäten im Xylosemetabolismus

Der Xyloseabbauweg in thermophilen Bakterien ist nur teilweise aufgeklärt. Von *T.finnii* sind bisher nur einzelne Schritte, wie die Transaldolase als Markerenzym des Pentosephosphatweges, die Lactat-Dehydrogenase und die Alkohol-Dehydrogenase, untersucht worden (Schmid, 1984). Die Lactat-Dehydrogenase wird durch Fructose-1,6-diphosphat aktiviert, wie es bereits schon für die Lactat-Dehydrogenasen von anderen thermophilen Bakterien beschrieben worden ist (Lamed und Zeikus, 1980b; Carreira et al., 1982; Freier, 1984; Germain et al., 1986; Ben-Bassat, 1980). *T.finnii* besitzt sowohl eine NADH- als auch NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität, wobei die NADH-abhängige Aktivität nur ca 10% der NADPH-abhängigen Aktivität ausmacht (Schmid, 1984). NADPH entsteht aber während des Xyloseabbaus nicht, sondern kann nur durch Elektronenübertragung von reduziertem Ferredoxin durch Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktasen gebildet werden.

Im folgenden wurden nun sowohl die Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktase-Aktivitäten in *T.finnii* als auch die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität untersucht. Ergänzt wurden sie durch die Bestimmung glykolytischer Enzymaktivitäten.

3.1. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Xylosemetabolismus und der Glycolyse

Xyloseisomerase

Eingangsenzym für den Xylosemetabolismus in thermophilen anaeroben Bakterien ist die Xyloseisomerase (Sachdev und Mutharasan, 1984). Die Aktivität dieses Enzymes ist von zweiwertigen Metallionen abhängig, wobei Mn^{2+} und Co^{2+} stärker aktivieren als Mg^{2+} (Tab.13). Die Aktivität ohne Metallionenzusatz zum Testansatz dürfte auf noch vorhandene Metallionen im Rohextrakt zurückzuführen sein. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum bei ca 80°C. Ähnliche Kationenabhängigkeiten und ein vergleichbares Temperaturoptimum wurden für eine Reihe anderer Xyloseisomerasen aus Bakterien beschrieben, wie *T.ethanolicus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptomyces*-, *Bacillus*- und *Arthrobacter*-Arten (Sachdev und Mutharasan, 1984; Yamanaka, 1968; van Tilburg, 1984).

Tabelle 13: Xyloseisomerase-Aktivität in Rohextrakten von *T.finnii*. Wirkung von zweiwertigen Metallionen und Temperaturabhängigkeit. Die Metallionenkonzentration im Testansatz betrug 0,66 mM.

Aktivator	Temp. (°C)	spez. Aktivität (U/mg Protein)
$MnCl_2$	60	0,58
	80	1,25
	85	0,96
$CoCl_2$	60	0,43
	80	1,97
	85	1,77
$MgCl_2$	60	0,27
	80	0,80
	85	0,73
ohne	80	0,20

Xylulosekinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase

In Fed-Batch-Fermentationen mit einem Substratangebot zwischen 66 und 100 mM wurde Xylulose im Medium nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine zu geringe Xylulosekinase-Aktivität oder aber ATP-Mangel. Die gemessene Xylulosekinase-Aktivität von 0,33 U/mg Protein (bei 40 °C) deutet aber nicht auf eine zu geringe Xylulosekinase-Aktivität hin, als Ursache für das Auftreten von Xylulose im Medium.

Als weitere Kinase-Aktivitäten wurden die Phosphofruktokinase und die Pyruvatkinase bestimmt (Tab.14). Die Phosphofruktokinase wurde weder durch ADP aktiviert noch durch Phosphoenolpyruvat inhibiert, wie dies für *Streptococcus lactis* und *E.coli* beschrieben ist (Allison et al.,1982; Kotlarz und Buc,1982).

Tabelle 14: Kinaseaktivitäten in Rohextrakten von *T.finnii*.

Enzym	Reaktion	spez.Aktivität (U/mg Protein)
Xylulosekinase	Xylulose \longrightarrow Xylulose-5-P	0,33
Phosphofruktokinase	Fruc-6-P \longrightarrow Fruc-1,6-diP	0,25
Pyruvatkinase	PEP \longrightarrow Pyruvat	0,17

Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase

Die Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase wurde getestet, um auszuschließen, daß bei diesem Reaktionsschritt eventuell NADPH gebildet wird. Die Aktivität ist mit 0,69 U/mg Protein bei 40 °C hoch. Dieses Enzym benötigt Kalium-Ionen, da ohne Kalium-Zugabe die Aktivität nur 0,132 U/mg Protein betrug. Mit NADP als Substrat konnte keine Aktivität gemessen werden.

3.2. Ferredoxin-abhängige Enzymaktivitäten

Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen

Von saccharolytischen Clostridien ist bekannt, daß die Aktivität und Regulation der Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen die Zusammensetzung der Endprodukte maßgeblich beeinflusst (Jungermann et al., 1973; Petitdemange et al., 1976). Lamed und Zeikus (1980a) führen sogar Unterschiede im Endproduktspektrum von *Clostridium thermocellum* und *Ta. brockii* auf unterschiedliche Aktivitäten dieser Oxidoreduktasen zurück.

In Tabelle 11 sind die gemessenen Aktivitäten zusammengefaßt. Mit 1,12 U/mg Protein wurde die größte Enzymaktivität in Richtung NADH-Bildung gemessen, so daß von reduziertem Ferredoxin bzw. Methylviologen die Elektronen bevorzugt auf NAD übertragen werden. Die Reaktion verlief allerdings nur zwei Minuten

Tabelle 11: Spezifische Aktivitäten der Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen in Rohextrakten von *T. finnis*

Aktivität	Zusätze	spez. Aktivität (U/mg Protein)
Ferredoxin-NAD-Oxidoreduktase		1,125
	+0,4 mM NADH	0,92
	+1,0 mM NADH	0,34
NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase		0,50
	+1,0 mM NAD	0,29
	+0,1 mM Acetyl-CoA	0,50
Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase		0,10
	+0,2 mM NADPH	0,001
NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase		0,023

linear, was darauf hindeutet, daß NADH hemmend auf die Reduktion von NAD wirkt. Bei Zugabe von NADH zum Testansatz betrug die Hemmung bei 0,4 mM NADH 20 % und bei 1 mM 70 %. Durch erneute Zugabe von NAD wurde die Hemmung aufgehoben. In der Umkehrreaktion können Elektronen von NADH auf Ferredoxin (MV) übertragen werden. Diese Reaktion wurde analog durch NAD gehemmt, wobei bei 1 mM NAD im Testansatz die Hemmung nur 40 % betrug. Acetyl-CoA, ein obligater Aktivator der NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase von *Clostridium pasteurianum* (Jungermann et al., 1973), bewirkte unter den getesteten Bedingungen keine Aktivitätssteigerung in Extrakten von *T. finni*.

Die für die Ethanolbildung wichtige Reaktion von reduziertem Ferredoxin nach NADP lief mit nur 10 % der Geschwindigkeit der NAD-Reduktion ab. Diese Reaktion wurde sehr effektiv durch das Endprodukt NADPH gehemmt. Bereits mit 0,2 mM NADPH im Testansatz ging die Aktivität von 0,1 U/mg auf 0,001 U/mg Protein zurück.

Die geringste Reaktionsgeschwindigkeit wurde für die Reduktion von Ferredoxin durch NADPH mit 0,023 U/mg Protein gemessen. Diese Reaktion wurde anscheinend ebenfalls durch das Endprodukt NADPH gehemmt, da drei Minuten nach Reaktionsstart die Aktivität um 35 % zurückging.

Ob NAD oder NADH einen Einfluß auf die Bildung von NADPH haben, wie es für Clostridien beschrieben ist (Jungermann et al., 1973; Petitdemange et al., 1976), konnte mit dem angewendeten Testsystem nicht festgestellt werden.

Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und Hydrogenase

Pyruvat wird durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA decarboxyliert, wobei die Elektronen auf Ferredoxin übertragen werden. Die Aktivität dieses Enzymes betrug 0,132 U/mg Protein (siehe Tabelle 12). Von Ferredoxin aus können die Elektronen entweder auf NAD oder NADP übertragen werden oder mit Hilfe der Hydrogenase als Wasserstoff freigesetzt werden. Die Bildung von molekularem Wasserstoff durch eine Hydrogenase, und dadurch die Regenerierung von Elektronencarriern wie NAD(P) und Ferredoxin, erlaubt es strikt anaeroben Bakterien Substrate

stärker zu oxidieren und dadurch mehr ATP zu gewinnen (Kondratieva und Gogotov, 1983). Die Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität in Richtung Wasserstoffbildung erbrachte mit 0,055 U/mg Protein (Tabelle 12) eine um den Faktor 13 mal niedrigere Aktivität als die Reduktion von Ferredoxin mit H_2 .

Tabelle 12: Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase- und Hydrogenase-Aktivität in Rohextrakten von *T. finnii*.

Enzymaktivität	Substrat	spezif. Aktivität (U/mg Protein)
Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	Pyruvat	0,132
Hydrogenase	MV_{red}	0,055
	H_2	0,72

3.3 Nachweis der Acetaldehyd-Dehydrogenase, Transhydrogenase und Acetatkinase in Rohextrakten von *T. finnii*

Acetaldehyd-Dehydrogenase

Von anaeroben thermophilen Bakterien ist bisher nur die Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase in *Ta. Brockii* bestimmt worden (Lamed und Zeikus, 1980 a und b). Hier wurde allerdings nur die Rückreaktion von Acetaldehyd zu Acetyl-CoA beschrieben, wobei die bei der Bestimmung störende Alkohol-Dehydrogenase nicht mit berücksichtigt wurde, und so nur die über die Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität hinausgehende Aktivität bestimmt wurde. Diese Aktivität konnte nur bestimmt werden, wenn das Enzym mit Dithiothreitol und NAD vorinkubiert wurde, bevor die Reaktion mit Acetaldehyd gestartet wurde. Ein ähnliches Verhalten ist für das Enzym aus *E. coli* beschrieben (Rudolph et al., 1968). Das Enzym aus *E. coli* ist partikelgebunden und konnte durch Inkuba-

tion in niedermolarem Puffer abgelöst werden. Auch in Rohextrakten von *T. finnia* konnte erst eine Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden, nachdem der Zellaufschluß in niedermolarem Puffer erfolgte. Dies deutet daraufhin, daß die Acetaldehyd-Dehydrogenase in *T. finnia* ebenfalls partikelgebunden ist.

Die Acetaldehyd-Dehydrogenase-Reaktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd war in *T. finnia* mit 0,03 U/mg Protein nur sehr gering im Vergleich zu den anderen Enzymaktivitäten. Die entsprechende Aktivität in *Ta. brockii* betrug nur 0,01 U/mg Protein (siehe Tabelle 21). Solch geringe Enzymaktivitäten sind aber auch für *E. coli* und *Bacillus macerans* beschrieben (Rudolph et al., 1968; Schepers et al., 1987).

Als Kontrolle wurde die Geschwindigkeit der Reaktion Acetaldehyd zu Acetyl-CoA nach der Methode von Lamed und Zeikus (1980 b) bestimmt. Hier wurde eine fast 10fach höhere Aktivität gefunden. Die Kontrolle mit *Ta. brockii* erbrachte mit 0,22 U/mg Protein etwas höhere Werte als Lamed und Zeikus (1980 b) mit 0,15 U/mg Protein gefunden haben. Die niedrige Enzymaktivität in physiologischer Richtung kann limitierend für die Ethanolbildung sein. Um dies zu beweisen, müßten die intrazellulären Acetaldehyd- und Acetyl-CoA-Pools bestimmt werden.

Tabelle 21: Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in Rohextrakten von *T. finnia* und *Ta. brockii*.

Stamm	Reaktion	spez. Aktivität (U/mg)
<i>T. finnia</i>	Acetyl-CoA \longrightarrow Acetaldehyd	0,03
<i>Ta. brockii</i>	Acetyl-CoA \longrightarrow Acetaldehyd	0,01
<i>T. finnia</i>	Acetaldehyd \longrightarrow Acetyl-CoA	0,26
<i>Ta. brockii</i>	Acetaldehyd \longrightarrow Acetyl-CoA	0,22
	Acetaldehyd \longrightarrow Acetyl-CoA	0,15*

* Literaturwert nach Lamed und Zeikus, 1980b

Acetatkinase

Ob ein Bakterium von der Reaktion der Acetatkinase Gebrauch machen kann, hängt von seinen Möglichkeiten molekularen Wasserstoff zu entwickeln ab. Für Reduktionsäquivalente, die als molekularen Wasserstoff freigesetzt werden können, braucht die Zelle keinen Wasserstoffakzeptor zu synthetisieren und kann Acetyl-CoA in Acetyl-Phosphat umwandeln und in der Acetatkinase-Reaktion ATP regenerieren.

Die Acetatkinase-Aktivität betrug in Richtung Acetatbildung 1,34 U/mg Protein. Die Rückreaktion hatte eine Geschwindigkeit von 3,36 U/mg Protein. Diese Aktivitäten sind sehr hoch im Vergleich zu den anderen Enzymaktivitäten in *T. finni*.

Transhydrogenase

Die Bereitstellung von NADPH für die NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase kann über die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase erfolgen, die Aktivität dieses Enzymes war gering und wurde sehr stark durch NADPH gehemmt. Eine weitere Möglichkeit zur NADPH-Bildung ist die direkte Übertragung von Elektronen von NADH auf NADP und umgekehrt mit Hilfe einer Transhydrogenase. In thermophilen ethanolbildenden Bakterien wurden bisher keine Transhydrogenaseaktivitäten gefunden (Lamed und Zeikus, 1980a).

Aus der Reduktion von APAD durch NADH kann eine Wasserstoffübertragung von NADH nach NADP abgeleitet werden (Rydström, 1979). Diese Aktivität war mit 0,9 U/mg Protein in Rohextrakten von *T. finni* sehr hoch. Bei der umgekehrten Richtung von NADPH nach APAD konnte keine Aktivität gemessen werden. Für NADH konnte ein apparenter K_M -Wert von $3,33 \times 10^{-5}$ M ermittelt werden (Abb.15).

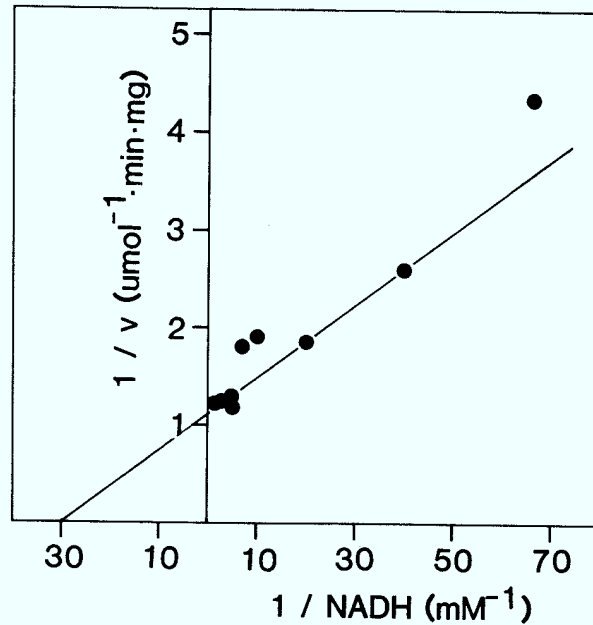


Abb.15: Lineweaver-Burk-Diagramm der Substratgeschwindigkeitsbeziehung der Transhydrogenase mit NADH als Substrat.

3.4. Charakterisierung der L-Lactat-Dehydrogenase von *T. finnia*

Die L-Lactat-Dehydrogenase von *T. finnia* gehört zu dem NADH-abhängigen Typ, dessen Aktivität vollständig von der Anwesenheit von FDP abhängt (Schmid, 1984). Dieser Typ Lactat-Dehydrogenase war schon in *Streptococcus*, einigen Vertretern der Gattung *Lactobacillus* und *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen worden (Garvie, 1980).

In den folgenden Untersuchungen wurde Rohextrakt von aerob aufgeschlossenen Zellen verwendet, da es sich gezeigt hat, daß kein Aktivitätsunterschied zwischen aerob und anaerob behandeltem Extrakt bestand. Für die kinetischen Experimente wurde entsalzter Rohextrakt (siehe Abschnitt 7.1.) verwendet. Dieser Extrakt konnte 1-2 Wochen ohne Aktivitätsverlust bei - 18 °C gelagert werden.

3.4.1. pH-Optimum

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, hat die Lactat-Dehydrogenase von *T. finnia* ein breites pH-Optimum zwischen pH 6,2 und 7,4. Im folgenden wurden alle Tests in Imidazol-HCl-Puffer bei pH 7,0 durchgeführt, da in diesem Puffer die im Extrakt enthaltene NADH-Oxidase nur eine geringe Aktivität aufwies, die den Lactat-Dehydrogenase-Test kaum störte.

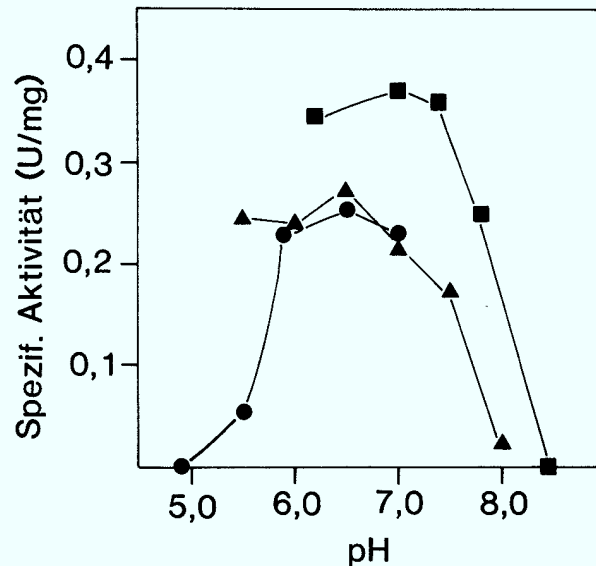


Abb.16: pH-Optimum der Lactat-Dehydrogenase in zellfreien Extrakten von *T. finnia*.

In Abänderung zum Testansatz in Material und Methoden beschrieben, wurden folgende Puffer verwendet:

- ■ - 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer; - ● - 0,1 M KPP;
- ▲ - 0,1 M Tris/Maleat-Puffer.

3.4.2. Reaktionsgeschwindigkeit der Lactat-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der FDP-Konzentration

Die Lactat-Dehydrogenase wurde durch FDP in ihrer Aktivität stark beeinflusst. Bereits mit 0,025 mM FDP im Testansatz wurden halbmaximale Geschwindigkeiten erreicht (siehe Abb.17). Allerdings nahm die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 0,05 und 1 mM FDP noch etwas zu. Ein ähnliches Verhalten wird von den Lactat-Dehydrogenasen von *Clostridium acetobutylicum* und *Staphylococcus epidermidis* berichtet (Freier, 1984; Götz und Schleifer,

1975). Ohne FDP konnte auch in niedrigem pH-Bereich keine Aktivität bestimmt werden, wie dies von *T. ethanolicus* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* bekannt ist (Carreira et al., 1982; Germain et al., 1986).

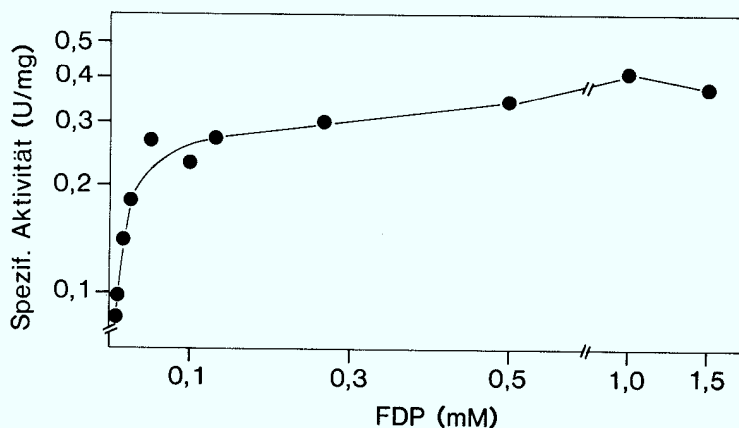


Abb.17: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Lactat-Dehydrogenase von der FDP-Konzentration.

Der Testansatz enthielt: 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer, pH7,0; 4 mM Pyruvat; 0,35 mM NADH; 0,006-1,5 mM FDP und 81 μ g Rohextraktprotein. Die Reaktion wurde mit Pyruvat gestartet.

3.4.3. K_m -Werte für Pyruvat und NADH in Abhängigkeit von der FDP-Konzentration

Die aktivierende Wirkung von FDP auf die Lactat-Dehydrogenase, wurde in kinetischen Untersuchungen zur Bestimmung der apparenten K_m -Werte für Pyruvat und NADH bei unterschiedlichen FDP-Konzentrationen weiter untersucht. Wie aus den Abbildungen 18 und 19 ersichtlich ist, erniedrigte FDP die K_m -Werte für Pyruvat und NADH, bei gleichbleibender maximaler Reaktionsgeschwindigkeit. Bei 0,025 mM FDP betrug der K_m -Wert für Pyruvat $1,92 \times 10^{-3}$ M, bei 0,5 mM FDP nur noch $3,5 \times 10^{-4}$ M. Ähnlich, aber nicht so stark, änderte sich der K_m -Wert für NADH. Bei 0,025 mM FDP betrug er $1,53 \times 10^{-4}$ M, bei 0,5 mM FDP nur noch $5,5 \times 10^{-5}$ M (siehe auch Tabelle 15). Das bedeutet, daß in Gegenwart von FDP die Affinität des Enzyms zu seinen Substraten erhöht wird,

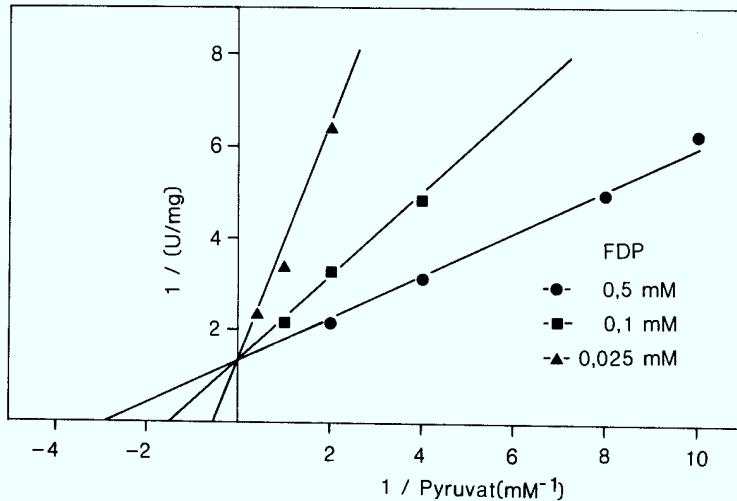


Abb.18: Abhängigkeit der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase von der Pyruvatkonzentration bei drei verschiedenen FDP-Konzentrationen (Lineweaver-Burk-Auftragung).

Der Testansatz enthielt: 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,0; 0,7 mM NADH; 0,025-0,5 mM FDP und 80 µg Rohextraktprotein. Die Reaktion wurde mit Pyruvat gestartet.

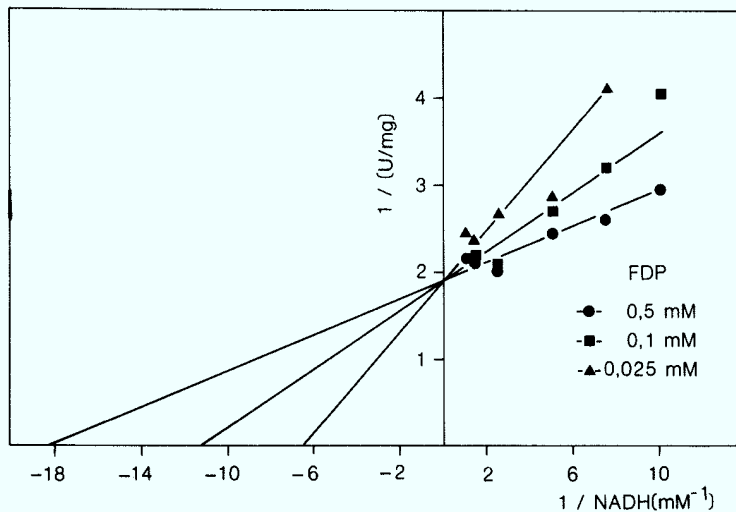


Abb.19: Abhängigkeit der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase von der NADH-Konzentration bei drei verschiedenen FDP-Konzentrationen (Lineweaver-Burk-Auftragung).

Der Testansatz enthielt: 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,0; 4 mM Pyruvat; 0,025-0,5 mM FDP; 80 µg Rohextraktprotein; NADH wie in der Abbildung angegeben.

Tabelle 15: Apparente K_M -Werte für Pyruvat und NADH bei verschiedenen FDP-Konzentrationen

FDP-Konz. (mM)	Apparenter K_M (mM)	
	Pyruvat	NADH
0,025	1,92	0,153
0,1	0,68	0,088
0,5	0,35	0,055

so daß bei einer Erhöhung des intrazellulären FDP-Pools, das bei erhöhtem Substratumsatz stattfinden kann, die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase drastisch gesteigert werden kann. Pyruvatkonzentrationen größer 4 mM bewirkten einen Rückgang der Enzymaktivität. Bei 10 mM betrug die Hemmung 35 %, bei 20 mM 55 % (Abb. 20)

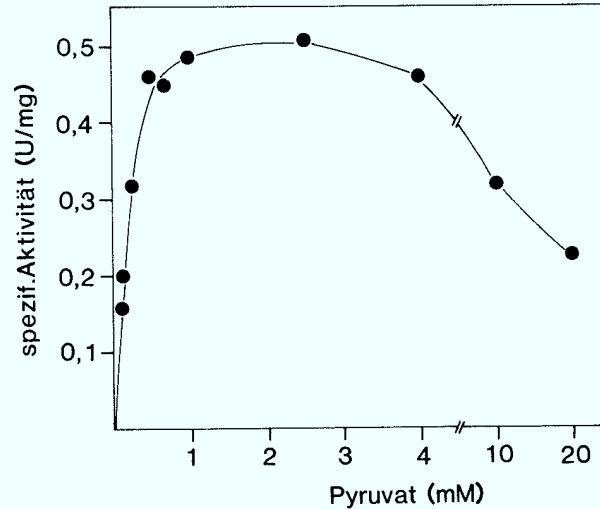


Abb.20: Abhängigkeit der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase von der Pyruvatkonzentration.

Testansatz wie in Abb.18 mit 0,5 mM FDP.

3.4.4. Einfluß verschiedener Metabolite auf die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

Viele FDP-abhängige Lactat-Dehydrogenasen werden durch Stoffwechselintermediate gehemmt (Garvie, 1980; Yamada und Carlsson, 1975). Deshalb wurde eine Reihe von Metaboliten auf ihre mögliche Wirkung auf die Lactat-Dehydrogenase getestet (Tab. 16). Nur NADPH bewirkte eine deutliche Hemmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität. Abbildung 21 zeigt die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der NADPH-Konzentration, wobei mit 2 mM NADPH im Testansatz keine Aktivität mehr meßbar war. Das bedeutet, daß bei hohen intrazellulären NADPH-Konzentrationen die Lactatbildung gehemmt wird.

Tabelle 16: Einfluß verschiedener Metabolite auf die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität.

Der Testansatz enthielt: 100 mM Imidazol-HCl; pH 7,0; 4 mM Pyruvat; 0,7 mM NADH; 0,5 mM FDP und 1 mM der jeweiligen Verbindung.

Metabolit	Aktivität in %
keine Zusätze	100
ATP	106
ADP	95
PEP	91
Fructose-6-P	95
Glucose-6-P	103
NAD	89
NADP	105
NADPH	79

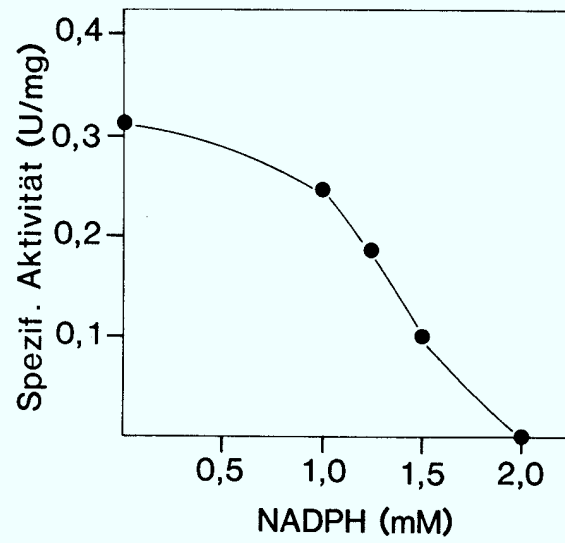


Abb.21: Hemmung der Lactat-Dehydrogenase durch NADPH.
Testansatz wie in Tabelle 16 und 1-2 mM NADPH

4. Bestimmung von intrazellulären Metabolit-Pools

In den Fermentationen mit den unterschiedlichen Substratkonzentrationen wiesen die gleichbleibenden Ethanolbildungsraten, bei steigenden Xyloseverbrauchsrate, auf eine mögliche Limitierung der Ethanolbildung hin. Die enzymatischen Untersuchungen deuteten zunächst auf einen Mangel an NADPH für die Acetaldehyd-reduktion hin, und auf einen Überschuß an NADH. Über die Größe von intrazellulären Pyridinnucleotid-Pools in strikt anaeroben Bakterien ist nur wenig bekannt. Deshalb sollten nun die intrazellulären NAD(P,H)-Pools in *T. finnii*, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, gemessen werden. Gleichzeitig mit den Pyridinnucleotiden sollten die intrazelluläre FDP-Konzentration und die Adeninnucleotid-Pools bestimmt werden. Da FDP der Aktivator der Lactat-Dehydrogenase ist, können steigende Substratkonzentrationen zu einer Erhöhung der intrazellulären FDP-Konzentrationen führen. Das Auftreten von Xylulose im Kulturfiltrat deutete entweder auf einen Mangel an Xylulosekinase-Aktivität oder ATP hin (siehe Abschnitt 2.3.2.). Deshalb sollten die Adeninnucleotid-Pools bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt werden.

4.1. Ausarbeitung des Testsystems für die bioluminometrische Bestimmung von intrazellulären NAD(P,H)-Pools

4.1.1 Testsystem mit definierten Luciferase- und FMN-Reduktase-Konzentrationen

Erste Versuche mit einem Testkit von LKB-Wallac und Kulturextrakten zeigten, daß die Lichtausbeute durch Extraktbestandteile bis zu 90 % reduziert wurde. Eine Entfernung der Perchlorsäure, KOH und Ethanol durch Fällung bzw. Lyophilisieren erbrachte keine Verbesserung, da es sich herausstellte, daß das Kulturmedium an sich schon sehr stark die Lichtausbeute reduziert. Das störende Medium konnte durch Abzentrifugieren der Zellen und Waschen nicht entfernt werden, da während dieser Zeit der Nucleotidgehalt der Zellen drastisch zurückging. Dieser Rückgang der Lichtausbeute in Gegenwart von Extrakt konnte

im Falle des Testkits nicht durch eine Erhöhung der einzelnen Testbestandteile ausgeglichen werden, so daß mit diesen Reagenzien bei gegebenem Kulturmedium und Extraktionsverfahren keine Messungen durchgeführt werden konnten. Aus diesen Gründen wurde im folgenden Enzymsysteme von Boehringer verwendet, die einzeln erhältlich waren, und somit die Optimierung der Testbedingungen auf die Extraktzusammensetzung hin ermöglichten.

Erste Versuche zur NADH-Bestimmung mit Reagenzien von Boehringer zeigten, daß für eine reproduzierbare Lichtausbeute ein ganz definiertes Verhältnis der beiden an der Reaktion beteiligten Enzyme (FMN-Reduktase und Luciferase) vorliegen muß. Änderte man die Zusammensetzung des Enzymsystems, so ging die Lichtausbeute sehr stark zurück und die Linearität zwischen eingesetzter Nucleotidmenge und Lichtausbeute verschlechterte sich.

Deshalb wurde nun zunächst die Aktivität der einzelnen Enzyme bestimmt, um Schwankungen der Aktivitäten, durch Lagerung und Chargenänderung, durch entsprechende Verdünnung wieder auszugleichen. Wie wichtig das Verhältnis der Enzymaktivitäten zueinander für die Lichtausbeute ist, zeigte sich im Luciferase-

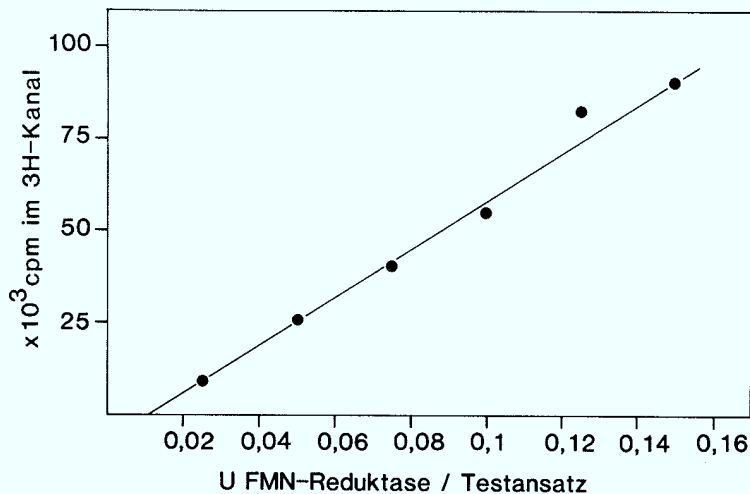


Abb.22: Abhängigkeit der Lichtausbeute (in cpm) bei der Bestimmung der Luciferase-Aktivität von der FMN-Reduktase-Konzentration.

Der Testansatz enthielt 50 µl Luciferase-Stammlösung 1:40 000 verdünnt. Die anderen Testbestandteile wie beschrieben.

Test, wo eine lineare Abhängigkeit der Lichtausbeute von der FMN-Reduktase-Konzentration bestand (Abb.22).

In Perchlorsäure- und Ethanol/KOH-Extrakten wurde dann die FMN-Reduktase- und Luciferasemenge in Bezug auf die Lichtausbeute optimiert. Hierzu wurden Enzymmischungen getestet, bei denen bei konstanter FMN-Reduktase-Konzentration die Luciferasemenge variiert wurde, bis eine ausreichende Lichtausbeute erhalten wurde, wobei zu beachten war, daß der Blindwert des Extraktes nicht zu hoch wurde. Der hohe Blindwert wurde vor allem durch Hefeextrakt und Thioglycolat verursacht. Abbildung 23 zeigt,

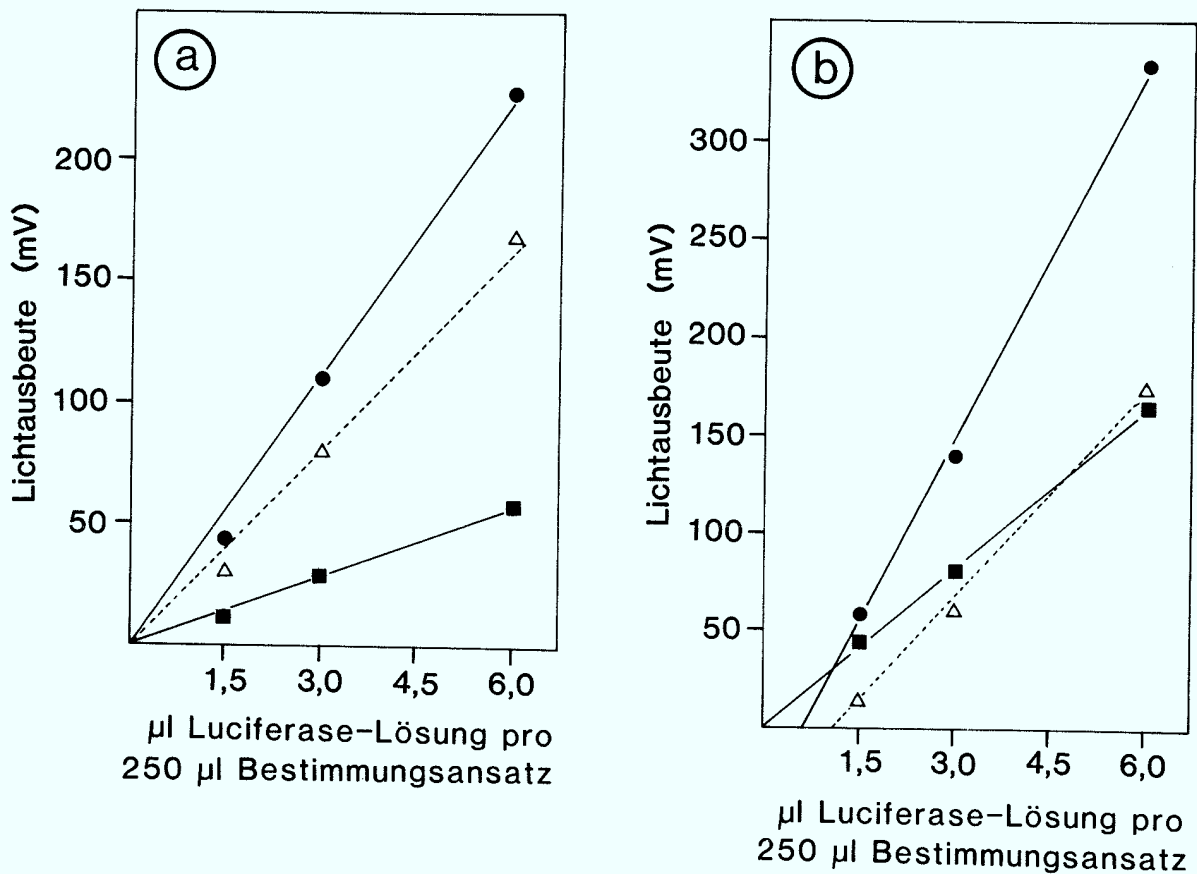


Abb.23: Abhängigkeit der Lichtausbeute im bioluminometrischen Test von der Luciferasemenge in a) Perchlorsäure-Extrakt und b) Ethanol/KOH-Extrakt.

Der Testansatz enthielt: 12 mU FMN-Reduktase und 40 pmol NADH in Perchlorsäure- oder Ethanol/KOH-Extrakt gelöst. Die anderen Testbestandteile wie beschrieben. Das Luciferasepräparat hatte eine Aktivität von $4,92 \times 10^{10}$ cpm/ml Stammlösung im Luciferasetest. (●) Messwert, (■) Blindwert (Extrakt ohne NADH), (△) Differenz zwischen Messwert und Blindwert.

wie bei konstanter FMN-Reduktase-Konzentration und steigender Luciferasemenge die Lichtausbeute linear zunimmt. Für die folgenden Bestimmungen wurde willkürlich die Luciferasemenge mit der höchsten in der Messreihe festgestellten Lichtausbeute verwendet. Bei dieser Konzentration liegen beide Enzyme nicht in sättigenden Konzentrationen vor. Im Vergleich zur Testanordnung nach Boehringer wurde die Luciferasemenge so um das 4-5fache erhöht. Die Erhöhung der Luciferasemenge bewirkte aber auch eine Erhöhung des Blindwertes, wobei Unterschiede zwischen Perchlorsäure- und Ethanol/KOH-Extrakten bestanden. Mit Ethanol/KOH-Extrakt war der Blindwert deutlich höher als mit Perchlorsäure-Extrakt, was aber durch einen größeren Meßwert wieder ausgeglichen wurde.

4.1.2. Untersuchungen zur Vollständigkeit der enzymatischen Umsetzungen für die NAD(P,H)-Bestimmung und die Stabilität der Nucleotide während der Extraktion

NADH und NADPH sind in geringen Konzentrationen sehr instabil (Führer et al., 1980). Deshalb wurden NADH und NADPH in den Ethanol/KOH-Extrakten enzymatisch in die stabileren oxidierten Nucleotide überführt. Vor der luminometrischen Bestimmung mußten diese wieder, wie auch die oxidierten Nucleotide im Perchlorsäure-Extrakt, enzymatisch reduziert werden, und zwar spezifisch nur NADP oder NAD. Diese enzymatischen Oxidationen bzw. Reduktionen der Nucleotide wurden auf ihre Vollständigkeit hin überprüft.

Hierzu wurden zu den jeweiligen Extrakten definierte NAD(P) bzw. NAD(P)H-Mengen zugegeben, deren Konzentration vor und nach der Umsetzung (jeweils mit interner Standardisierung) bioluminometrisch bestimmt wurde. Die Umsetzung von NAD(P)H zu NAD(P) mit Glutamat-Dehydrogenase verlief in den Ethanol/KOH-Extrakten vollständig ab, ebenso die spezifischen Umsetzungen von NAD zu NADH mit Alkohol-Dehydrogenase und NADP zu NADPH mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in den Perchlorsäure- und Ethanol/KOH-Extrakten. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse von Versuchen zusammengefaßt, die sowohl die Extraktion als auch die gesamten Umsetzungen mit einschließen. Dies zeigt, daß auch während der

Extraktion extern zugesetzte Pyridinnucleotide nicht zerstört werden.

Tabelle 17: Vollständigkeit der spezifischen Umsetzungen und Stabilität der Pyridinnucleotide in den Extrakten. Zu einer Kultur wurde NAD(P,H) zugegeben (Endkonz. im Extrakt war 2 nmol NAD(H) bzw. 8 nmol NADP(H) pro ml Extrakt), extrahiert und der NAD(P,H)-Gehalt bioluminometrisch bestimmt.

% wiedergefundene
Nucleotidmenge

NAD	105
NADH	95
NADP	94
NADPH	108

4.1.3. Untersuchungen zur Extraktionsmethode

Da über die Effizienz der angewendeten Extraktionsverfahren nichts bekannt ist, und um zu vergleichen, ob beide Extraktionsmethoden zum gleichen Aufschlußgrad führen, wurde der Adenylatgehalt in den beiden Extrakten bestimmt. Dieser wurde deshalb ausgewählt, da mit beiden Methoden Adeninnucleotide extrahiert werden können, und nicht wie die Pyridinnucleotide nur jeweils die oxidierte oder reduzierte Form. Tabelle 18 zeigt den Adenylatgehalt einer Kulturprobe und einer 1 mM Adeninnucleotid-Lösung, die nach beiden Methoden extrahiert worden war. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Extraktionsmethoden, so daß der Aufschlußgrad bei beiden Methoden gleich war. Die Differenzen im AMP-Gehalt haben ihre Ursache wohl eher in der Bestimmungsmethode als im Extraktionsverfahren, da bei ATP die Übereinstimmung sehr gut ist.

Tabelle 18: Vergleich zwischen der Extraktion mit Perchlorsäure und Ethanol/KOH.

Eine Kulturprobe und eine Adeninnucleotid-Lösung (AXP, 1 $\mu\text{mol/ml}$) wurden mit Perchlorsäure oder Ethanol/KOH extrahiert und die Adeninnucleotide bioluminometrisch bestimmt.

	ATP	ADP	AMP
	(nmol/mg TG bzw. nmol/ml AXP-Lösung)		
Kultur / Perchlorsäure	9,41	4,92	1,13
Kultur / Ethanol/KOH	9,18	5,15	0,87
AXP-Lösung / Perchlorsäure	1011	1009	962
AXP-Lösung / Ethanol/KOH	1173	847	838

4.1.4. Nachweisgrenzen und Reproduzierbarkeit der NAD(P,H)-Bestimmungen

Die Standardabweichungen der Blindwerte (= nicht umgesetzter Extrakt, siehe Abschnitt 12.5. in Material und Methoden) im bioluminometrischen Test lagen immer unter 10 %. Deshalb wurde als Nachweisgrenze die Lichtausbeute angenommen, die um mindestens 10 % größer als der Blindwert war. Danach konnten für NADH Nachweisgrenzen von 1-4 pmol/Testansatz, das entspricht 20-80 pmol/ml Extrakt, errechnet werden. Für NADPH liegen die Nachweisgrenzen höher, hier wurden 10 pmol/ Testansatz und ca 200 pmol/ml Extrakt errechnet.

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen im bioluminometrischen Test lag unter 5 % Standardabweichung. Die Reproduzierbarkeit der Extraktion plus Bestimmung war abhängig von der Nucleotidkonzentration im Extrakt, die wiederum von der Zellkonzentration bestimmt wurde. Lagen die Nucleotidkonzentrationen über 0,7 nmol/ml Extrakt, so betrug die Standardabweichung unter 10 %. Lagen die Werte darunter, so betrug die Schwankungen bis zu 40 %.

4.2. Intrazelluläre Poolbestimmungen in Fed-Batch-Kulturen mit unterschiedlichem Substratangebot

Im Verlaufe von Fed-Batch-Fermentationen mit unterschiedlichen Zufütterungsraten und unterschiedlicher Lactatbildung wurde der intrazelluläre FDP-, Adeninnucleotid- und Pyridinnucleotidegehalt bestimmt. Die Zeitpunkte, zu denen die Proben entnommen wurde, wurden so gewählt, daß sie entweder 0,5-1 Stunde nach dem letzten Zufüttern lagen, also bei hohem Substratangebot, bzw. 3 - 4 Stunden nach dem Zufüttern, bei niedrigem Substratangebot.

Abbildung 24 zeigt eine Fermentation bei der sich die Xylosekonzentration bis auf eine Ausnahme unter 60 mM bewegte, und das Ethanol-/Lactat-Verhältnis 2,3 betrug.

Der FDP-Pool war sehr großen Schwankungen unterworfen. Nach dem Zufüttern von Xylose (z.B. bei 24 und 32 Stunden) stieg der FDP-Pool bis auf 8,45 bzw. 7,56 nmol/mg TG an. Bereits 3 Stunden später betrug er nur noch 1/3 davon (Tab. 19). Die Höhe des Energy Charge verhielt sich umgekehrt zur FDP-Konzentration. Bei hohem Zuckerangebot fiel er unter 0,5 ab, stieg aber innerhalb von 3 Stunden wieder auf einen Wert von 0,59 an. ATP nahm ab, während ADP und FDP zunahmen. Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß der Zuckerabbau bis FDP sehr schnell erfolgt, wofür sehr viel ATP benötigt wird; die weiteren Abbau-schritte verlaufen aber langsamer, so daß FDP angehäuft wird. Das Absinken des Energy Charge bei hohen Substratkonzentrationen könnte auch die Ursache für das Auftreten von Xylulose im Medium sein, da für die Aktivierung von Xylose zuwenig ATP zur Verfügung steht.

Abbildung 25 zeigt eine Fermentation bei der die Zuckerkonzentration bis zu 80 mM betrug. Hier waren die Unterschiede im intrazellulären FDP-Gehalt in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nicht so groß, sie bewegten sich nur zwischen 1,3 und 3,75 nmol/mg TG. In der Annahme, daß 1 mg TG ca. 2,15 μ l Zellvolumen entsprechen (Werte für *Zymomonas mobilis*, persönliche Mitteilung von T.Struch), errechnet sich daraus eine intrazelluläre FDP-Konzentration von 0,6-1,8 mM. Diese Konzentrationen sind, wie bereits gezeigt wurde, ausreichend für eine

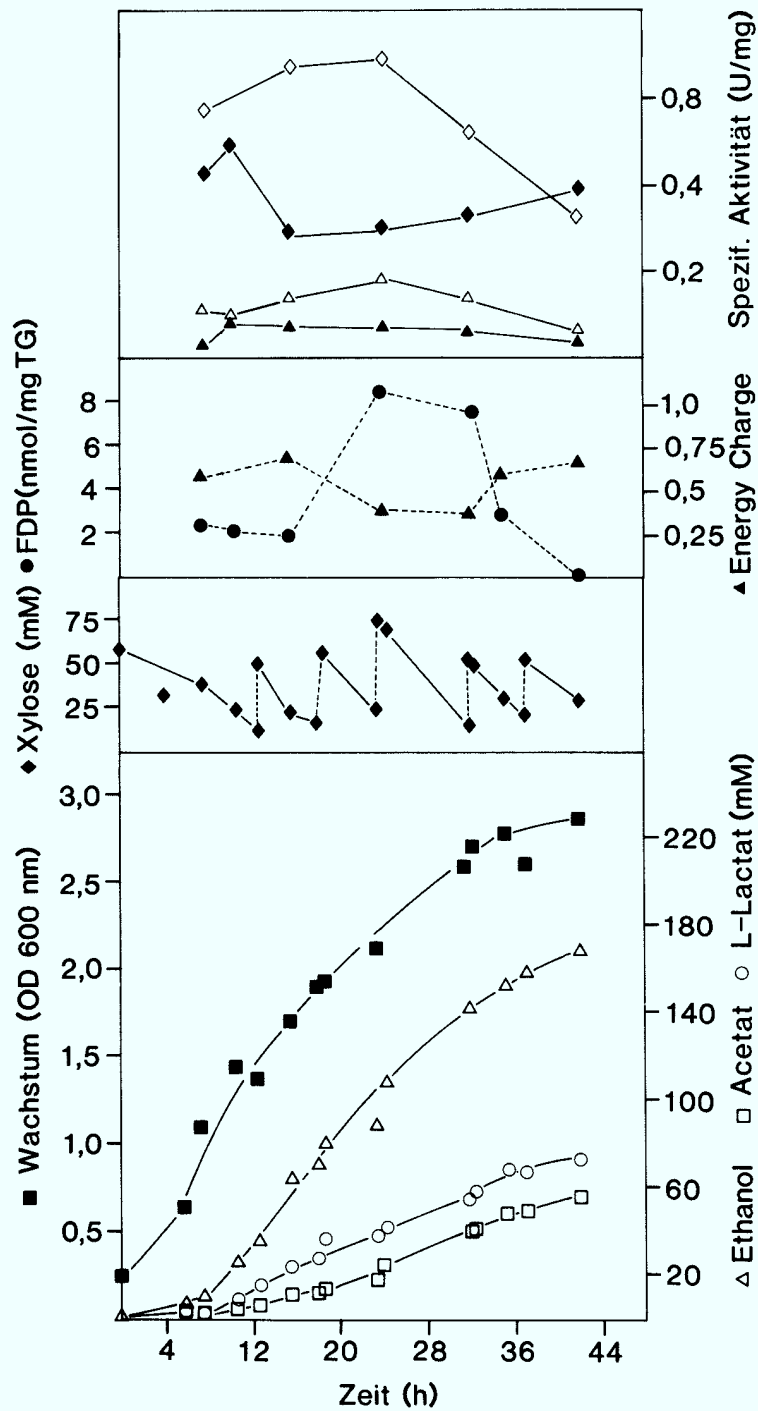


Abb.24: Intrazellulärer FDP- und Adenylatgehalt in einer Fed-Batch-Fermentationen mit bis zu 60 mM Xylose.
 Enzymaktivitäten: (Δ) Xylulosekinase; (\blacklozenge) Phosphofruktokinase; (\blacktriangle) Pyruvatkinase; (\diamond) Acetatkinase

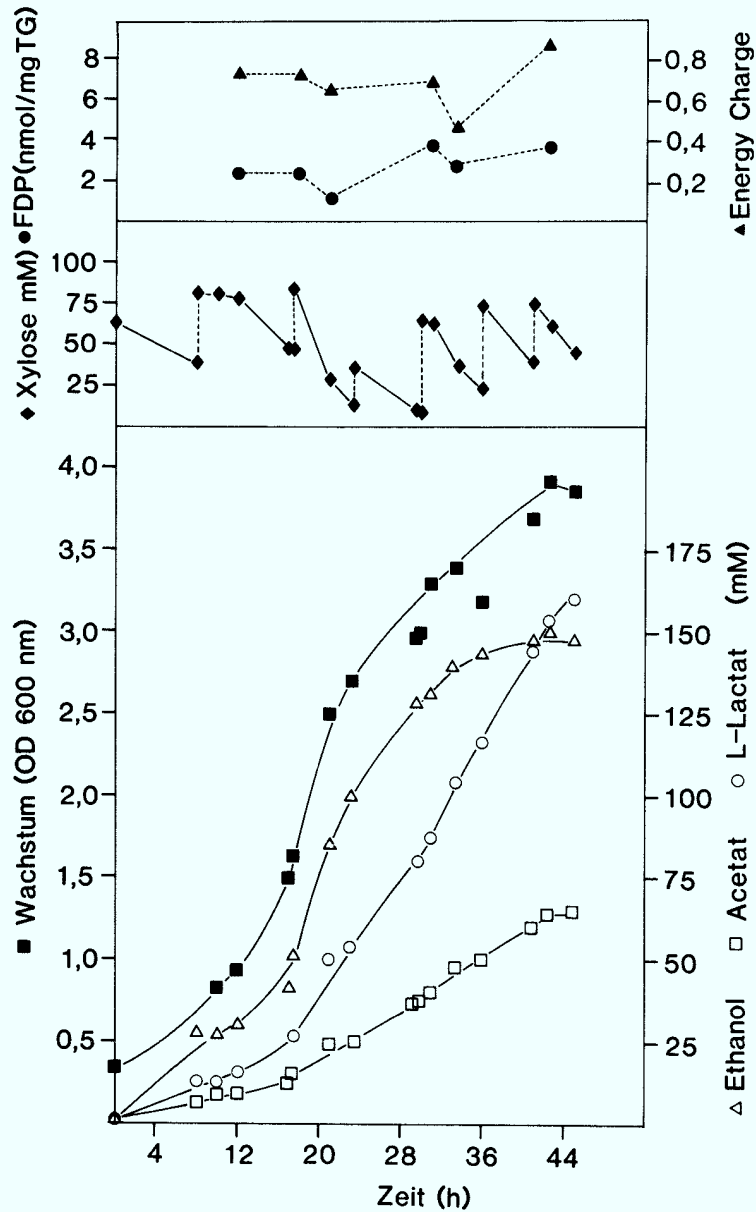


Abb.25: Intrazellulärer FDP- und Adenylatgehalt in einer Fed-Batch-Kultur mit bis zu 80 mM Xylose.

volle Aktivierung der Lactat-Dehydrogenase. Auch der Energy Charge unterlag in diesem Versuch keinen so großen Schwankungen. Er bewegte sich zwischen 0,64 und 0,80, auch bei Substratkonzentrationen von 80 mM. Der Gesamtadenylatgehalt schwankte ebenfalls im Verlaufe beider Fermentationen. Eine Ursache hierfür dürfte das Fed-Batch-Verfahren sein, wodurch sich im Kul-

turmedium sowohl die Substratkonzentration als auch die Hefeextrakt- und Ammoniumchloridkonzentration änderten.

Die Bestimmung der intrazellulären Pyridinnucleotid-Pools im Verlaufe der beiden Fermentationen zeigte, daß die intrazelluläre NADPH-Konzentration sehr hoch ist, und in fast allen Fällen sogar größer als die NADH-Konzentration (Tab.19). Die NAD- und NADP-Konzentrationen sind wesentlich niedriger, NADP sogar meist unter der Nachweisgrenze. Beim Vergleich der Poolgrößen zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigte es sich, daß bei hohen Substratkonzentrationen die Summe an reduzierten Nucleotiden größer ist als bei niedrigen Substratkonzentrationen, was sich im NAD(P)H/NAD(P)-Verhältnis widerspiegelt. Wimpenny und Firth (1972) und Andersen und von Meyenburg (1977) fanden, daß die intrazelluläre NADH-Konzentration sehr stark reguliert wird, und zwar auf sehr niedrigem Niveau. Sie fanden einen 'catabolic reduction charge' ($=\text{NADH}/(\text{NAD}+\text{NADH})$) von 0,2-0,4 bzw. von 0,05, der auch unter anaeroben Bedingungen beibehalten wurde. Dieser konstante NADH-Pool ist annähernd in der Fermentation mit bis zu 80 mM Substrat erfüllt, aber auf einem sehr viel höheren Niveau. Die hier ermittelten 'catabolic reduction charge'-Werte sind mit 0,3 bis 0,8 sehr viel höher und änderten sich sehr stark im Verlaufe der Fermentationen. Der 'anabolic reduction charge' war mit Werten von 0,4 bis 3,6 ebenfalls sehr hoch. Eine Erklärung für den hohen NADPH-Pool ist, daß in *T. finnis* NADPH sowohl im Anabolismus als auch Katabolismus beteiligt ist, und eine Unterscheidung nach 'catabolic' ($\text{NADH}/(\text{NAD}+\text{NADH})$) und 'anabolic reduction charge' ($\text{NADPH}/(\text{NADP}+\text{NADPH})$) nicht möglich ist.

Im Verlaufe einer dieser Fed-Batch-Fermentationen wurden auch Enzymaktivitäten bestimmt (Abb.24), um zu sehen wie stabil die Aktivitäten während der Fermentationsdauer sind. Es wurden die Kinaseaktivitäten ausgewählt. Die Kinaseaktivitäten nahmen mit Ausnahme der Phosphofruktokinase bis zu 24 Stunden Fermentationsdauer zu, und nahmen dann bis zum Ende der Fermentation langsam ab, wobei dann die Aktivität noch zwischen 40 und 60 % der maximalen spezifischen Aktivität betrug.

Tabelle 19: Intrazellulären Pools im Verlaufe von Fed-Batch-Fermentationen mit bis zu a) 60 mM und b) 80 mM Xylose

Xylosekonzentration	10-60 mM					10-80 mM				
	15,5	24,5	32,5	35	35	12	17,5	21	31	
Inkubationszeit (h)	15,5	24,5	32,5	35	35	12	17,5	21	31	
Xylosekonzentration (mmol/l)	22,7	69,8	47,5	29,7	29,7	79	80	28,5	64,8	
FruC-1,6-P (nmol/mg TG)	1,87	8,45	7,56	2,71	2,71	2,42	2,37	1,24	3,75	
Gesamtadenylat (nmol/mg TG)	6,27	5,26	4,87	5,23	5,23	3,09	7,20	11,50	6,30	
ATP / ADP	1,56	0,66	0,52	1,30	1,30	0,65	1,46	1,65	3,90	
Energy Charge	0,69	0,39	0,37	0,59	0,59	0,71	0,71	0,64	0,67	
NAD ⁺ (nmol/mg TG)	1,54	0,22	0,60	0,80	0,80	0,79	3,11	1,23	0,95	
NADP ⁺ (nmol/mg TG)	≤0,50	≤0,50	1,88	0,82	0,82	≤0,50	0,71	0,58	1,20	
NADH (nmol/mg TG)	0,62	1,0	0,81	0,38	0,38	2,02	2,17	1,98	1,63	
NADPH (nmol/mg TG)	1,51	1,61	1,52	0,26	0,26	2,62	2,68	1,91	0,74	
Gesamt-NAD(P,H) (nmol/mg TG)	4,17	3,33	4,81	2,26	2,26	5,93	8,67	5,70	4,52	
NADH / (NAD+NADH)	0,30	0,82	0,57	0,32	0,32	0,72	0,41	0,62	0,63	
NADPH / (NADP+NADPH)	0,75	0,76	0,45	0,24	0,24	0,84	0,79	0,77	0,38	
NAD(P)H / NAD(P)	1,05	3,60	0,94	0,40	0,40	3,60	1,30	2,10	1,10	

4.3. Intrazelluläre Poolbestimmungen von kontinuierlichen Kulturen bei verschiedenen Durchflußraten

Bei der Bestimmung der intrazellulären Pools im Verlaufe von Fed-Batch-Fermentationen hat es sich gezeigt, daß durch die Zufütterung von Xylose und Hefeextraktlösung in der Kultur sich die Bedingungen stark ändern, wodurch die intrazellulären Pools sehr großen Schwankungen unterworfen waren. Je nach Zeitpunkt der Probenentnahme erhielt man andere Poolgrößen. Ein weiteres Problem bestand darin, daß mit fortschreitender Fermentationsdauer sich im Kulturmedium Stoffe anhäufte, die bei der NAD(P,H)-Bestimmung stark störten. Ein Grund dürfte die steigende Hefeextraktkonzentration sein, da pro 5 g zugefütterter Xylose 1 g Hefeextrakt zugefüttert wurde.

Um unter definierten Bedingungen Kulturen mit unterschiedlichem Substratangebot miteinander zu vergleichen, wurden die intrazellulären Pools von kontinuierlichen Kulturen bei zwei verschiedenen Durchflußraten bestimmt. Bei der Wahl der Durchflußraten konnte auf Ergebnisse von Schlösser (1987) zurückgegriffen werden. Sie konnte zeigen, daß mit Erhöhung der Durchflußrate die Ethanolbildung zugunsten der Lactatbildung zurückging. In Abänderung zu Schlösser (1987) wurde die Xylosekonzentration von 15 auf 10 g/l reduziert und die Hefeextraktkonzentration von 2 auf 6 g/l, sowie die Eisensulfatmenge von 0,5 mg/l auf 2,5 mg/l erhöht.

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich ist, stieg die Xyloseverbrauchsrate um das 1,7fache von 5,78 mmol/g TG·h bei $D = 0,053 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ auf 8,52 mmol/g TG·h bei $D = 0,103 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ an. Beide Kulturen waren nicht C-limitiert, da die Xylose nicht vollständig verbraucht wurde. Mit Erhöhung der Durchflußrate nahm die gebildete Ethanolkonzentration ab, während die Lactatbildung um das 1,7fache anstieg. Die Ursache hierfür kann nicht der intrazelluläre FDP-Gehalt sein, da sich die FDP-Pools mit 2,0 und 2,6 nmol/mg TG nur wenig unterschieden. Die Werte waren vergleichbar mit denen der Fed-Batch-Kulturen, mit Ausnahme der Spitzenwerte bei der Fermentation mit niedriger Xylosekonzentration. Der Energy Charge betrug in beiden Kulturen 0,74, obwohl die einzelnen Pools unterschiedlich groß waren.

Tabelle 20: Kontinuierliche Kultur mit *T. finnis*. Spezifische Fermentationsraten und intrazelluläre Pools bei zwei verschiedenen Durchflußraten. Die Kulturen befanden sich jeweils im steady state.

Durchflußrate (h^{-1})	0,053	0,103
Xylosekonz. im Zufluß (mM)	66,0	73,0
Zellkonz. (mg/ml)	0,49	0,76
Ethanol (mM)	43,05	35,78
Acetat (mM)	9,43	8,96
L-Lactat (mM)	23,80	40,96
Restxylose (mM)	12,53	10,10
Xyloseverbrauch (mmol/l·h)	2,83	6,47
C-Bilanz (%)	85	82
intrazelluläre Metabolitkonz.		
Fruc-1,6-P (nmol/mg TG)	2,03	2,6
ATP (nmol/mg TG)	3,65	3,72
ADP (nmol/mg TG)	0,04	2,31
AMP (nmol/mg TG)	1,26	0,57
Energy Charge	0,74	0,74
NAD ⁺ (nmol/mg TG)	≤0,10 ^a	1,24
NADP ⁺ (nmol/mg TG)	≤0,50	≤0,50
NADH (nmol/mg TG)	1,19	1,95
NADPH (nmol/mg TG)	2,61	3,98
NAD(P)H / NAD(P)	6,3	4,8
catabolic reduction charge	0,92	0,61
anabolic reduction charge	0,84	0,89
Spezif. Fermentationsraten		
Ethanol (mmol/g TG·h)	4,66	4,85
Acetat (mmol/g TG·h)	1,02	1,21
L-Lactat (mmol/g TG·h)	2,57	5,55
Xylose (mmol/g TG·h)	5,78	8,52

^a Werte liegen unter der Nachweisgrenze

Die Bestimmung der NAD(P,H)-Pools ergab wieder, daß in der Zelle die Pyridinnucleotide vorwiegend in reduzierter Form vorliegen, und daß der NADPH-Pool größer ist als der NADH-Pool. Der 'catabolic reduction charge' und der 'anabolic reduction charge' sind in der gleichen Größenordnung wie in der Fed-Batch-Fermentation mit bis zu 80 mM Xylose. Die gemessenen NADPH-Pools von 2,6 bis 4 nmol/mg TG ergeben intrazelluläre Konzentrationen von 1,2 bis 1,9 mM (die Umrechnung erfolgte mit Werten von *Zymomonas mobilis*, wobei 1 mg TG 2,13 µl Zellvolumen entspricht, pers. Mitteilung T.Struch). NADPH-Konzentrationen in dieser Höhe inhibierten im in-vitro-Test die Lactat-Dehydrogenase (siehe Abschnitt 3.4.4.). Es ist deshalb unklar, wieso es trotzdem zu einer beträchtlichen Lactatbildung kam.

Beim Vergleich der spezifischen Gärraten (in mmol/g TG·h) wurde wieder deutlich, daß bei einer Erhöhung der Xyloseverbrauchsrate um den Faktor 1,5 die Ethanol- und Acetatbildungsrate annähernd gleich blieb, und nur die Lactatbildungsrate um den gleichen Faktor anstieg wie der Xyloseverbrauch. Dies stimmt mit den Beobachtungen in den Versuchen mit den aufkonzentrierten Zellen überein (Abschnitt 2.4.). Die Gärraten in Tabelle 20 zeigen weiter, daß der Metabolitfluß in Richtung Ethanol und Acetat unabhängig von der Durchflußrate ist. Daraus kann man schließen, daß die Regulation des Metabolitflusses auf der Ebene der Lactat-Dehydrogenase und nicht auf dem Weg Pyruvat zu Ethanol bzw. Acetat erfolgt. Gegen eine ausschließliche Regulation des Metabolitflusses durch die Lactat-Dehydrogenase sprechen die gemessenen FDP-Konzentrationen, da bei annähernd gleicher FDP-Konzentration, die für eine volle Aktivierung der Lactat-Dehydrogenase ausreichend ist, in der Kultur mit dem höheren Xyloseverbrauch ein um den Faktor 2 höherer Metabolitfluß in Richtung Lactat erfolgt. Das bedeutet, daß die intrazelluläre FDP-Konzentration nicht allein entscheidend für die erhöhte Lactatbildung bei Substratkonzentrationen über 66 mM ist.

IV. DISKUSSION

Die Alkoholbildung mit thermophilen Bakterien wird unter ökonomischen Gesichtspunkten durch zwei Faktoren maßgeblich limitiert. Der erste Faktor ist die geringe Ethanoltoleranz, der zweite Faktor ist die Bildung beträchtlicher Mengen an Nebenprodukten wie Acetat und L-Lactat.

Die meisten Mikroorganismen, mit Ausnahme von einigen Hefen und *Zymomonas mobilis*, besitzen nur eine geringe Toleranz gegenüber Ethanol (Sonnleitner, 1983; Herrero, 1983). Thermophile Bakterien, wie die Wildstämme von *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *T. ethanolicus* und *Clostridium thermosaccharolyticum* werden schon von 1 % (v/v) Ethanol in Wachstum und Endproduktbildung gehemmt (Herrero und Gomez, 1981; Lovitt et al., 1984; Mancuso, 1982; Carreira und Ljungdahl, 1983a; Avgerinos et al., 1981). Dies ist auch bei *T. finnis* der Fall, wie sowohl in den Fed-Batch-Fermentationen als auch in den Versuchen mit den konzentrierten Zellsuspensionen gezeigt wurde. Die Adaption an das Wachstum in Gegenwart von Ethanol induziert bei *Clostridium thermocellum* eine Membran die Fettsäuren mit niedrigem Schmelzpunkt enthält, und erhöhte somit die Fluidität der Zellmembran (Herrero et al., 1982 und 1983). Neuere Untersuchungen mit *Clostridium thermocellum* zeigten, daß in Gegenwart von Ethanol gewachsene Zellen höhere Konzentrationen an Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat enthalten, woraus gefolgert wurde, daß durch Ethanol, und dessen Wirkung auf die Membranen, membrangebundene glycolytische Enzyme gehemmt werden, und dadurch das Wachstum gestoppt wird (Herrero et al., 1985).

Die Selektion von Mutanten, die auch in Gegenwart von hohen Ethanolkonzentrationen noch wachsen, ist ein Weg diese geringe Ethanoltoleranz zu umgehen. Von einigen thermophilen Stämmen wurden Mutanten isoliert, die bis zu 10% (v/v) Ethanol tolerieren (Wang et al., 1983; Carreira und Ljungdahl, 1983a; Lovitt et al., 1984; Mancuso, 1982). Eine weitere Möglichkeit den hemmenden Effekt des Ethanol zu umgehen, ist die kontinuierliche Entfernung des gebildeten Alkohols, so daß keine hemmenden

Ethanolkonzentrationen entstehen. Gleichzeitig wird das Produkt aufkonzentriert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, kann mit dieser Methode die geringe Ethanoltoleranz von *T. finnis* umgangen werden, allerdings bestehen noch Probleme in der Effizienz der Abtrennung des Alkohols aus der Gasphase.

T. finnis bildet außer Ethanol noch Acetat und L-Lactat in unterschiedlichen Mengen, die von der Substratkonzentration abhängen. Xylosekonzentrationen über 10 g/l führen bei *T. finnis* zu einer verstärkten Lactatbildung. Gleiches Verhalten zeigen andere thermophile Bakterien wie *T. ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* und *Clostridium thermosaccharolyticum* (Ljungdahl et al., 1981; Parkkinen und Mattila, 1982; Wang und Fang, 1980). Bei *Clostridium thermohydrosulfuricum* ging die Ethanolausbeute von 80 % bei 10 g/l auf 30 % bei 30 g/l Xylose zurück (Parkkinen und Mattila, 1982). Andere Kohlenstoffquellen, wie Glucose und Cellobiose, bewirken ebenfalls einen Rückgang der Ethanolausbeuten bei Konzentrationen über 10 g/l (Brener und Johnson, 1984; Zeikus et al., 1981; Ljungdahl et al., 1981). Nur mit Stärke als C-Quelle bleibt auch in höheren Konzentrationen die Ethanolausbeute hoch. So führten 7,5 % Stärke bei *Clostridium thermohydrosulfuricum* noch zu keiner nennenswerten Lactatbildung (Parkkinen und Korhola, 1984; Parkkinen, 1986), und bei *Ta. brockii* verbesserte sich das Ethanol-/Lactat-Verhältnis von 0,7 mit Glucose auf 2,65 mit Stärke als C-Quelle (Ben-Bassat, 1981). Es konnten aber auch Mutanten von *T. ethanolicus* isoliert werden, mit denen man bis zu einer Xylosekonzentration von 3 % noch gute Ethanolausbeuten erhielt (Wiegel und Puls, 1982; Carreira et al., 1982). Auch in kontinuierlichen Kulturen wurde entweder mit steigenden Substratkonzentrationen oder Durchflußraten das Produktspektrum in Richtung Lactatbildung verschoben (Zeikus et al., 1981; Wiegel et al., 1983; Parkkinen und Mattila, 1982; Schlösser, 1987). Als Erklärung für diesen Effekt wurde die Erhöhung des intrazellulären FDP-Gehaltes, als Folge eines erhöhten Substratumsatzes, angeführt, wie dies der Fall bei der Lactat-Dehydrogenase von *Streptococcus bovis* und *Streptococcus mutans* ist, deren Aktivität durch steigende intrazelluläre FDP-Konzentrationen erhöht wird, hervorgerufen

durch eine Erhöhung der Substratkonzentration (Yamada und Carlsson, 1975).

In Rohextrakten von *T. finnis* konnte eine FDP-aktivierbare Lactat-Dehydrogenase nachgewiesen werden. FDP-abhängige Lactat-Dehydrogenasen wurden auch in thermophilen und extrem thermophilen Bakterien, wie *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Ta. brockii* und *T. ethanolicus*, gefunden (Lamed und Zeikus, 1980a und b; Ben-Bassat et al., 1981; Germain et al., 1986; Freier, 1984; Carreira et al., 1982). Gleichfalls sind solche Enzyme in mesophilen Bakterien, wie in Stämmen von Streptococcen, Lactobacillen, allen Stämmen von *Bifidobacterium*, *Acholeplasma laidlawii* und *Clostridium acetobutylicum*, beschrieben worden (Garvie, 1980; Freier, 1984).

Die Aktivität der L-Lactat-Dehydrogenase von *T. finnis* wird durch die Konzentration an FDP, NADH, Pyruvat, NADPH und den pH kontrolliert. Die Lactat-Dehydrogenase hat ein breites pH-Optimum zwischen pH 6,2 und 7,4; oberhalb und unterhalb dieses pH-Bereiches nimmt die Aktivität stark ab. Im Vergleich dazu ist für die Lactat-Dehydrogenasen von anderen thermophilen Bakterien ein pH-Optimum zwischen 5 und 6 beschrieben (Freier, 1984). Das niedrige pH-Optimum hat den Vorteil, daß die Lactatbildung bei leicht alkalischem pH in der Kultur unterdrückt werden kann. Einige Milchsäurebakterien wie *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus mutans* und *Acholeplasma laidlawii* besitzen ebenfalls Lactat-Dehydrogenasen mit einem pH-Optimum zwischen 6,5 und 7 (Garvie, 1980).

FDP hatte eine stark aktivierende Wirkung auf die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität. Ohne Effektor wurde keine Reaktion beobachtet. Sowohl bei *Clostridium thermohydrosulfuricum* als auch *T. ethanolicus* wurde eine geringe FDP-unabhängige Reaktion beobachtet, bei *T. ethanolicus* nur zwischen pH 4 und 6,5 (Germain et al., 1986; Carreira und Ljungdahl, 1983b). FDP erniedrigt die apparenten K_M -Werte sowohl für Pyruvat als auch NADH, so daß mit zunehmender FDP-Konzentration die Affinität des Enzyms für Pyruvat und NADH zunimmt, so wie dies bei *Acholeplasma laidlawii* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* auch der Fall ist (Neimark und Tung, 1973; Germain et al., 1986). Bei *Bacillus*

stearothermophilus besteht der Mechanismus der Aktivierung darin, daß durch Bindung von FDP die wenig aktive dimere Form in die aktive tetramere Form übergeht und stabilisiert wird. Pro Tetramer werden zwei FDP-Moleküle gebunden (Clarke et al., 1986).

Bei *T. finnis* wurden ähnliche K_M -Werte für NADH und Pyruvat bestimmt, wie sie auch Germain et al. (1986) für *Clostridium thermohydrosulfuricum* fanden. Nach Freier (1984) sind die K_M -Werte von *Clostridium thermohydrosulfuricum* für Pyruvat mit 2,8 mM auch bei sättigenden FDP-Konzentrationen wesentlich höher. Lamed und Zeikus (1980a) fanden bei *Ta. brockii* und *Clostridium thermocellum* sehr niedrige K_M -Werte für Pyruvat. Diese Organismen bilden aber auch sehr viel mehr Lactat. Pyruvatkonzentrationen über 4 mM bewirkten eine Hemmung des Enzyms bei *T. finnis*. Ähnliches Verhalten ist auch für die Lactat-Dehydrogenase von *Clostridium acetobutylicum* beschrieben (Freier, 1984).

Die Korrelation zwischen intrazellulärer FDP-Konzentration und Lactatbildung konnte bei einer Reihe von Bakterien nachgewiesen werden, wobei die intrazelluläre FDP-Konzentration von der C-Quelle und der Substratkonzentration abhängig war. Yamada und Carlsson (1975) fanden in *Streptococci*-Zellen bei Glucoseüberschuß, einhergehend mit hoher Lactatbildung, zwischen 10 und 35 $\mu\text{mol FDP/g TG}$, bei Glucoselimitierung nahezu 0. Germain et al. (1986) fanden ein Zunahme der FDP-Konzentration von 1,7 $\mu\text{mol/g TG}$ bei 5g/l Glucose auf 13,4 $\mu\text{mol/g TG}$ bei 20 g/l Glucose. Aber nicht nur die Substratkonzentration hat einen Einfluß auf die FDP-Konzentration, sondern auch die C-Quelle. Schnell verwertbare Substrate wie Glucose führten bei *Ta. brockii* zu einem intrazellulären FDP-Pool von 52 $\mu\text{mol/g TG}$, während die gleiche Menge Stärke, die nur langsam abgebaut wurde, nur zu 2 $\mu\text{mol/g TG}$ führten. Hierbei korrelierte die Lactatbildung mit dem intrazellulären FDP-Pool (Ben-Bassat et al., 1981).

Die Bestimmung der intrazellulären FDP-Pools bei *T. finnis* erbrachte bei den kontinuierlichen Kulturen keine großen Unterschiede, obwohl die Lactatbildung in der Kultur mit der größeren Durchflußrate fast doppelt so groß war. Ebenso wurde in den Fed-Batch-Fermentationen mit niedriger Substratkonzentration wenig Lactat gebildet, obwohl die FDP-Pools zum Teil sehr hoch

waren. Dies zeigt, daß hohe FDP-Konzentrationen in *T. finnis* nicht notwendig zu hoher Lactatbildung führen, und daß die Lactatbildung nicht nur durch die FDP-Konzentration bestimmt wird, sondern daß die eigentlichen Substrate NADH und Pyruvat die Aktivität mitbestimmen. NADH ist wohl kaum geschwindigkeitsbestimmend, da sehr hohe NADH-Pools bestimmt wurden, und der K_M -Wert für NADH sehr niedrig ist. Da der K_M -Wert der Lactat-Dehydrogenase für Pyruvat bei sättigenden FDP-Konzentrationen mit 0,35 mM um den Faktor sechs mal höher ist als für NADH, könnte die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase folglich durch den Pyruvat-Pool bestimmt werden.

Die Hemmung der Lactat-Dehydrogenase von *T. finnis* ist sehr spezifisch. Nur NADPH bewirkte eine vollständige Inhibierung in Konzentrationen, wie sie in der Zelle auftreten, da intrazelluläre NADPH-Pools mit bis zu 4 nmol/mg TG (entspricht ca 1,8 mM) bestimmt wurden. Die Lactat-Dehydrogenase von *Clostridium acetobutylicum* und *T. ethanolicus* werden ebenfalls durch NADPH-Konzentrationen über 1 mM gehemmt (Freier, 1984; Carreira et al., 1982). Inwieweit NADPH die Lactatbildung in diesen Bakterien beeinflusst, ist nicht bekannt. Eine Hemmung anderer bekannter Lactat-Dehydrogenasen durch NADPH ist nicht beschrieben (Garvie, 1980).

Sowohl in den Fed-Batch-Fermentationen als auch kontinuierlichen Kulturen waren die Ethanolbildungsraten (mmol Ethanol/g TG·h) unabhängig von der Xyloseabbaurate. Nahm die Xyloseabbaurate zu, veränderte sich die Ethanol- und Acetatbildungsrate kaum, während die Lactatbildungsrate um den gleichen Faktor wie der Xyloseabbau zunahm, bei annähernd gleicher intrazellulärer FDP-Konzentration. Daraus kann man schließen, daß der Metabolitfluß in Richtung Ethanol- und Acetatbildung gegenüber der Lactatbildung bevorzugt wird, daß sie aber nur mit einer bestimmten Geschwindigkeit ablaufen kann. Für die Ethanolbildung ist die Bereitstellung von NADH und NADPH sowie Acetyl-CoA und Acetaldehyd wichtig.

Die bei der Pyruvatdecarboxylierung auf Ferredoxin übertragenen Elektronen müssen auf NAD oder NADP übertragen werden, um Ethanol ausbeuten über 50% der Theorie zu erhalten (siehe auch Abb.1

und 26). Die Übertragung erfolgt mittels Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen. Lamed und Zeikus (1980a) führen Unterschiede im Endproduktspektrum zwischen *Clostridium thermocellum* LQR1 und *Ta. brockii* auf unterschiedliche Aktivitäten dieser Oxidoreduktasen zurück. Aufgrund der gemessenen Enzymaktivitäten

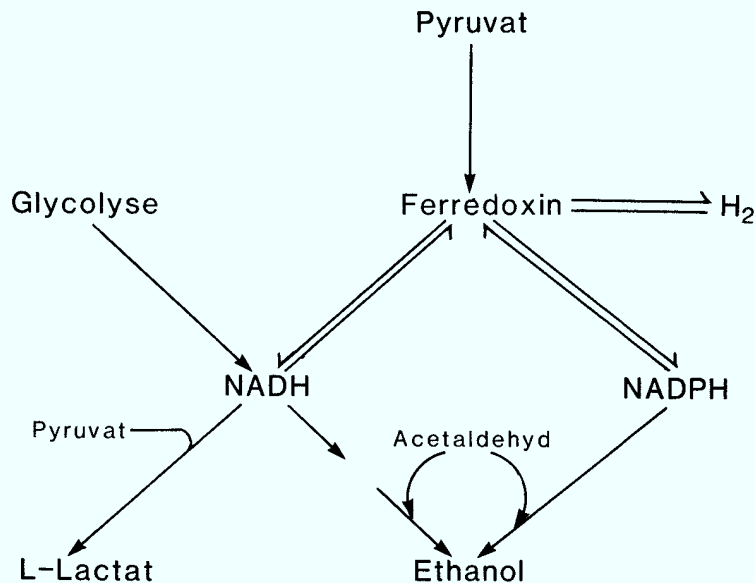


Abb.26: Katabolischer Elektronenfluß in *T. finnis* durch reversible Oxidoreduktasen und Transhydrogenase

ist die NADH-Bildung in *T. finnis* gegenüber der NADPH-Bildung bevorzugt. Die Endprodukthemmung der Ferredoxin-NAD-Oxidoreduktase ist mit einem K_i von 0,75 mM NADH nicht so ausgeprägt wie bei *Clostridium pasteurianum* mit einem K_i von 0,02 mM NADH (Jungermann et al., 1973), so daß in *T. finnis* auch höhere NADH-Konzentrationen entstehen können. Dies wurde auch durch die Bestimmung der intrazellulären Pools bestätigt. Die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase wurde schon durch 0,2 mM NADPH vollständig gehemmt, so daß die gemessenen großen NADPH-Pools nicht mittels dieses Enzymes entstehen konnten. Deshalb muß eine direkte Übertragung von Elektronen von NADH auf NADP durch eine Transhydrogenase angenommen werden, denn nur über diese Aktivität

können die bis zu 2 mM großen NADPH-Pools entstanden sein. Eine direkte Elektronenübertragung von NADH nach NADPH ist bisher für thermophile Ethanolbildner nicht beschrieben worden.

Die gemessenen intrazellulären NADH- und NADPH-Pools in *T. finnis* waren sehr viel höher als für andere aerobe, fakultativ anaerobe und strikt anaerobe Bakterien berichtet wird. Die NAD(P)-Pools waren dagegen niedriger als bisher beschrieben (London und Knight, 1966; Wimpenny und Firth, 1972; Matin und Gottschal, 1976; Andersen und von Meyenburg, 1977).

Nach Andersen und von Meyenburg (1977) wird der 'catabolic reduction charge' ($\text{NADH}/\text{NAD}+\text{NADH}$) bei *E. coli* sehr streng um den Wert 0,05 reguliert, und C-Limitierung oder Sauerstoffmangel haben keinen Einfluß auf den Wert bzw. nur kurzzeitig. Wimpenny und Firth (1972) finden dagegen, daß unter anaeroben Bedingungen die Summe an reduzierten Nucleotiden etwas ansteigt. Einen annähernd konstanten NADH-Pool wurde in der Fed-Batch-Fermentation mit bis zu 80 mM Substrat gemessen, aber auf einem sehr viel höheren Niveau. Durch einen niedrigen 'catabolic reduction charge' können bevorzugt Oxidationen ablaufen und so Reduktionsäquivalente freigesetzt werden (Andersen und von Meyenburg, 1977). Der 'anabolic reduction charge' ($\text{NADPH}/\text{NADP}+\text{NADPH}$) ist in *E. coli* höher als der 'catabolic reduction charge', so daß NADPH-abhängige Reaktionen im Anabolismus begünstigt sind. Der 'anabolic reduction charge' wird auch nicht so stark reguliert, und Hungern bewirkte bei *E. coli* ein Absenken des Charges von 0,45-0,5 auf 0,1-0,2 (Andersen und von Meyenburg, 1977). Für strikt anaerobe Bakterien wurde für *Clostridium pasteurianum* ein 'catabolic reduction charge' von 0,1 und ein 'anabolic reduction charge' von 0,5 beschrieben (Petitdemange et al., 1976).

Bei *T. finnis* kann eine strikte Trennung zwischen 'anabolic reduction charge' und 'catabolic reduction charge' nicht vorgenommen werden, da NADPH durch die NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase auch am Katabolismus beteiligt ist. Hier ist es eher angebracht von 'reduction charge' zu sprechen, also das Verhältnis der reduzierten zu den oxidierten Nucleotiden. Das NAD(P)H/NAD(P)-Verhältnis schwankte zwischen 0,4 und 6,3 und war sehr hoch im Vergleich zu anderen Mikroorganismen, bei denen

dieses Verhältnis zwischen 0,06 bei *Penicillium chrysogenum* und 0,26 bei *Pseudomonas* spec. variierte (Führer et al., 1980). Dieses hohe Verhältnis bedeutet für *T. finnis*, daß Reduktionen (=NAD(P)-Regenerierung) bevorzugt sind, und der Stoffwechselfluß durch NAD limitiert werden kann. Einen Hinweis darauf, daß der Gesamtmetabolismus durch das Verhältnis der oxidierten zu den reduzierten Nucleotiden reguliert wird, zeigen Versuche mit *Ta. brockii*, wo durch Zugabe der Elektronenakzeptoren Aceton, Thiosulfat oder Sulfit sowohl das Wachstum als auch der Glucoseverbrauch beträchtlich gesteigert wurde (Ben-Bassat et al., 1980). NAD(P)H/NAD(P)-Verhältnisse können sogar direkt Enzymaktivitäten beeinflussen, wie dies für die NAD-Xylitol-Dehydrogenase und Xylosereduktase aus *Pachysolen tannophilus* der Fall ist. Die NAD-Xylitol-Dehydrogenase wird durch den 'catabolic reduction charge' reguliert, wobei ein steigender 'catabolic reduction charge' die Xylitolbildung begünstigt. Die Xylosereduktase wird durch den 'anabolic reduction charge' reguliert, interessanterweise unabhängig von der Gesamtkonzentration an NADP und NADPH (Ditzelmüller et al., 1984 a und b). In fakultativ aeroben Bakterien wird angenommen, daß das steigende NADH/NAD-Verhältnis das Signal für anaerobe Bedingungen für die Zelle ist, und Stoffwechselwege induziert werden (Vollbrecht, 1982).

Die Bildung von Acetat in anaeroben Bakterien hängt von der Möglichkeit ab, molekularen Wasserstoff zu bilden. Für Reduktionsäquivalente, die als molekularer Wasserstoff freigesetzt werden können, braucht die Zelle keinen Wasserstoffakzeptor zu synthetisieren, und kann aus Acetyl-CoA Acetat bilden, und dabei ATP regenerieren. Die Freisetzung von Wasserstoff, und damit die Acetatbildung, hängt von der Wasserstoffkonzentration in der Umgebung ab. Ben-Bassat et al. (1981) konnten bei *Ta. brockii* zeigen, daß mit einer Erhöhung der Wasserstoffkonzentration in der Kultur von 0 auf 0,3 atm die Wasserstoffbildung auf $\frac{1}{4}$ zurückging. Gleichzeitig wurde weniger Acetat und mehr Ethanol und Lactat gebildet, so daß das Verhältnis an reduzierten Endprodukten (Ethanol und Lactat) zu Acetat von 10,5 auf 14,6 anstieg. Durch eine weitere Erhöhung des Wasserstoffpartialdruckes auf 0,5 atm stieg das Verhältnis auf 23 an, so

daß über eine Hemmung der Hydrogenase durch H_2 die Bildung von reduzierten Endprodukten erhöht werden kann. Die Wasserstoffkonzentration im Kulturmedium kann über die Rührgeschwindigkeit des Fermenters reguliert werden. Su et al. (1981) konnten mit Kulturen von *Clostridium thermocellum* zeigen, daß mit steigender Rührgeschwindigkeit das Ethanol-/Acetatverhältnis kleiner wurde, und die H_2 -Konzentration in der gerührten Kultur drei mal kleiner war als in Kulturen ohne Rührung. Dies wäre auch eine Erklärung für die erhöhte Acetatbildung in den Versuchen mit den konzentrierten Zellsuspensionen, wo durch häufiges Probeziehen und Nachtitrieren des pH per Hand, der gebildete Wasserstoff besser aus dem Medium entweichen konnte, und so die höhere Acetatbildung ermöglichte. Welches Enzym des Acetatbildungsweges in Gegenwart hoher H_2 -Konzentrationen gehemmt wird, ist in thermophilen Bakterien bisher nicht untersucht worden. In *E. coli* hemmt NADH die Phosphotransacetylase, das erste Enzym auf dem Weg zur Acetatbildung (Suzuki et al., 1969).

Zwischen der Ethanol-/Acetatbildung und der Lactatbildung besteht eine Konkurrenz um Pyruvat. Pyruvat kann entweder direkt zu L-Lactat reduziert, oder aber oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert werden. Hier spalten sich die Wege in Richtung Acetat- oder Ethanolbildung (Abb. 27). Die spezifischen Ethanol- und Acetatbildungsraten blieben in den kontinuierlichen Kulturen gleich, obwohl die Lactatbildungsrate zunahm. Dies zeigt, daß die Geschwindigkeit der Acetyl-CoA-Bildung durch die Lactatbildung nicht beeinträchtigt wird, was auf eine größere Affinität der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Pyruvat hinweist, als die der Lactat-Dehydrogenase zu Pyruvat. In den Versuchen mit den konzentrierten Zellsuspensionen konnten die Kulturen, aufgrund stärkerer Rührung oder häufigerem Probeziehen, mehr Wasserstoff entwickeln, so daß die Acetatbildung, und damit die Geschwindigkeit der Acetyl-CoA-Bildung, anstieg. Dies zeigt, daß die Acetyl-CoA-Bildung nicht limitierend für die Ethanolbildung sein kann.

Die geringe Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität ist vermutlich die Ursache für die beobachtete gleichbleibende Ethanolbildungsrate bei unterschiedlichem Substratverbrauch. Bei niedrigen Substratkonzentrationen, und damit geringerem Substratumsatz,

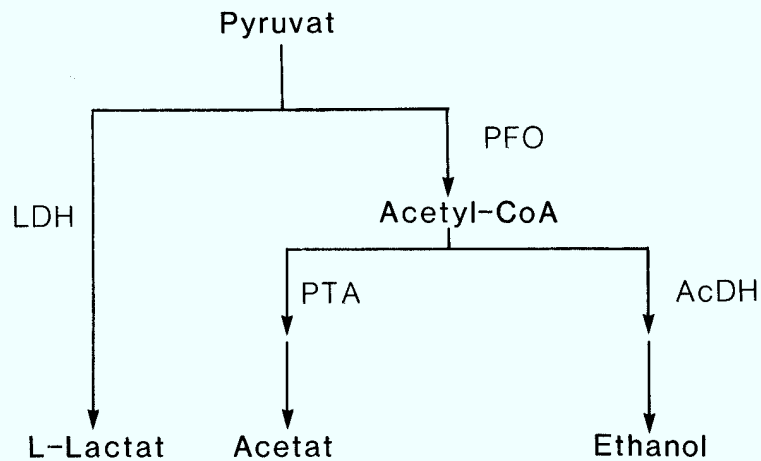


Abb.27: Mögliche Pyruvatabbauwege.

LDH: Lactat-Dehydrogenase

PFO: Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

AcDH: Acetaldehyd-Dehydrogenase

PTA: Phosphotransacetylase

dominiert die Alkoholbildung, aufgrund des günstigeren Metabolitflusses in Richtung Acetyl-CoA. Mit Erreichen der maximalen Geschwindigkeit der Acetaldehydbildung staut sich Acetyl-CoA an. Da die Acetatbildung durch die Wasserstoffabgabe limitiert ist, erhöht sich der Acetyl-CoA- und Pyruvatpool. Erst jetzt, mit Erhöhung des Pyruvatpools, setzt die Lactatbildung ein. Dies würde auch die unterschiedliche Lactatbildung bei annähernd gleichem FDP-Gehalt erklären, zumal der K_M -Wert der Lactat-Dehydrogenase für Pyruvat hoch ist. Um dies zu bestätigen, müßten die Pyruvat- und Acetyl-CoA-Pools sowie die K_M -Werte für Acetyl-CoA-Bildung und -Verbrauch bestimmt werden.

Eine Endprodukthemmung der Alkohol-Dehydrogenase kann ausgeschlossen werden, da frühere in-vitro-Untersuchungen gezeigt haben, daß die NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase erst in Gegenwart von 19% (v/v) Ethanol zu 50% gehemmt wird (Schmid, 1984). Ähnliche Eigenschaften sind auch für die Enzyme aus *Ta. brockii* und *Clostridium thermohydrosulfuricum* beschrieben (Lamed und Zeikus, 1981a).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen verschiedene Wege auf, um die Ethanolbildung aus Zuckern mit thermophilen Bakterien wirtschaftlich interessant zu machen. So konnte gezeigt werden, wie die Regulation der Nebenproduktbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration erfolgt, und daß die Ethanolbildung auf dem Weg von Pyruvat zu Ethanol limitiert ist. Die Isolierung von Mutanten deren Lactat-Dehydrogenase-Aktivität blockiert ist, ist deshalb nur dann sinnvoll, wenn gleichzeitig der Metabolitfluß in Richtung Ethanol gesteigert wird, da eventuell hohe Substratkonzentrationen, aufgrund mangelnder Möglichkeiten NAD zu regenerieren, zu einer Hemmung des Organismus führen können. Das Problem der geringen Ethanoltoleranz kann durch Isolierung von Stämmen mit hoher Ethanoltoleranz und guten Ethanolausbeuten gelöst werden, wie dies bereits bei anderen thermophilen Stämmen erreicht wurde (Avgerinos et al., 1981; Carreira et al., 1982). Eine andere Lösung für dieses Problem ist der kontinuierliche Abzug des Alkohols, dessen Effekt bereits in dieser Arbeit demonstriert wurde. Zusammen mit Biomasserückhaltung oder Immobilisierung könnte die Raum-Zeit-Ausbeute erhöht, und so das Verfahren für eine wirtschaftliche Nutzung interessant werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Xylosevergärung durch das thermophile Bakterium *Thermoanaerobacter finnii* untersucht, insbesondere die Regulation der Endproduktbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

1. Ein neu isoliertes sporenbildendes Bakterium (*AKO-1*) konnte aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften und durch Vergleich von GC-Verhältnissen und DNA-Homologien mit anderen thermophilen Stämmen als nah verwandt zu dem nichtsporenbildenden Bakterium *Thermoanaerobacter ethanolicus* klassifiziert werden, und wurde als *Thermoanaerobacter finnii* eingeordnet.
2. Bei der Vergärung von Xylose zu Ethanol, Acetat, L-Lactat, CO₂ und H₂ ist das quantitative Verhältnis der gebildeten Endprodukte von der Substratkonzentration abhängig. In Batch-Fermentationen mit Xylosekonzentrationen über 66 mM ging die Ethanolausbeute von 1,25 auf 0,85 mol Ethanol/mol Xylose zurück (max. Ausbeute ist 1,66 mol/mol Xylose) und die Lactatbildung nahm zu. In Fed-Batch-Fermentationen mit stationären Xylosekonzentrationen zwischen 20 und 60 mM blieb die Lactatkonzentration gering (2 mM), und aus 200 mM Xylose wurden 230 mM Ethanol gebildet, dies entspricht einer Ausbeute von 70 % des theoretisch maximal erreichbaren Wertes. Mit steigendem Xyloseverbrauch nahm die Lactatbildungsrate zu (von 0,04 auf 1,52 mmol/l·h), während die Ethanolbildungsrate (5,2 bzw. 4,6 mmol/l·h) weitgehend konstant blieb. Die hemmende Wirkung von Ethanol auf Wachstum und Produktbildung konnte durch kontinuierlichen Abzug des gebildeten Alkohols aus dem Kulturmedium, mittels eines inerten Gasstromes, umgangen werden, so daß der Xyloseverbrauch von 200 auf 400 mM gesteigert wurde.
3. Enzymatische Untersuchungen ergaben, daß *T. finnii* Xylose zu Xylulose und Xylulose-5-Phosphat umsetzt, das dann mit Enzymen des Pentosephosphatweges und der Glycolyse zu Pyruvat abgebaut wird. Fructose-1,6-diphosphat ist ein Aktivator der

Lactat-Dehydrogenase, und führt bei dem Enzym zur Erniedrigung der K_M -Werte für NADH und Pyruvat. Die Lactat-Dehydrogenase hat ihr pH-Optimum bei pH 7,0 und wird durch 2 mM NADPH vollständig gehemmt. Die Ferredoxin-NAD-Reduktase hatte mit 1,1 U/mg Protein eine 10 mal höhere Aktivität als die Ferredoxin-NADP-Reduktase. Es wurde erstmals in einem thermophilen Ethanolbildner eine Transhydrogenase nachgewiesen, die Elektronen von NADH auf NADP überträgt. Die Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase war im Vergleich zu den anderen katabolen Enzymaktivitäten in *T. finnii* mit 0,03 U/mg Protein sehr gering.

4. Intrazelluläre Metabolit-Bestimmungen ergaben 1,5 bis 4 nmol NADPH/mg TG und 0,6 bis 2 nmol NADH/mg TG, während die NAD- und NADP-Konzentrationen, mit 0,1 bis 1,2 nmol NAD/mg TG bzw. 0,5-1,2 nmol NADP/mg TG geringer waren. Die intrazellulären Fructose-1,6-diphosphat-Konzentration lag zwischen 1,2 und 8,4 nmol/mg TG. Diese intrazellulären FDP-Konzentrationen sind für eine volle Aktivierung der Lactat-Dehydrogenase ausreichend, so daß die Lactatbildung vermutlich nicht nur von der intrazellulären FDP-Konzentration abhängig ist, sondern von der intrazellulären Pyruvatkonzentration.

VI. Literaturverzeichnis

Allison, M.F., Moore, C.H., Pritchard, G.G. (1982): Phosphofructokinase from *Streptococcus lactis*. *Methods in Enzymol.* 90, 77-82

Andersen, K.B., von Meyenburg, K. (1977): Charges of nicotineamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252(2), 4151-4156

Asther, M., Khan, A.W. (1984): Influence of the presence of *Zymomonas anaerobia* on the conversion of cellobiose, glucose and xylose to ethanol by *Clostridium saccharolyticum*. *Biotechn. Bioeng.* 26, 970-972

Asther, M., Khan, A.W. (1985): Improved fermentation of cellobiose, glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas anaerobia* and a high ethanol tolerant strain of *Clostridium saccharolyticum*. *Appl. Microb. Biotechn.* 21, 234-237

Atkinson, A., Ellwood, D.C., Evans, C.G.T., Yeo, R.G. (1975): Production of alcohol by *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. & Bioengin.* 17, 1375-1377

Atkinson, D.E. (1968): The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7(11), 4030-4034

Avgerinos, G.C., Fang, H-Y., Biocic, J., Wang, D.I.C. (1981): A novel, single-step microbial conversion of cellulosic biomass to ethanol. *Advances in Biotechnology* 2, 119-124

Bak, A.L., Atkins, J.F., Meyer, S.A. (1972): Evolution of DNA base compositions in microorganisms. *Science* 175, 1391-1393

Barnett, J.A. (1976): The utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 125-234

Bartsch,F.-O. (1985): Mikrobielle Umsetzungen von Glycerin, ungesättigte Fettsäuren und Fettalkoholen unter anaeroben Bedingungen. Diplomarbeit, TU Aachen

Ben-Bassat,A., Lamed,R., Ng,T.K., Zeikus,J.G. (1980): Metabolic control for microbial fuel production during thermophilic fermentation of biomass. aus: Energy from biomass and waste IV. Symposium at Lake Buena Vista, Florida. p.275-294

Ben-Bassat,A., Lamed,R., Zeikus,J.G. (1981): Ethanol production by thermophilic bacteria: metabolic control of end product formation in *Thermoanaerobium brockii*. J.of Bacteriol. 146 (1),192-199

Bergmeyer,H-U. (1975): Neue Werte für die molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium. Z.für klin. Chemie und Biochemie 13,507-508

Biely,P.(1985): Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol. 3(11),286-290

Brener,D., Johnson,B.F. (1984): Relationship between substrate concentration and fermentation product ratios in *Clostridium thermocellum* cultures. Appl.Environm.Microbiol. 47 (5),1126-1129

Bridson,E.Y., Brecker,A. (1970): Design and fermentation of microbial culture media. Methods in Microbiol. 3a,229-295

Bruinenberg,P.M., de Bot,P.H.P., van Djiken,J.P., Scheffers,W.A. (1983a): The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts.

Bruinenberg,P.M., van Djiken,J.P., Scheffers,W.A. (1983b): An enzymatic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. J.of Gen.Microbiol. 129,965-971

- Bryant, F., Ljungdahl, L.G. (1981): Characterization of an alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* active with ethanol and secondary alcohols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 793-799
- Bühler, M. (1981): Untersuchungen zu Substratspezifität, Kinetik und Mechanismus von Enolat-Reduktasen aus Clostridien. Dissertation, Universität München
- Carreira, L.H., Ljungdahl, L.G., Bryant, F., Szulczynski, M., Wiegel, J. (1982): Control of products formation with *Thermoanaerobacter ethanolicus*, enzymology and physiology. Proceedings of the 4th international symposium on genetics of industrial microorganisms, Tokyo. p 351-355
- Carreira, L.H., Ljungdahl, L.G. (1983a): Production of ethanol from biopolymers by anaerobic, thermophilic, and extreme thermophilic bacteria. I. Regulation of carbohydrate utilization in mutants of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Biotechn. Bioeng. Symp.* 13, 183-191
- Carreira, L.H., Ljungdahl, L.G. (1983b): Production of ethanol from biomass using anaerobic thermophilic bacteria. Aus: Liquid fuel developments. Wise, D.L. (ed). p 1-29
- Chiang, L.-C., Hsiao, H.Y., Ueng, P.P., Chen, L.-F., Tsao, G.T. (1981): Ethanol production from xylose by enzymic isomerization and yeast fermentation. *Biotechn. Bioeng. Symp.* 11, 263-274
- Chung, J.S., Lee, Y.Y. (1985): Effect of in situ ethanol removal in fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 217-219
- Clarke, A.R., Evington, J.R.N., Dunn, C.R., Atkinson, T., Holbrook, J.J. (1986): The molecular pathway by which fructose-1,6-bisphosphate induces the assembly of a bacterial lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta* 870, 112-126

Cryer, D.R., Eccleshall, R., Marmur, J. (1975): Isolation of yeast DNA. *Methods in Cell Biol.* 12, 39-44

Cysewski, G.R., Wilke, C.R. (1977): Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1125-1143

De Ley, J. (1970): Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. of Bacteriol.* 101, 738-754

De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. (1970): The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Europ. J. Biochem.* 12, 133-142

Dellweg, H., Debus, D., Methner, H., Schulze, D., Saschewag, J. (1982): Xylosevergärung mit *Pachysolen tannophilus*. 5. Symp. *Techn. Mikrobiol.*, Berlin, 200-207

Dische, Z., Borenfreund, E. (1951): A new spectrophotometric method for the detection and determination of ketosugars and trioses. *J. of Biolog. Chem.* 192, 583-587

Ditzelmüller, G., Kubicek, C.P., Wöhrer, W., Röhr, M. (1984a): Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. *Can. J. Microbiol.* 30, 1330-1336

Ditzelmüller, G., Kubicek, C.P., Wöhrer, W., Röhr, M. (1984b): Xylitol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus*. *FEMS- Letters* 25, 195-198

Du Preez, J.G., van der Walt, J.P. (1983): Fermentation of D-Xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Letters* 5(5), 357-362

Du Preez, J.G., Prior, B.A. (1985): A quantitative screening of some xylose fermenting yeast isolates. *Biotechnol. Letters* 7(9), 241-246

- Du Preez, J.G., Bosch, M., Prior, B.A. (1986): Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 360-363
- Finn, R.K., Ramalingham, A. (1977): The vacuform process: a new approach to fermentation. *Biotechn. Bioeng.* 19, 583-589
- Finn, R.K., Bringer, S., Sahm, H. (1984): Fermentation of arabinose to ethanol by *Sarcina ventriculi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 161-166
- Freier, D. (1984): Untersuchungen zur Äthanol- und Butanolbildung durch *Clostridium thermosaccharolyticum* und zur Regulation der Lactat-Dehydrogenasen saccharolytischer Clostridien. Dissertation, Universität Göttingen
- Führer, L., Kubicek, C.P., Röhr, M. (1980): Pyridine nucleotide levels and ratios in *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 26, 405-408
- Garvie, E.J. (1980): Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Reviews* 44(1), 106-139
- Germain, P., Toukourou, F., Donaduzzi, L. (1986): Ethanol production by anaerobic thermophilic bacteria: regulation of lactate dehydrogenase activity in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 300-305
- Giesel, H. (1982): Vorkommen von Enolat-Reduktasen und Aminosäureabbau durch strikte Anaerobier: Intermediate und Enzymaktivitäten. Dissertation, TU München
- Giesel, H. (1984): Die Zukunft der fermentativen Ethanolgewinnung. *Nachrichten aus Chemie und Technik* 32(4), 316-325
- Gillis, M., de Ley, J., de Cleene, M. (1970): The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *Europ. J. Biochem.* 12, 143-153

- Gong, C.-S., Chen, L.-F., Flickinger, M.C., Chiang, L.-C., Tsao, G.T. (1981a): Production of ethanol from xylose by using D-xylose isomerase and yeast. *Appl. Environm. Microbiol.* 41, 430-436
- Gong, C.-S., Chen, L.-F., Flickinger, M.C., Tsao, G.T. (1981b): Conversion of hemicellulose carbohydrates. *Adv. Biotechn. Engin.* 20, 93-118
- Gornall, A.G., Bradawill, C.J., David, M.M. (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. of Biol. Chem.* 197, 751-766
- Götz, F., Schleifer, K.-H. (1975): Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphate activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus epidermidis*. *Arch. Microbiol.* 105, 303-312
- Gutmann, J., Wahlefeld, W.A. (1974): L-Laktatbestimmung. In: *Methoden der enzymatischen Analyse II*, 1510-1514. (Ed) Bergmeyer, H.U.; Verlag Chemie, Weinheim
- Herrero, A., Gomez, R.F., (1981): Inhibition of *Clostridium thermocellum* by fermentation products and related compounds. *Advances in Biotechnology* 2, 213-128
- Herrero, A.A., Gomez, R.F., Roberts, M.F. (1982): Ethanol induced changes in the membrane lipid composition of *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Biophys. Acta* 693, 195-204
- Herrero, A. (1983): End product inhibition in anaerobic fermentations. *Trends in Biotechn.* 1(2), 49-53
- Herrero, A.A., Gomez, R.F., Roberts, M.F. (1985): ^{31}P -NMR studies of *Clostridium thermocellum*. Mechanisms of end product inhibition by ethanol. *J. Biol. Chem.* 260(12), 7442-7451
- Hungate, R.E. (1950): The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Reviews* 14, 1-49

- Huß, V.A.R., Festl, H., Schleifer, K.H. (1983): Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *System. Appl. Microbiol.* 4, 184-192
- Jeffries, T.W. (1981): Fermentation of xylulose to ethanol using xylose isomerase and yeasts. *Biotechn. Bioeng. Symp.* No 11, 315-324
- Jeffries, T.W. (1983): Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. *Adv. Biochem. Eng./Biotechn.* 27, 1-32
- Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., Decker, K. (1973): Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochem. Biophys. Acta* 305, 268-280
- Kondratieva, E.N., Gogotov, J.N. (1983): Production of molecular hydrogen in microorganisms. *Advances in Biochem. Engin.* 28, 139-191
- Kotlarz, D., Buc, H. (1982): Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.* 90, 60-70
- Lamed, R., Zeikus, J.G. (1980 a): Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J. of Bacteriol.* 142(2), 569-578
- Lamed, R., Zeikus, J.G. (1980 b): Glucose fermentation pathway of *Thermoanaerobium brockii*. *J. of Bacteriol.* 141(3), 1251-1257
- Lamed, R., Zeikus, J.G. (1981 a): Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. *Biochem. J.* 195, 183-190

- Lamed, R.J., Keinan, E., Zeikus, J.G. (1981 b): Potential applications of an alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase from thermophilic bacteria. *Enzyme Microb. Techn.* 3, 144-148
- Lee, C.K., Ordal, Z.J. (1967): Regulatory effect of pyruvate on the glucose metabolism of *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. of Bacteriol.* 94(3), 530-536
- Ljungdahl, L.G., Carreira, L., Wiegel, J. (1981): Production of ethanol from carbohydrates using anaerobic thermophilic bacteria. The Ekman Days-International Symp. on Wood and Pulping Chemistry-Stockholm. Vol. 4, 23-28
- London, J., Knight, M. (1966): Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 44, 241-254
- Lovitt, R.W., Longin, R., Zeikus, J.G. (1984): Ethanol production by thermophilic bacteria: physiological comparison of solvent effects and alcohol-tolerant strains of *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environm. Microbiol.* 48(1), 171-177
- Magee, R.J., Kosaric, N. (1985): Bioconversion of hemicellulosics. *Adv. in Biochem. Engin.* 32, 61-93
- Mancuso, A. (1982): Xylose fermentation with *Clostridium thermohydrosulfuricum*. M.S. Thesis, University of California, Berkeley
- Marmur, J. (1961): A rapid procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. of Mol. Biol.* 3, 208-218
- Matin, A., Gottschal, J.C. (1976): Influence of dilution rate on NAD(P) and NAD(P)H concentrations and ratios in a *Pseudomonas* sp. grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 94, 241-254

- Michal, G., Beutler, H. (1974): Fructose-1,6-diphosphat, Dihydroxyacetonphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat. Methoden der enzymatische Analyse, 1359-1364. H.U.Bergmeyer (ed.), Verlag Chemie, Weinheim
- Miller, G.L. (1959): Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Analyt.Chem.* 31(3), 426-428
- Murray, W.D., Khan, A.W. (1983): Ethanol production by a newly isolated anaerobe, *Clostridium saccharolyticum*: effects of culture medium and growth conditions. *Can.J.Microbiol.* 29, 342-347
- Neuberger, M.S., Hartley, B.S., Walker, J.E. (1981): Purification and properties of D-ribulokinase and D-xylulokinase from *Klebsiella aerogenes*. *Biochem.J.* 193, 513-524
- Neimark, H., Tung, C.M. (1973): Properties of a fructose-1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase from *Acholeplasma laidlawii* type A. *J.of Bacteriol.* 114, 1025-1033
- Parekh, S., Wayman, M. (1986): Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechn.Letters* 8, 597-600
- Parkkinen, E., Mattila, A. (1982): Die Vergärung verschiedener Zucker durch *Clostridium thermohydrosulfuricum*. 5.Symp. Techn. Mikrobiol., Berlin. p237-242. (Hrsg. H.Dellweg)
- Parkkinen, E., Korhola, M. (1984): Starch fermentation by *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Europ.Federation of Biotechn. (ed). Third Europ.Congress on Biotechn.* 2, 223-230
- Parkkinen, E. (1986): Conversion of starch into ethanol by *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl.Microbiol.Biotechn.* 25, 213-219

Patel, B.K.C., Morgan, H.W., Daniel, R.M. (1986): Studies on some thermophilic glycolytic anaerobic bacteria from New Zealand hot springs. *System. Appl. Microbiol.* 8, 128-136

Payton, M.A. (1984): Production of ethanol by thermophilic bacteria. *Trends in Biotechn.* 2, 153-158

Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G., Gay, R. (1976): Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreduktases in Clostridia of the butyric group. *Biochem. Biophys. Acta* 421, 334-347

Ragsdale, S.W., Ljungdahl, L.G. (1984): Hydrogenases from *Acetogenium woodii*. *Arch. Microbiol.* 139, 361-365

Rudolph, F.B., Purich, D.L., Fromm, H.J. (1968): Coenzyme A-linked aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. of Biol. Chem.* 243, 5539-5545

Rydström, J. (1979): Assay of nicotineamide nucleotide transhydrogenases in mammalian, bacterial and reconstituted systems. *Methods in Enzymol.* 55, 261-275

Sachdev, R.K., Mutharasan, R. (1984): Characterization of xylose isomerase derived from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Abstract 188th ACS Meeting, Philadelphia, Pennsylvania August 26-31

Sahm, H. (1979): Pflanzliche Rückstände als Substrate in der Biotechnologie. *Forum Mikrobiologie* 2, 177-182

Schepers, H.-J., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1987): Fermentation of D-xylose to ethanol by *Bacillus macerans*. *Z. Naturforschung* 42c, 401-407

Scherer, P.A., Bochem, H.-P. (1983): Ultrastructural investigation of 12 *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphate-like inclusions. *Can. J. Microbiol.* 29, 1190-1199

- Schimz, K-L., Rütten, B., Tretter, M. (1981): Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyzer. *Advances in Biotechnol.* 1, 457-461
- Schleifer, K-H., Kandler, O. (1967): Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptococci. I. Aminosäuresequenz des Mureins von *Streptococcus thermophilus* und *Streptococcus faecalis*. *Archiv für Mikrobiol.* 57, 335-364
- Schlösser, E.-M. (1987): Reaktionstechnische Untersuchungen zur thermophilen anaeroben Xylosefermentation zu Ethanol mittels *Thermoanaerobacter finnii*. Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
- Schmid, U. (1984): Untersuchungen zur Ethanolbildung bei thermophilen Bakterien. Diplomarbeit, Universität Tübingen
- Schmid, U., Giesel, H., Schoberth, S.M., Sahm, H. (1986): *Thermoanaerobacter finnii* spec. nov., a new ethanologenic sporogenous bacterium. *Systemat. Appl. Microbiol.* 8, 80-85
- Schneider, H., Wang, P.Y., Chan, Y.K., Maleszka, R. (1981): Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Letters* 3, 89-92
- Sleytr, U.B., Glauert, A.M. (1976): Ultrastructure of the cell walls of two closely related Clostridia that possess different regular arrays of surface subunits. *J. Bact.* 126(2), 869-882
- Slininger, P.J., Bothast, R.J., van Cauwenberge, J.E., Kurtzman, C.P. (1982): Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 371-384
- Sonnleitner, B. (1983): Biotechnology of thermophilic bacterial growth, products and application. *Adv. Biochem. Engin.* 28, 69-137

- Sonnleitner, B., Fiechter, A. (1983): Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. Trends in Biotechn. 1,74-79
- Sprey, B., Bochem, H.P., Schoberth, S.M. (1982): Struktur und funktionelle Aspekte methanbildender Bakterien. 5.Symposium Technische Mikrobiologie, Berlin p 39-44
- Spielmann, H., Jakob-Müller, U., Schulz, P. (1981): Simple assay of 0.1-1.0 pmol ATP, ADP and AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase. Analytical Biochem. 113,172-178
- Spurr, A.R. (1969): A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J.Ultrastructure Research 26,31-43
- Su, T.M., Lamed, R., Lobos, J.H. (1981): Effect of stirring and H₂ on ethanol production by thermophilic fermentation. Proceedings of the Second World Congress of Chemical Engineering, Montreal p 352-356
- Suihko, M.-L., Poutanen, K. (1984): D-xylulose fermentation by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biotechn.Letters 6,189-194
- Suzuki, T., Abiko, Y., Shimizu, M. (1969): Activation and inhibition of *Escherichia coli* B by pyruvate and by NADH₂ and certain nucleotides. Biochem.Biophys.Res.Commun. 35,102-108
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. (1984): Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. Appl.Environm.Microbiol. 47,1221-1223
- van Tilburg, R. (1984): Enzymic isomerization of corn starch-based glucose syrups. Aus: Starch Technology. G.M.A. van Beynum, J.A.Roels (eds). Marcel Dekker Inc. New York and Basel. p175-236
- Venable, J.H., Coggeshall, R. (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. Cell Biol. 25,407-408

- Voelter, H., Bauer, H., Hofmann, W.U. (1974): Hydrolyse und Trennmethode von Kohlenhydraten. Fachzeitschrift für das Laboratorium, April 1974, 331-334 und 444-446
- Vollbrecht, D. (1982): Oxygen-dependent switch-over from respiratory to fermentative metabolism in the strictly aerobic *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15, 117-122
- von Bremen, L., Schmoltzi, M. (1986): Economics and politics of the ethanol market. Trends in Biotechnol. 2, 16-23
- Wang, P.Y., Shopsis, C., Schneider, H. (1980a): Fermentation of a pentose by yeasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 248-254
- Wang, D.I.C., Fang, H.-Y. (1980): Ethanol production by a thermophilic and anaerobic bacterium using xylose. National Meeting of the American Chem. Society Division of Petroleum and Fuels. San Francisco, CA, August 25-28
- Wang, D.I.C., Avgerinos, G.C., Biocic, J., Wang, S.D., Fang, H.-Y. (1983): Ethanol from cellulosic biomass. Phil. Trans. Royal Society of London (B) 300, 323-333
- Wang, P.Y., Johnson, B.F., Schneider, H. (1980b): Fermentation of D-xylose by yeasts using glucose-isomerase in the medium to convert D-xylose to D-xylulose. Biotechnol. Letters 2, 273-278
- Wayman, M., Parekh, S. (1985): Ethanol and sugar tolerance of *Candida shehatae*. Biotechnol. Letters 7 (12), 909-912
- Weimer, P.J. (1985): Thermophilic anaerobic fermentation of hemicellulose and hemicellulose-derived sugars by *Thermoanaerobacter* strain B6A. Arch. Microb. 143, 130-136
- Wiegel, J., Ljungdahl, L.G., Rawson, J. (1979): Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. J. of Bacteriology 139, 800-810

- Wiegel, J. (1980): Formation of ethanol by bacteria: A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. *Experientia* 36, 1434-1446
- Wiegel, J., Ljungdahl, L.G. (1981): *Thermoanaerobacter ethanolicus*, a new, extreme thermophilic anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 128, 343-348
- Wiegel, J., Puls, J. (1982): Production of ethanol from hemicelluloses of hardwoods and annual plants. Proceedings of the Intern. Conf. Energy on Biomass. 20-23 Sept, Berlin. A. Strub, P. Chartier, G. Schleser (ed). Appl. Science Publishers, London, New York.
- Wiegel, J., Carreira, L.H., Mothershed, C.P., Puls, J. (1983): Production of ethanol from biopolymers by anaerobic, thermophilic bacteria. II. *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200 and its mutants in batch cultures and resting cell experiments. *Biotechn. Bioengin. Symp.* 13, 193-205
- Williamson, J.R., Corkey, B.E. (1973): Assays of intermediates of citric acid cycle and related compounds by fluorimetric enzyme methods. *Methods in Enzymology* 13, 434-513
- Wimpenny, J.W.T., Firth A. (1972): Levels of nicotineamide adenine dinucleotide and reduced nicotineamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J. of Bacteriol.* 111, 24-32
- Woods, M.A., Millis, N.F. (1985): Effect of slow feeding of xylose on ethanol yield by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechn. Letters* 7(7), 679-682
- Yamada, T., Carlsson, J. (1975): Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in *Streptococci*. *J. of Bacteriol.* 124(1), 55-61

Yamanaka, K. (1966): D-xylose isomerase.
Methods in Enzymology 9, 588-593

Yamanaka, K. (1968): Purification, crystallization and properties of the D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*.
Biochem. et Biophys. Acta 151, 670-680

Zeikus, J.G., Hegge, J.F., Anderson, M.A. (1979): *Thermoanaerobium brockii* - a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. Arch. Microbiol. 122, 41-48

Zeikus, J.G., Ben-Bassat, A., Ng, T.K., Lamed, R.J. (1981): Thermophilic ethanol fermentations. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals (Hollaender, A., ed.), Plenum Press, N.Y.; p 442-461

Zeikus, J.G. (1985): Biology of spore-forming anaerobes. Biotechnology Series 6, 79-144. Ed. Demain A.L., Solomon, N.A.; The Benjamin Cummings Publ. Com.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie 1 der Kernforschungsanlage Jülich GmbH ausgeführt.

Herrn Prof.Dr. H.Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und die Anregungen für die Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für ihre Unterstützung und das gute Betriebsklima.

Frau Dr.H.Giesel-Bühler möchte ich für die Unterstützung am Anfang dieser Arbeit danken.

Danken möchte ich Herrn Dr.V.Huß von der Universität Erlangen, daß ich in seinem Labor und unter seiner Anleitung die DNA-Hybridisierungsexperimente durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-L. Schimz für die wertvollen Ratschläge und Diskussionsbeiträge, sowie der Hilfe bei den bioluminometrischen Bestimmungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Projektförderung des BMFT von der Firma Schott, Mainz finanziell unterstützt.

