



FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

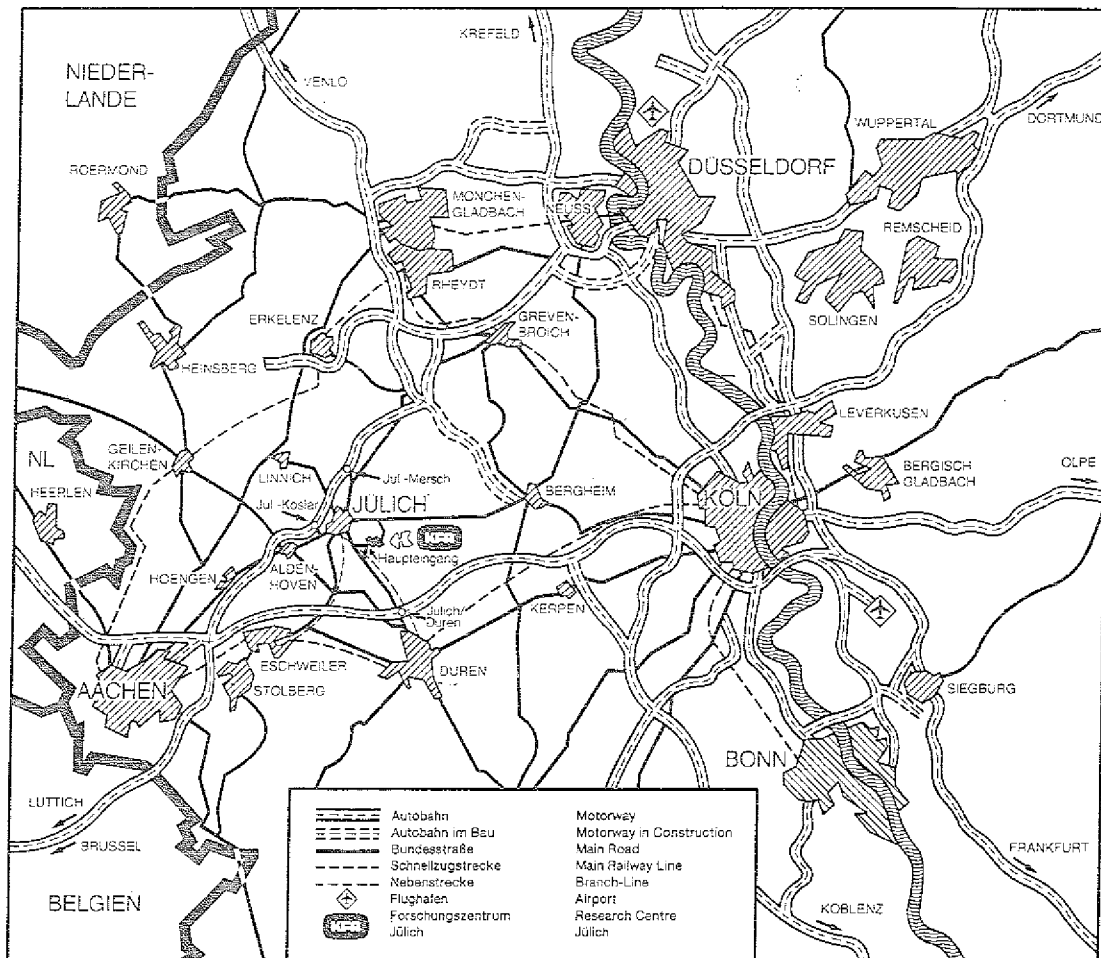
Institut für Biotechnologie

**Gewinnung alkalischer Serinprotease
durch kontrollierte Kultivierung von
*Bacillus licheniformis***

von

Ulrich Eberhard Giesecke

Jül-2387
September 1990
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Forschungszentrum Jülich: Berichte Nr. 2387

Institut für Biotechnologie JÜL-2387

D 5 (Diss. Universität Bonn)

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK · Forschungszentrum Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/61-0 · Telex: 833556-70 kfa d · Telefax: 02461/61-6103

**Gewinnung alkalischer Serinprotease
durch kontrollierte Kultivierung von
*Bacillus licheniformis***

von

Ulrich Eberhard Giesecke

Handwritten text, possibly a signature or a name, written in cursive script.

I. Inhaltsverzeichnis

1-0	Einleitung.....	1
1-1	Allgemeiner Überblick über Proteasen.....	1
1-2	Einsatz von Proteasen in Waschmitteln.....	3
1-3	Subtilisin und sein Katalysemechanismus.....	4
1-4	DNA- und Aminosäuresequenz von Subtilisin Carlsberg....	5
1-5	Allgemeine Regulationsmechanismen der Biosynthese.....	8
1-6	Regulation der Proteaseproduktion.....	12
1-7	Export und Reifung von Subtilisin Carlsberg.....	13
2-0	Kinetik der Kultivierung von Mikroorganismen.....	14
2-1	Formen der Kultivierung von Mikroorganismen.....	14
2-2	Formale Behandlung verschiedener Kultivierungsarten...	15
2-3	Wachstumsphasen.....	16
2-4	Kinetik von Wachstum und Zelllysis.....	17
2-5	Kinetik der Produktbildung.....	19
2-6	Subtilisinbildung im diskontinuierlichen Modell.....	20
2-7	Subtilisinbildung im halbkontinuierlichen Modell.....	24
2-8	Subtilisinbildung im kontinuierlichen Modell.....	26
3-0	Material und Methoden.....	31
3-1	Schüttelkolben.....	31
3-2	Fermenter.....	31
3-3	Thermostatisierung und Sterilisation.....	35
3-4	Füllstands-Messung und -Regelung.....	36
3-5	pH-Messung und -Regelung.....	36
3-6	Belüftung und Innendruckregelung.....	37
3-7	Drehzahlregelung.....	37
3-8	pO ₂ -Messung und -Regelung.....	38
3-9	Kontinuierliche Probenahme.....	39
3-10	NH ₃ -Messung und -Regelung.....	41

3-11	Glycerin-Messung und -Regelung.....	43
3-11-1	Offline-Glycerin-Messung.....	43
3-11-2	Online-Glycerin-Messung und -Regelung.....	45
3-12	Protease-Messung.....	51
3-12-1	Offline-Protease-Messung.....	51
3-12-2	Online-Protease-Messung.....	56
3-13	Biomasse-Bestimmung.....	57
3-13-1	Trockengewichts-Bestimmung.....	57
3-13-2	Inline-Messung der optischen Dichte.....	57
3-14	Prozeßleitsystem.....	58
3-15	Integraler und differentialer Kompensationsregler.....	59
4-0	Fermentationsergebnisse und Diskussion.....	65
4-1	Fermentationen mit dem komplexen Proteinmedium.....	65
4-1-1	Stammhaltung.....	65
4-1-2	Vorkulturbedingungen.....	65
4-1-3	Fermenterkulturbedingungen.....	66
4-1-4	Batchfermentationen mit dem Proteinmedium.....	67
4-1-5	Kontinuierliche Fermentationen mit dem Proteinmedium..	69
4-2	Fermentationen mit dem synthetischen Glycerinmedium...	73
4-2-1	Stammhaltung.....	74
4-2-2	Vorkulturbedingungen.....	74
4-2-3	Fermenterkulturbedingungen.....	76
4-2-4	Batchfermentationen mit dem Glycerinmedium.....	76
4-2-5	Kontinuierliche Fermentationen mit dem Glycerinmedium.	80
4-2-6	Fedbatchfermentationen mit dem Glycerinmedium.....	84
5-0	Zusammenfassung.....	94
6-0	Literatur.....	97

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Reaktionsmechanismus der Proteinhydrolyse durch Subtilisin Carlsberg.....	5
Abb. 2	DNA- und Aminosäuresequenz von Subtilisin Carlsberg aus <i>Bacillus licheniformis</i>	7
Abb. 3	Einfluß von Attenuation und stringent control auf die Biosynthese.....	11
Abb. 4	Hypothetischer Transport von Subtilisin Carlsberg vom Cytoplasma in den extrazellulären Raum.....	13
Abb. 5	Modell von Wachstum und Produktbildung.....	21
Abb. 6	Subtilisinbildung im diskontinuierlichen Modell.....	23
Abb. 7	Subtilisinbildung im halbkontinuierlichen Modell.....	25
Abb. 8	Subtilisinbildung im kontinuierlichen Modell.....	27
Abb. 9	XD-Diagramm der Subtilisinbildung im Modell.....	29
Abb. 10	Fließschema für die kontinuierliche Kultur.....	31
Abb. 11	Gesamtansicht des kontinuierlich betriebenen Fermenters.....	32
Abb. 12	Vorderansicht des Fedbatchfermenters.....	33
Abb. 13	Rückansicht des Fedbatchfermenters.....	34
Abb. 14	Fließschema für die Fedbatchkultur.....	35
Abb. 15	BioPEM-Probe-Entnahme-Modul aus Plexiglas.....	39
Abb. 16	Hollowfibermembranmodule.....	41
Abb. 17	Photo der originalen und modifizierten Ammoniakelektrode.....	42
Abb. 18	Photo des originalen und modifizierten Membrankörpers.....	43
Abb. 19	Flow-Injection-Analysis von Glycerin Aktivierung durch NH_4^+ - und K^+ -Ionen.....	47
Abb. 20	Ansicht des Flow-Injection-Analyzers.....	48
Abb. 21	Fließschema der Flow-Injection-Analysis von Glycerin..	49
Abb. 22	Flow-Injection-Analysis von Glycerin Substrateinfluß.....	50
Abb. 23	Flow-Injection-Analysis von Glycerin Coenzymeinfluß.....	51

Abb. 24	Zeitverlauf der Esterolyse durch Subtilisin.....	52
Abb. 25	Substrateinfluß der Esterolyse durch Subtilisin.....	53
Abb. 26	pH-Einfluß der Esterolyse durch Subtilisin.....	54
Abb. 27	Temperatureinfluß der Esterolyse durch Subtilisin unter Testbedingungen.....	55
Abb. 28	Fließschema der Flow-Injection-Analysis von Protease..	56
Abb. 29	Schema des integralen differentialen Kompensations- reglers.....	60
Abb. 30	Fedbatchsimulation zur Nachdosierung von Ammonium mit Hilfe des ID-Kompensationsreglers.....	61
Abb. 31	Drehzahlregelung des pO_2 -Wertes mit Hilfe des ID- Kompensationsreglers.....	62
Abb. 32	Nachdosierung vom Ammonium mit Hilfe des ID-Kompen- sationsreglers.....	63
Abb. 33	Nachdosierung von Glycerin mit Hilfe des ID-Kompen- sationsreglers.....	64
Abb. 34	pH-ungeregelte Batchkultur mit dem originalen, also vierfach konzentrierten Proteinmedium, 39°C, 700 Upm, 1,5 vvm.....	68
Abb. 35	Chemostatkultur mit dem modifizierten Proteinmedium, 1 d Verweilzeit, 39°C, pH 7, 700 Upm, 1 vvm.....	71
Abb. 36	Enzymaufreinigung durch fraktionierte Acetonfällung von Kulturbrühe aus einer Fermentation mit dem Gly- cerinmedium.....	73
Abb. 37	pH-ungeregelte Batchkultur mit dem Glycerinmedium für Schüttelkolben, 39°C, 700 Upm, 1 vvm.....	77
Abb. 38	Batchkultur mit dem Glycerinmedium, 39°C, pH 7, 300 Upm, 1 vvm.....	79
Abb. 39	Chemostatkultur mit dem Glycerinmedium, 1 d Verweil- zeit, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm.....	81
Abb. 40	NH_3 -Auxostatkultur mit dem Glycerinmedium, maximal 2 d Verweilzeit, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm...	83
Abb. 41	Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin und Ammonium handreguliert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm.....	85
Abb. 42	Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin handreguliert, Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm.....	87

Abb. 43	Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin handreguliert, Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO ₂ , 1 vvm.....	88
Abb. 44	Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin und Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO ₂ , 1 vvm.....	91
Abb. 45	Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin und Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO ₂ , 1 vvm.....	93
Abb. 46	Stadien der Proteaseproduktion mit <i>Bacillus licheniformis</i>	96

III. Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Einordnung proteolytischer Enzyme nach dem Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry.....	1
Tab. 2	Weltproduktion der wichtigsten industriellen Enzyme....	3
Tab. 3	Elemente eines Gens.....	9
Tab. 4	Eigenschaften der Hollowfibermembranmodule.....	40
Tab. 5	Bedingungen in der Batchkultur mit dem Proteinmedium..	67
Tab. 6	Bedingungen in der Chemostatkultur mit dem Proteinmedium.....	69
Tab. 7	Bedingungen in der Batchkultur mit dem Glycerinmedium.....	78
Tab. 8	Bedingungen in der kontinuierlichen Kultur mit dem Glycerinmedium.....	80
Tab. 9	Bedingungen in der Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium.....	84
Tab. 10	Daten einer Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium.....	92

IV. Verzeichnis der Formelsymbole

a	[-]	Wachstumsgekoppelter Produktbildungsfaktor
a _{max}	[-]	Maximaler wachstumsgekoppelter Produktbildungsfaktor
b	[h ⁻¹]	Wachstumsunabhängige Produktbildung
b _{max}	[h ⁻¹]	Maximale wachstumsunabhängige Produktbildung
c	[g/l]	Konzentration, Istwert
c ₀	[g/l]	Konzentration im zulaufenden Medium
c _{Glycerin}	[mM]	Glyceringehalt
c(O ₂)	[g/l]	Gelöstsauerstoff
c _s	[g/l]	Konzentration, Sollwert
d	[cm]	Schichtdicke der Küvette
D	[h ⁻¹]	Durchflußrate
dt	[s]	Zeitdifferenz zwischen zwei Messungen i
E _{L,0}	[-]	Startextinktion des Leerwertes
E _{L,1}	[-]	Endextinktion des Leerwertes
E _{p,0}	[-]	Startextinktion der Probe
E _{p,1}	[-]	Endextinktion der Probe
EMK	[mV]	Elektromotorische Kraft
F	[C/mol]	Faraday-Konstante
H	[g/(l·mbar)]	Henry-Konstante
I	[g/l]	Inhibitor
k _i	[g/l]	Inhibitorkonstante
k _{i,p}	[g/l]	Inhibitorkonstante der Subtilisinbildung
k _{i,x}	[g/l]	Inhibitorkonstante des Biomasseabbaus
k _{m,C}	[g/l]	Michaelis-Menten-Konstante für Glycerin
k _{m,i}	[g/l]	Michaelis-Menten-Konstante für Substrat S _i
k _{m,N}	[g/l]	Michaelis-Menten-Konstante für Ammoniumsulfat
k _p	[1/(g·h)]	Abbaurrate von Subtilisin
k _s	[g/l]	Halbmaximale Sättigungskonstante

$k_{S,C}$	[g/l]	Monod-Konstante für Glycerin
$k_{S,N}$	[g/l]	Monod-Konstante für Ammoniumsulfat
m	[h ⁻¹]	Maintenance
n	[mol]	Molzahl
P	[g/l]	Produkt
P_a	[g/l]	Wachstumsgekoppeltes Subtilisin
P_b	[g/l]	Wachstumsunabhängiges Subtilisin
pO_2	[mbar]	Sauerstoffpartialdruck
R	[J/(K·mol)]	Ideale Gaskonstante
R	[g/(l·h)]	Substratverbrauch (Störgröße)
S	[g/l]	Substrat
S_C	[g/l]	Kohlenstoffquelle, Glycerin
S_C°	[g/l]	Kohlenstoffquelle im zulaufenden Medium
S_N	[g/l]	Stickstoffquelle, Ammoniumsulfat
S_N°	[g/l]	Stickstoffquelle im zulaufenden Medium
$S_{N,max}$	[g/l]	Optimaler Gehalt an Ammoniumsulfat
t	[h]	Zeit
T	[K]	Temperatur
v	[μl]	Probenvolumen
V	[μl]	Testvolumen
V_{max}	[mM/min]	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X	[g/l]	Biomasse
$Y_{P/C}$	[-]	Ausbeutekoeffizient Subtilisin aus Glycerin
$Y_{P/N}$	[-]	Ausbeutekoeffizient Subtilisin aus Ammoniumsulfat
$Y_{P/S}$	[-]	Ausbeutekoeffizient Produkt aus Substrat
$Y_{X/C}$	[-]	Ausbeutekoeffizient Biomasse aus Glycerin
$Y_{X/N}$	[-]	Ausbeutekoeffizient Biomasse aus Ammoniumsulfat
$Y_{X/S}$	[-]	Ausbeutekoeffizient Biomasse aus Substrat
Z	[g/(l·h)]	Substratzufuhr, Stellgröße
Z_C	[g/(l·h)]	Zufuhr an Glycerin
Z_N	[g/(l·h)]	Zufuhr an Ammoniumsulfat

$\epsilon_{340\text{nm}}$	[mM/cm]	Molarer Extinktionkoeffizient bei 340 nm
μ	[h ⁻¹]	Spezifische Wachstumsrate
μ_i	[h ⁻¹]	Spezifische Rate für Wachstum auf Substrat S _i
μ_{max}	[h ⁻¹]	Maximale spezifische Wachstumsrate
π	[h ⁻¹]	Spezifische Produktbildung
π_a	[h ⁻¹]	Spezifische Bildung von P _a
π_b	[h ⁻¹]	Spezifische Bildung von P _b
σ	[h ⁻¹]	Spezifische Sterberate

V. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAP	Catabolite Activator Protein
CBZ	Carbobenzoxy-Schutzgruppe für Aminosäuren
CPG	Controlled-Pore-Glas
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Gl.	Gleichung
GDH	Glycerin-Dehydrogenase
GK	Glycero-Kinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
ID	Integral und differential
Kap.	Kapitel
LDH	Lactat-Dehydrogenase
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OD ₆₆₀	Optische Dichte bei 660 nm
PE	Proteaseeinheiten
PEP	Phosphoenolpyruvat
PID	Proportional, integral und differential
PK	Pyruvat-Kinase
ppGpp	Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat
pppGpp	Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer Ribonucleinsäure
Tab.	Tabelle
Upm	Rührerdrehzahl in Umdrehungen pro Minute
vvm	Belüftung in Gasvolumen pro Kulturvolumen und Minute

1-0 Einleitung

Im Zentrum der Untersuchungen zur Gewinnung der alkalischen Serinprotease Subtilisin Carlsberg stand der Hochleistungsproduzent *Bacillus licheniformis* DSM 641. Aufgabe war es, die Mechanismen der Exoenzymausschüttung zu erkennen und in einem Produktionsverfahren möglichst effektiv zu nutzen. Wichtigstes Instrument hierfür war die Online-Messung und -Regelung der bedeutendsten Einflußgrößen.

1-1 Allgemeiner Überblick über Proteasen

Seit 1964 erfolgt die Einteilung aller Enzyme nach dem mehrfach aktualisierten Enzyme-Classification-System des Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Zur Identifizierung der katalytischen Aktivität werden viergliedrige EC-Nummern vergeben. Proteolytische Enzyme gehören in die Hauptklasse 3 der Hydrolasen und in die Unterklasse 4 der auf Peptidbindungen wirkenden Hydrolasen. Nach exo- und endo-Angriff auf die Peptidbindung unterscheidet man Peptidasen (Untergruppen 11 - 19) und Proteasen (Untergruppen 21 - 24). Ein Schema gibt die Klassifizierung in Untergruppen und die Numerierung der zugehörigen Enzyme wieder {Tab. 1}:

EC-Nummer	Bezeichnung
3.4.11.1-14	α -Aminoacylpeptidhydrolasen
3.4.13.3-13	Dipeptidhydrolasen
3.4.14.1-5	Dipeptidylpeptidhydrolasen
3.4.15.1-3	Peptidyldipeptidhydrolasen
3.4.16.1-3	Serincarboxypeptidasen
3.4.17.1-9	Metallo-carboxypeptidasen
3.4.18.1-1	Cystein-carboxypeptidasen
3.4.19.1-3	Omegapeptidasen
3.4.21.1-52	Serinproteasen
3.4.22.1-18	Cysteinproteasen
3.4.23.1-15	Asparaginsäureproteasen
3.4.24.1-24	Metalloproteasen
3.4.99.2-36	Proteasen mit unbekanntem Katalysemechanismus

Tab. 1: Einordnung proteolytischer Enzyme nach dem Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry [87]

Aminopeptidasen lösen vom N-terminalen Ende die Peptidbindung. Bekannt sind 14 in der Regel intrazelluläre Enzyme, die von Bakterien, Hefen und Pilzen gebildet werden. Sie benötigen oft zweiwer-

tige Kationen zur Entfaltung ihrer vollen Aktivität. Ihr pH-Optimum liegt im leicht alkalischen Bereich. Einige Aminopeptidasen sind hochspezifisch bei der Spaltung von Peptidbindungen [86,87].

Dipeptidasen greifen Dipeptide mit meist hoher Spezifität an. Sie werden von Bakterien, Hefen und tierischen Zellen produziert [87].

Dipeptidylpeptidhydrolasen spalten N-terminal von Polypeptiden Dipeptide ab [87].

Peptidyl-dipeptidhydrolasen dagegen spalten C-terminal von Polypeptiden Dipeptide ab [87].

Carboxypeptidasen greifen das C-terminale Peptidende an. In Abhängigkeit vom aktiven Zentrum werden Serin-, Metallo- und Cystein-Carboxypeptidasen unterschieden:

Serincarboxypeptidasen besitzen ein weites Substratspektrum mit optimaler Aktivität im pH-Bereich 4,5 - 6,0. Sie werden als extrazelluläre Enzyme von vielen Pflanzen, Tieren, Hefen, *Penicillium* und *Aspergillus species* gebildet.

Metallo-carboxypeptidasen setzen meist sehr spezifisch einzelne Aminosäuren frei, nach denen sie bezeichnet werden. Sie werden von Tieren, Bakterien und Hefen erzeugt. Carboxypeptidase B und Aspartatcarboxypeptidase benötigen eine Aktivierung durch Zn^{2+} - oder Co^{2+} -Ionen.

Cystein-carboxypeptidase aus Lysomen reagiert unspezifisch [86,87].

Omegapeptidasen spalten N- oder C-terminal substituierte Aminosäuren ab. Sie treten z. B. in *Pseudomonas species*, *Bacillus subtilis* und Rattenleber auf [87].

Mit 52 aufgeführten Einzelenzymen bilden die Serinproteasen die größte Untergruppe, zu der so bekannte Enzyme wie Chymotrypsin und Trypsin zählen. Bei diesen Endoproteasen sind vor allem Serin und Histidin am katalytischen Prozeß beteiligt:

Unter ökonomischen Gesichtspunkten sind die alkalischen Proteasen am wichtigsten. Sie werden von verschiedenen Bakterien und Pilzen erzeugt. Wie ihr Name andeutet, sind sie im alkalischen Bereich bei pH 10 aktiv. Ähnlich dem Chymotrypsin zeigen sie eine Spezifität gegenüber aromatischen und hydrophoben Aminosäuren. Hierzu gehören die Subtilisine, die als Waschmittelzusätze die wirtschaftlich bedeutendsten Enzyme sind. Alkalische Proteasen werden auch zum Enthaaren von Häuten genutzt [86,87].

Cystein-(Thiol-)Proteasen besitzen Cystein im katalytischen Zentrum und sind im Neutralen am aktivsten. In diese Untergruppe fällt als bekanntestes Enzym Papain [87].

Bei Asparaginsäure-(Carboxyl-)Proteasen steht Asparaginsäure oder auch Glutaminsäure im aktiven Zentrum. Das pH-Optimum liegt im

Sauren. Bekanntestes Einzelenzym ist das Pepsin. Wirtschaftliche Bedeutung haben die mikrobiellen Asparaginsäureproteasen gefunden: Pepsinähnliche saure Proteasen werden von *Aspergillus*, *Rhizopus* und *Penicillium* Arten gebildet. *Aspergillus sato*i Carboxylprotease wird zum Vorverdauen von Nahrungsmitteln genutzt. *Aspergillus oryzae* saure Protease findet breite Anwendung bei der Sojasoßenbereitung und beim Aufschluß von Gluten beim Backen und Getreidemahlen. Labfermentähnliche saure Proteasen von *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* und *Mucor miehei* haben in Molkereien Einzug gefunden und dort bei der Quarkbildung zum Teil Kalbslab ersetzt. Calcium wird für die volle Entfaltung katalytischer Aktivität benötigt [86,87].

Metalloproteasen benötigen meist Zink essentiell im aktiven Zentrum. Oft ist auch Calcium für die Stabilität notwendig. Im Gegensatz zu den häufig zugleich auftretenden Serinproteasen besitzen Metalloproteasen keine Amidase- und esterolytische Aktivität: Ökonomische Bedeutung haben nur die neutralen Metalloproteasen gefunden, die von vielen Mikroorganismen gebildet werden. Wie ihr Name andeutet, liegt ihr pH-Optimum bei pH 7. Sie spalten die Peptidkette bevorzugt bei aromatischen Aminosäuren. Sie werden u. a. in Brauereien zum Malzaufschluß verwendet [86,87].

In die Untergruppe Proteasen mit unbekanntem katalytischen Mechanismus werden Enzyme nur bis zur Klärung ihres Hydrolyseprozesses eingeordnet.

1-2 Einsatz von Proteasen in Waschmitteln

Eine Übersichtstabelle zeigt die überragende Bedeutung mikrobieller Proteasen im Vergleich zu anderen Enzymen {Tab. 2}:

Industrielle Enzyme 1976	Produktion [t]	Marktanteil [%]
Bakterielle alkalische Protease	500	30
Mikrobielle Labfermente	20	6
Andere mikrobielle Proteasen		3
Tierische Labfermente		9
Andere tierische Proteasen		2
Pflanzliche Proteasen		9
Bakterielle α -Amylasen	300	10
Pilzliche α -Amylase	10	2
Glucoamylase	300	11
Glucoseisomerase	50	10
Pectinase	10	8

Tab. 2: Weltproduktion der wichtigsten industriellen Enzyme [2]

Die mengenmäßig wichtigste Anwendung von Enzymen ist der Einsatz von Proteasen in Waschmitteln. Ihr Zusatz verbessert die Reinigungskraft durch hydrolytischen Abbau problematischer, eiweißhaltiger Verschmutzungen wie Blut, Ei, Kakao u. ä.. Zudem verstärkt sich die Schmutzablösung von Fasern, da in Abwesenheit von Proteinen Dreck schlechter haften bleibt [47].

Erstmals setzte 1913 Rohm von der Firma Rohm und Haas Protease aus Pankreas im Waschmittel »Burnus« ein [86]. Seitdem werden preiswerte Enzyme für den Waschprozeß gesucht, die während der Lagerung gegenüber Tensiden, Bleichmitteln und Komplexbildnern stabil sind und unter den pH- und Temperaturbedingungen des Waschprozesses eine gleichbleibend hohe Aktivität und niedrige Spezifität gegenüber Peptidbindungen aufweisen [47,86].

In dieser Hinsicht brachte die Entdeckung der bakteriellen alkalischen Serinproteasen Subtilisin Carlsberg [30] und Subtilisin BPN' [31] bzw. Novo [62] einen großen Fortschritt. Das Carlsberg-Enzym besitzt die größere wirtschaftliche Bedeutung, da es aktiver ist und reiner anfällt [86]. Es wird seit 1960 Waschpulvern in einer Konzentration von 0,015 - 0,1 % zugefügt [47,83]. Die Subtilisine sind im pH-Bereich 8 - 11 und bei Temperaturen bis 70°C einsetzbar. Da ihre Stabilität nicht von Metallionen abhängt, stören komplexierende Zusätze wie Polyphosphate oder EDTA in Waschmitteln kaum. Die enzymatische Aktivität nimmt in Gegenwart von Perborat nur langsam ab. Das während des Waschvorganges aus diesem Bleichmittel freigesetzte H_2O_2 desaktiviert das Enzym jedoch rasch. Weiterhin wirken auch anionische Tenside denaturierend. Dem Staubproblem und der damit verbundenen Allergiegefahr wird seit Anfang der siebziger Jahre durch Einbetten (Prills) oder Überziehen (Marumerizer) des Proteasepulvers mit Fettalkoholethylenoxidaddukten oder bei 50 - 70°C schmelzenden Polyethylenglykolen u. ä. und anschließender Formgebung begegnet. Diese Konfektionierungsart verbessert darüber hinaus die Lagerstabilität des Subtilisins [47]. Seit einigen Jahren werden auch Serinproteasen von alkalophilen *Bacillus species* verwendet, die bis pH 12 beständig sind [47].

1-3 Subtilisin und sein Katalysemechanismus

Sequenzanalysen haben gezeigt, daß nur zwei Subtilisinarten gebildet werden [78]. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus stearothermophilus* erzeugen Subtilisin BPN', während *Bacillus licheniformis* und *Bacillus pumilus* Subtilisin Carlsberg herstellen [86]. Beide Enzyme sind zu 69 % homolog und unterscheiden sich nur in 84 Positionen. Zusätzlich besteht beim Carlsberg-Enzym eine Deletion an Stelle 56 {in Abb. 2 mit | markiert} [78]. Subtilisin BPN' besteht aus 275 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 27532 g/mol, während Subtilisin Carlsberg mit 274 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 27287 g/mol besitzt [63].

Die dreidimensionale Struktur ist durch Röntgenbeugung bekannt. Die Peptidkette ist in 3 Teile gefaltet, an deren Verbindungsstelle das aktive Zentrum liegt. Es ist bis auf Position 31 (Isoleucin/Leucin) in beiden Enzymen identisch. Die Sequenzunterschiede betreffen ansonsten nur äußere Segmente. Entscheidend für den katalytischen Prozeß sind die Aminosäuren Serin 221/220, Histidin 64/63 und Asparaginsäure 32 {Abb. 2, fett und unterstrichen markiert} [75]. Während das Serin die Bindung zum Protein knüpft, wirkt das Histidin unter Stabilisierung durch die Asparaginsäure als reversibles »Protonenrelais« [22,42] {Abb. 1}:

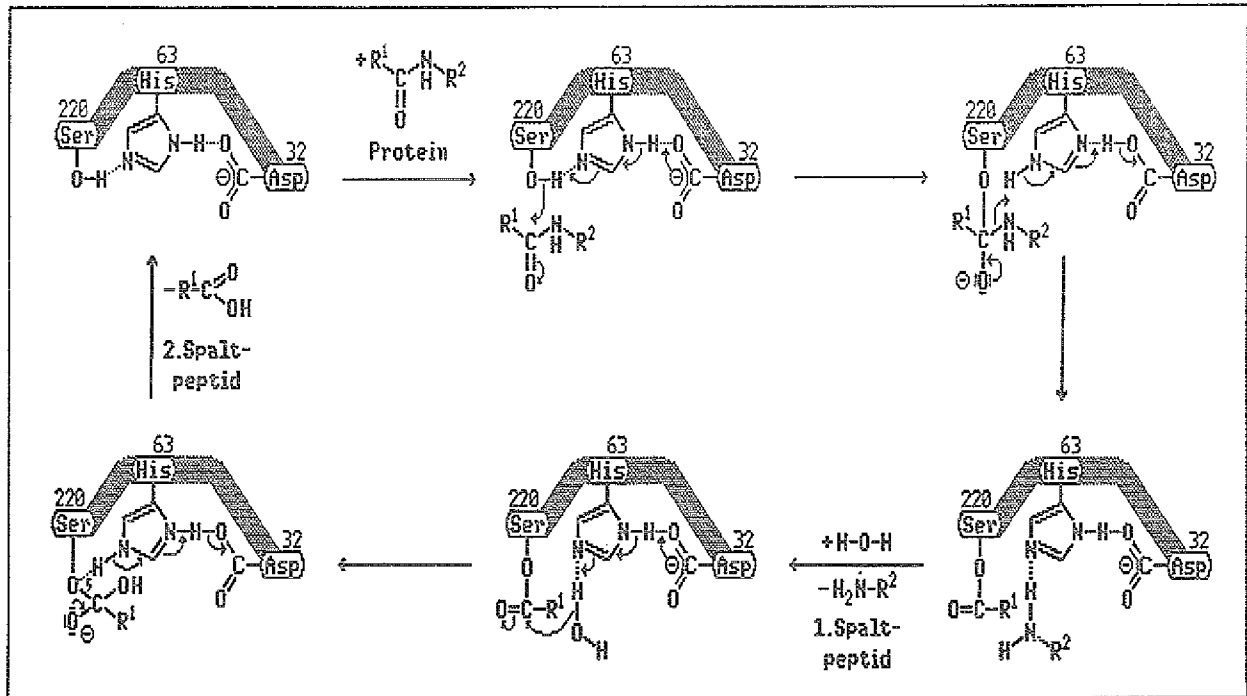


Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Proteinhydrolyse durch Subtilisin Carlsberg [nach 42].

1-4 DNA- und Aminosäuresequenz von Subtilisin Carlsberg

Gegenüber der zuerst nach einer Proteinanalyse referierten Aminosäuresequenz von Subtilisin Carlsberg [78] sind im Gen von *Bacillus licheniformis* DSM 641 die Positionen 157 und 160 anders kodiert {Abb. 2}. Diese Stellen betreffen Serin- und Asparaginreste, die nur schwer zu unterscheiden waren [78]. Diese Differenzen können aus Punktmutationen folgen, in denen sich die einzelnen Stämme unterscheiden, die jedoch die Aminosäuresequenz meist nicht ändern. So zeigen die Gene des maturierten (reifen) Enzyms von *Bacillus licheniformis* DSM 641 [4] und NCIB 6816 [40] bei 25 Nucleotiden eine Abweichung {kursiv markiert}, die nur an den Positionen 102, 128 und 211, nicht aber an den strittigen Stellen 157 und 160 zum Einbau einer anderen Aminosäure führen. Daher ist anzunehmen, daß das folgende Schema die Sequenz korrekt wiedergibt:

-35 -10 -1 1 30
 5' ... TTA ACA GAA TAA TTG GAA TAG ATT ATA TTA TCC TTC TAT TTA AAT TAT TCT GAA TCT GAA TAA AGA GGA GGA GAG TGA
 Erkennungsstelle Pribnow-Box »Nichtkodierungssequenz« Ribosomenbindungsstelle
 »Signalpeptid« 60 90 120
 GTA ATG ATG AGG AAA AAG AGT TTT TGG CTT GGG ATG CTG ACG GCC TTC ATG CTC GTG TTC ACG ATG GCA TTC AGC GAT TCC GCT
 fMet Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Leu Gly Met Leu Thr Ala Phe Met Leu Val Phe Thr Met Ala Phe Ser Asp Ser Ala
 -105 -100 -90 -80
 »Proregion« 150 180 210
 TCT GCT GCT CAA CCG GCG AAA AAT GTT GAA AAG GAT TAT ATT GTC GGA TTT AAG TCA GGA GTG AAA ACC GCA TCT GTC AAA AAG
 Ser Ala Ala Gln Pro Ala Lys Asn Val Glu Lys Asp Tyr Ile Val Gly Phe Lys Ser Gly Val Lys Thr Ala Ser Val Lys Lys
 -76 -70 -60
 240 270
 GAC ATC ATC AAA GAG ACG GCG GGA AAA GTC GAC AAG CAG TTT AGA ATC ATC AAC GCG GCA AAA GCG AAG CTA GAC AAA GAA GCG
 Asp Ile Ile Lys Glu Ser Gly Gly Lys Val Asp Lys Gln Phe Arg Ile Ile Asn Ala Ala Lys Ala Lys Leu Asp Lys Glu Ala
 -50 -40 -30
 300 330 360 »Subtilisin Carlsberg«
 CTT AAG GAA GTC AAA AAT GAT CCG GAT GTC GCT TAT GTG GAA GAG GAT CAT GTG GCC CAT GCC TTG GCG CAA ACC GTT CCT TAC
 Leu Lys Glu Val Lys Asn Asp Pro Asp Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp His Val Ala His Ala Leu Ala Gln Thr Val Pro Tyr
 -20 -10 -1 +1
 390 420 450
 GGC ATT CCT CTC ATT AAA GCG GAC AAA CTG CAG GCT CAA GCG TTT AAG GGA GCG AAT GTA AAA GTA GCC GTC CTG GAT ACA GGA
 Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly
 10 20 30 32
 480 510 540
 ATC CAA GCT TCT CAT CCG GAC TTG AAC GTA GTC GCG GGA GCA AGC TTT GTG GCT GCG GAA GCT TAT AAC ACC GAC GGC AAC GGA
 Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly
 40 50 60
 570 600 630
 CAC GGC ACA CAT GTT GCC GGT ACA GTA GCT GCG CTT GAC AAT ACA ACG GGT GTA TTA GCG GTT CCG CCA AGC GTA TCC TTG TAC
His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr
 63 70 80 90
 660 690
 GCG GTT AAA GTA CTG AAT TCA AGC GGA AGC GGA TCA TAC AGC GCG ATT GTA AGC GGA ATC GAG TCG GCG ACA ACA AAC GCG ATG
 Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met
 100 110
 720 750 780
 GAT GTT ATC AAT ATG AGC CTT GGG GGA GCA TCA GCG TCG ACA GCG ATG AAA CAG GCA GTC GAC AAT GCA TAT GCA AGA GGG GTT
 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val
 120 130 140
 810 840 870
 GTC GTT GTA GCT GCA GCA GCG AAC AGC GGA TCT TCA GGA AAC ACG AAT ACA ATT GCG TAT CCT GCG AAA TAC GAT TCT GTC ATC
 Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile
 150 (Asn) (Ser) 170
 900 930 960
 GCT GTT GGT GCG GTA GAC TCT AAC AGC AAC AGA GCT TCA TTT TCC AGC GTC GGA GCA GAG CTT GAA GTC ATG GCT CCT GGC GCA
 Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala
 180 190 200
 990 1020 1050
 GGC GTA TAC AGC ACT TAC CCA ACG AAC ACT TAT GCA ACA TTG AAC GGA ACG TCA ATG GCT TCT CCT CAT GTA GCG GGA GCA GCA
 Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala
 210 220 230
 1080 1110
 GCT TTG ATC TTG TCA AAA CAT CCG AAC CTT TCA GCT TCA CAA GTC GCG AAC CGT CTC TCC AGC ACG GCG ACT TAT TTG GGA AGC
 Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser
 240 250
 1140 1170 »nicht kodiert« 1200 Abbruchschleife
 TCC TTC TAC TAT GGG AAA GGT CTG ATC AAT GTC GAA GCT GCC GCT CAA TAA CAT ATT CTA ACA AAT GGC ATA TAG AAA AAG CTA
 Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
 260 270 274
 der 1230 Transkription
 GTG TTT TTA GCA CTA GCT TTT TCT ... 3'

Abb. 2: DNA- und Aminosäuresequenz von Subtilisin Carlsberg aus
Bacillus licheniformis [maturiernes Enzym aus Stamm DSM
 641 nach 4, andere Sequenzen aus Stamm NCIB 6816 nach 40].

1-5 Allgemeine Regulationsmechanismen der Biosynthese

Mikroorganismen verfügen über effektive Regulationsmechanismen, die es ihnen ermöglichen, ihre Stoffwechselleistungen schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Die Wirkung kann bei der Enzymaktivität und der Enzymsynthese einsetzen.

Die Regulierung der Enzymaktivität ist im allgemeinen ein schneller allosterischer Prozeß, bei dem ein positiver oder negativer Effektor an ein Enzym anlagert und damit dessen Aktivität verändert. Diesem Regulationsmechanismus unterliegen vorwiegend die Schlüsselenzyme innerhalb des Intermediärstoffwechsels, während er bei extrazellulären Enzymen keine Rolle spielt [74].

Die Regulation der Enzymsynthese ist dagegen eine langfristige Stoffwechselanpassung. Ganz im Sinne der Ökonomie setzt sie in der Regel beim ersten Teilschritt, der Transkription, ein. Hierbei wird eine Folge von Desoxyribonucleotiden unter der enzymatischen Wirkung von RNA-Polymerase in eine Folge von Ribonucleotiden umgeschrieben. Die Initiation der Transkription beginnt mit dem Kontakt der RNA-Polymerase mit dem Sinnstrang der DNA im Bereich der Erkennungsstelle, die etwa 35 Nucleotidpaare vor dem Start der RNA-Biosynthese liegt. Die -35-Region gleicht häufig der Standardsequenz 5'-TTCACA-3'. Die RNA-Polymerase bewegt sich zur Bindungsstelle, die etwa 10 Nucleotidpaare vor dem Start der RNA-Synthese liegt, und bindet hier. Die nach ihrem Entdecker Pribnow-Box genannte Nucleotidfolge ähnelt der Standardsequenz 5'-TATAAT-3'. Die gebundene RNA-Polymerase entwindet etwa 40 Nucleotidpaare der DNA-Doppelhelix und beginnt mit der Transkription der 5'-Nichtkodierungssequenz, der Kodierungsfolge, die die Information zur Herstellung des Proteins trägt, und der 3'-Nichtkodierungssequenz. Häufig nimmt dieser Bereich wegen einer palindromen (inversen) Symmetrie eine haarnadelförmige Sekundärstruktur ein {Abb. 2}, die die Genexpression beendet. Andere Gene benötigen zur Abspaltung der Polymerase die Aktivität eines Terminationsfaktors [43].

Erkennungs- und Bindungsstelle gehören zum Promoter {Tab. 3}. Je mehr die Nucleotidfolgen den beiden Standardsequenzen gleichen, um so stärker ist der Promoter [43]. Das Subtilisin-Gen von *Bacillus licheniformis* weicht nur jeweils an einer Position in der -35 und -10-Region ab {Abb. 2} und wird somit häufig transkribiert.

Die Kontrolle der Transkription kann schon bei der Anknüpfung der RNA-Polymerase erfolgen. Die Transkriptionshäufigkeit kann durch die Bindung eines Komplexes aus Induktor und catabolite activator Protein (CAP) an einen DNA-Abschnitt kurz vor der Erkennungsstelle erhöht werden. Bei *Escherichia coli* ist dieser Induktor cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), dessen Konzentration in Anwesenheit leicht verwertbarer C- und N-Quellen sinkt [43]. Daraufhin wird die Produktion aller Proteine reprimiert, die für ihre Expression die Aktivierung durch den cAMP-CAP-Komplex benötigen.

Da hiervon vorwiegend Enzyme betroffen sind, die den Abbau ungünstigerer Substanzen katalysieren, spricht man von einer Katabolit-Repression durch leichter verwertbarere Substrate. Die cAMP-Bildung ist ein unspezifisches Signal dafür, daß in der Zelle keine optimalen Bedingungen herrschen. So wird auch in Gegenwart einer leicht metabolisierbaren C-Quelle cAMP synthetisiert, wenn z. B. der Sauerstoffnachschub [54] oder der Gehalt an Stickstoffbausteinen [67] limitierend wirken. In diesem Fall findet eine Dereprimierung der Katabolit-Repression statt {Tab. 3}. Dem Gesamtmechanismus wird eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synthese extrazellulärer Enzyme zugeschrieben, auch wenn bei *Bacillus species* cAMP nicht nachgewiesen werden konnte [67]. Eigene Versuche mit cAMP zeigten ebenfalls keinerlei Wirkung auf die Proteasebildung [7]. Ein ähnlicher Einfluß wird aber von anderen Nucleosid-(poly-)phosphaten vermutet [69].

Die RNA-Elongation kann durch die Assoziation eines Regulatorproteins an den Operator, das ist eine DNA-Folge zwischen Promoter und Kodierungssequenz, blockiert werden [43]. Die Bindungsfähigkeit wird durch negative oder positive Effektoren gesteuert. Negative Effektoren (Corepressoren) sind meist niedermolekulare Endprodukte anabolischer Enzyme [29], die durch Bindung an das Regulatorprotein (Aporepressor) dessen Komplexbildung mit dem Operator erst ermöglichen. Man spricht daher auch von Endprodukt-Repression. Positive Effektoren (Induktoren) sind dagegen in der Regel Substrate katabolischer Enzyme, die durch ihre Anheftung an das Regulatorprotein (Repressor) dessen Komplex mit dem Operator lösen [74] {Tab. 3}. Bei extrazellulären Enzymen, deren polymere Substrate nicht in die Zelle gelangen können, können auch niedermolekulare Abbauprodukte als Induktoren wirken [89].

Gen:	CAP-Region	Promoter	Operator	Kodierung
Funktion	Stärkung des Promoters	Anheftung der Polymerase	Regulation der Elongation	Bildung von RNA
primäre Regulation	cAMP		Regulatorprotein	
sekundäre Regulation	günstige C-Quelle, N-Mangel		Repressor, Induktor	
Effekt	Katabolit-Repression, Derepression		Endprodukt-Repression, Induktion	

Tab. 3: Elemente eines Gens

Bei *Escherichia coli* befinden sich an den Kontrollelementen der DNA-Doppelhelix lange Sequenzen mit inverser Symmetrie, die vermutlich für die Anheftung der Regulatorproteine von Bedeutung sind. Das Subtilisin-Gen von *Bacillus licheniformis* {Abb. 2} weist keine derartigen Folgen in der Nähe des Promoters auf. Aus der Abwesenheit palindromer Strukturen kann aber nicht auf ein Fehlen der oben beschriebenen Regulationsmechanismen bei der Proteasesynthese geschlossen werden.

Eine Kontrolle der Transkription kann aber auch durch vorzeitigen Abbruch der Genexpression bewirkt werden {Abb. 3}. Die Attenuation ist das wichtigste Regulationselement für Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels. Die Regulation folgt aus einem Zusammenspiel von Transkription und Translation. An die entstehende RNA heften sich Ribosomen und beginnen mit der Peptidsynthese. Vor dem Gen für das anabolische Enzym der jeweiligen Aminosäure liegt eine Leitsequenz, die relativ häufig für die betreffende Aminosäure kodiert. Herrscht an dieser Aminosäure Mangel, so kann das Ribosom der RNA-Polymerase nicht mehr direkt folgen. Das hat Auswirkungen auf die Schleifenbildung der RNA. Die Sekundärstruktur der RNA enthält keine Haarnadelstruktur mehr, die von der RNA-Polymerase als Terminationssignal erkannt wird und zum vorzeitigen Abbruch der Translation führt [43]. Allerdings trägt die DNA von Subtilisin Carlsberg keinen Genabschnitt für ein separates Leitpeptid.

Die Stabilität der messenger RNA (mRNA), die die Information für die Proteine trägt, ist bei Prokaryonten mit einer mittleren Halbwertszeit von 2 min gering [50]. Dies ist eine Voraussetzung für die Regulation der Biosynthese auf Transkriptionsebene.

Daneben kodiert die DNA auch für transfer RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA), die eine Lebensdauer von mehreren Zellgenerationen besitzen können [43].

Die verschiedenen tRNAs dienen als spezifische Aminosäurecarrier bei der Proteinbiosynthese. Sie werden unter ATP-Verbrauch von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit ihren individuellen Aminosäuren beladen.

Die Translation der mRNA findet an den rRNA enthaltenden Ribosomen statt. Sie beginnt unter GTP-Verbrauch mit der Anlagerung der mRNA beim Startcodon AUG an die durch Initiationsfaktoren aktivierte 30 S-Untereinheit der Ribosomen {siehe Abb. 4}. Die Orientierung wird durch Basenpaarung einer nichttranslatierten leader-Sequenz an die ribosomale RNA gewährleistet [42]. Die zuerst angelagerte tRNA ist stets Methionyl-tRNA. Bei Eubakterien ist das Methionin an der Aminogruppe formyliert {siehe Abb. 2}. Die Initiation endet mit der Abspaltung der Initiationsfaktoren und der Anlagerung der 50 S-Untereinheit der Ribosomen. Bei der Kettenverlängerung wird die mRNA unter Mitwirkung von Elongationsfaktoren am Ribosom entlang bewegt. An jedes Codon wird die entsprechende Aminoacyl-tRNA

angelagert. Die Knüpfung der Peptidbindung erfordert keine Energie, da die Aminosäure bereits in aktivierter Form vorliegt. Zur Translokation der mRNA am Ribosom und zur Anlagerung der Aminoacyl-tRNA wird jedoch jeweils ein GTP benötigt. Der Kettenabbruch erfolgt beim Erreichen eines der Stopcodons UAG, UAA oder UGA unter Beteiligung eines Terminationsfaktors [42].

Eine Kontrolle der Proteinsynthese auf Translationsniveau konnte nur in seltenen Fällen beobachtet werden, wenn z. B. nur die ersten Gene polycistronischer mRNA translatiert wurden [50].

Während die mRNA spezifisch für ein Protein kodiert, stehen rRNA und tRNA allen ribosomalen Synthesen zur Verfügung. Deren Autoregulation beeinflusst den gesamten Syntheseapparat der Zelle. Der Mechanismus ist als stringent control bekannt [80]. Beim Übergang vom ungehemmten exponentiellen Wachstum in der Trophophase in die stationäre Idiophase tritt Mangel an Aminosäuren auf, der zu unbeladenen tRNA-Molekülen führt. Diese stimulieren die Umsetzung von ATP und GTP zu Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat (pppGpp). Durch unmittelbare Abspaltung eines Phosphatrestes entsteht das labile Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat (ppGpp), das als second messenger die Synthese von tRNA, rRNA, ribosomalen Proteinen, Elongationsfaktoren und der RNA-Polymerase hemmt [43,69].

Darüberhinaus bewirken Guanosintetraphosphat und andere ungewöhnliche Nucleotide als positive oder negative Effektoren der Transkription eine Umstellung des Gesamtstoffwechsels {Abb. 3}. Aminosäureverbrauchende Vorgänge wie z. B. das Wachstum werden reduziert. Hingegen werden aminosäureliefernde Prozesse wie z. B. Proteasebildung und Aminosäurebiosynthese stimuliert [69].

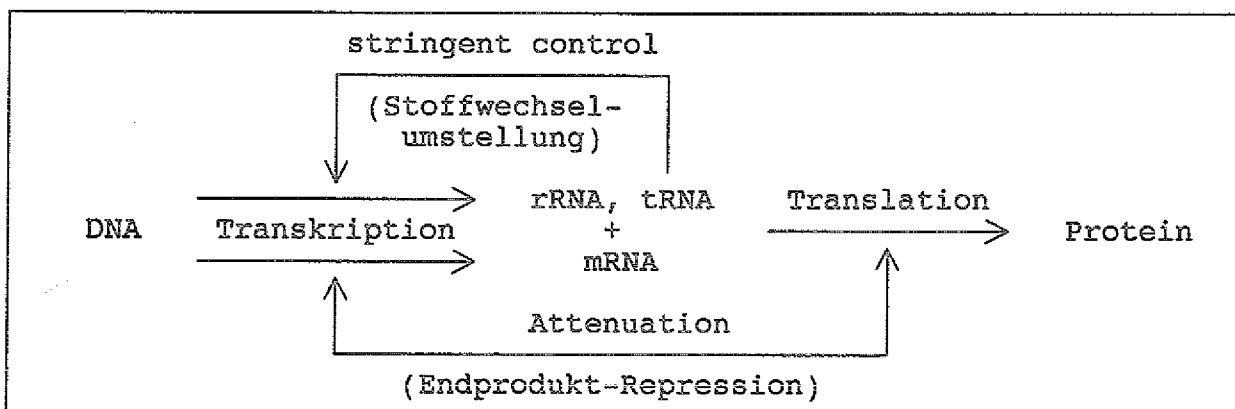


Abb. 3: Einfluß von Attenuation und stringent control auf die Biosynthese

Bei allen bisher referierten Regulationsmechanismen beeinflussen nur zellinterne Konzentrationsverhältnisse die Biosynthese. In der Cytoplasmamembran wurden jedoch Signalproteine entdeckt, die unter extrazellulärer Stimulation mit einer intrazellulären Kinaseaktivität ein Regulatorprotein in seiner Wirkung modulieren [28].

1-6 Regulation der Proteaseproduktion

Die Mechanismen der Proteasebildung in *Bacillus species* sind bislang noch weitgehend unbekannt. Die Biosynthese extrazellulärer Proteasen startet erst mit dem Übergang von der Periode exponentiellen Wachstums, der Trophophase, in die nährstofflimitierte Idiophase [17,68]. Die Enzymbildung setzt sowohl bei C- als auch N-Mangel ein [24,25,93]. Dies ist verständlich, da Proteasen Aminosäuren freisetzen, die als C- und N-Quelle genutzt werden können. In allen Fällen bewirkt eine N-Limitierung eine stärkere Proteaseausschüttung als C-Mangel [35]. Die Proteaseproduktion hängt in starkem Maße auch von den Medienkomponenten ab. Energiereiche C- und N-Substrate erlauben ein schnelles Wachstum, reprimieren aber die Exoenzymbildung stark [25]. Erst wenn die günstigen Substrate knapp werden und sich das Wachstum verlangsamt, kommt die Proteasebiosynthese in Gang. Vielfach wird sogar angenommen, daß die Wachstumsbegrenzung der Schlüssel für die Regulation ist [35].

Wie bei nahezu allen extrazellulären Enzymen läßt sich dies als unspezifische Dereprimierung der Katabolit-Repression deuten. Näheres über ein catabolite activator Protein und seinen Induktor ist bei *Bacillus species* aber nicht bekannt [16,68].

Die Ursache kann aber auch in der Aufhebung einer Endprodukt-Repression liegen [74]. Dieser Regulation unterliegen sonst nur anabolische Enzyme. Die Vielfalt stickstoffhaltiger Substrate, die eine Protease-Repression verursachen, war lange Zeit mit der großen Spezifität von Operator-Regulatorproteinen kaum vereinbar. Kürzlich wurde jedoch ein ca. 40000 g/mol großes membrangebundenes Protein entdeckt, das bei Anwesenheit gut metabolisierbarer Stickstoffquellen reversibel methyliert wurde. Dieser Sensor hat als Regulatorprotein vermutlich weitreichenden Einfluß auf die Anpassung des Gesamtstoffwechsels [6]. Eine unspezifische Endprodukt-Repression könnte ebenfalls in einem der Attenuation ähnlichen Mechanismus liegen, wenn bei schneller Folge von Transkription und Translation die mRNA-Bildung vorzeitig abgebrochen wird [68].

Auch wird eine Kopplung beider Mechanismen diskutiert. Danach wird die Proteaseproduktion initiiert, wenn wichtige Nährstoffe im Medium verbraucht sind (Derepression der Katabolit-Repression), die Synthese jedoch reprimiert, wenn durch die Wirkung der Protease die Aminosäurekonzentration ansteigt (Endprodukt-Repression) [15,19,35].

Die Kontrolle der Proteasebildung kann aber auch im Zusammenhang mit einer stringent response gesehen werden. Die Akkumulation von Guanosintetraphosphat bei Aminosäuremangel führt zu einer Umstellung des Gesamtstoffwechsels. Dieser Vorgang wirkt oftmals als Schalter bei der Anpassung der Zelle an neue Lebensphasen [69].

Untersuchungen bei einem ähnlichen Mikroorganismus zeigten, daß *Bacillus licheniformis* S1684 diesbezüglich einen Defekt aufweist und »relaxed« reagiert [13,24]. Bei Aminosäuremangel kann sich der Stamm nicht anpassen. Es kommt zu Fehlern bei der Biosynthese, die zum Absterben und zur Zelllysis führen. Das verwendete Bakterium *Bacillus licheniformis* DSM 641 scheint dagegen nach eigenen Ergebnissen »stringent« vorzuliegen und normal zu reagieren [7].

Die Biosynthese von Subtilisin tritt immer zeitgleich mit der Sporulation der Zellen auf. Eine obligate Kopplung von Enzym- und Sporenbildung liegt jedoch nicht vor, da das Entstehen von Sporen nicht von einer Exoenzymexpression begleitet sein muß [7,14]. Die Bildung von Endosporen ist ein weitreichender Differenzierungsprozeß, an dem über 50 Gene beteiligt sind. Besonders einflußreich ist der Repressor AbrB, ein aus 96 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 10773 g/mol. Das AbrB-Protein unterdrückt sowohl die Sporulation von exponentiell wachsenden Zellen als auch die Proteasebildung. Mit dem Eintritt in die Idio-phase wird dann das Spo0A-Genprodukt durch eine Kinase aktiviert. Das Spo0A-Produkt reprimiert wiederum das abrB-Gen. Daraufhin wird die Sporulation eingeleitet und die Subtilisinproduktion kann aufgenommen werden [65,81].

1-7 Export und Reifung von Subtilisin Carlsberg

Die Biosynthese extrazellulärer Enzyme und deren Transport vom Cytosol in das Zelläußere (Prokaryonten) bzw. in Sekretionsvesikel (Eukaryonten) sind vermutlich miteinander gekoppelt [9,10]:

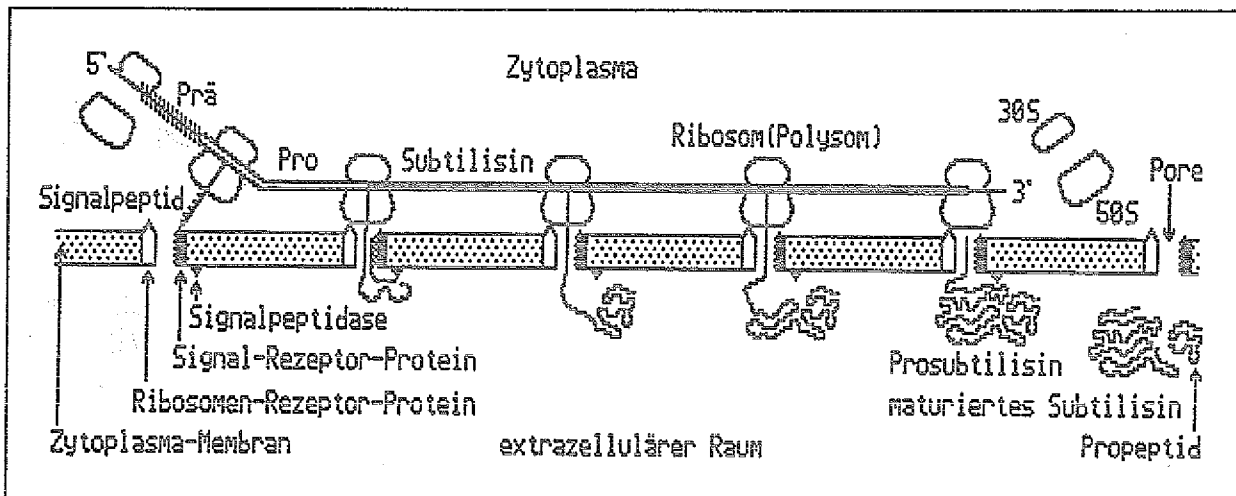


Abb. 4: Hypothetischer Transport von Subtilisin Carlsberg vom Cytosol in den extrazellulären Raum [nach 43,68]

Der Gesamtprozeß beginnt mit der Anlagerung eines Ribosoms an die mRNA und der darauf folgenden Translation der Präsequenz. Es bildet sich ein Signalpeptid, das an einer Pore der Cytoplasmamembran mit einem Signal-Recognition-Protein assoziiert. Die Proteinbiosynthese wird unterbrochen, bis sich das Ribosom an einem Ribosomen-Rezeptor-Protein bindet. An dieser Stelle bleibt es dann beim Fortschreiten der Translation und der Anknüpfung weiterer Ribosomen als Polysom haften {Abb. 4} [43].

Signalpeptide von Gram-positiven Organismen weisen meist 26 - 31 Aminosäuren auf, die N-terminal 3 - 5 positive Ladungen tragen, ansonsten aber ungeladen sind [90]. Eine typische Folge trägt auch das 29 Aminosäuren lange Signalpeptid des Carlsberg-Gens mit einem Arginin- und zwei Lysin-Resten am N-Terminus {Abb. 2}. Nachdem es seine Funktion, die Einleitung der vektoriellen Proteinsynthese, erfüllt hat, wird es meist durch eine membranständige Peptidase von der wachsenden Polypeptidkette abgespalten. Diese Signalpeptidase erkennt spezifisch die Folge Ala-X-Ala-Ala [92] und trennt zwischen den beiden Alanin-Resten [40].

Mit dem Erreichen des Stoptripletts UAA endet die Translation, und das Ribosom trennt sich von der mRNA {Abb. 4}. Das freigesetzte Proenzym ist in der Regel nur in Eukaryonten nachzuweisen, da es dort erst nach Verlassen der Sekretionsvesikel durch proteolytische Abspaltung der Prosequenz aktiviert wird. In Prokaryonten dagegen erfolgt nahezu augenblicklich die autokatalytische oder proteolytische Abtrennung des Propeptids zum reifen Enzym [90]. Prosequenzen verschiedener Enzyme unterscheiden sich deutlich in Länge und Primärstruktur. Ihnen ist aber ein hoher Anteil an geladenen Aminosäuren gemein. Im Propeptid von Subtilisin Carlsberg tragen bei einem neutralen pH-Wert 30 von 76 Aminosäuren eine Ladung {Abb. 2}. Diese hydrophile Anordnung wirkt als Matrix für die Ausbildung der Sekundärstruktur des maturierten Enzyms. Wie essentiell die Prosequenz für die Faltung des reifen Enzyms ist, zeigten gentechnologische Ansätze. In Abwesenheit der Prosequenz im Subtilisin-Gen bildete sich unlösliches Subtilisin, das keinerlei proteolytische Aktivität aufwies [38].

2-0 Kinetik der Kultivierung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von Mikroorganismen spiegelt ein kompliziertes Zusammenspiel zwischen Mikrobiologie und Verfahrenstechnik wieder. Die Zellen nehmen die angebotenen Substrate auf und setzen sie in vielen Einzelschritten zu den unterschiedlichsten Produkten um. Die Stoffwechselwege werden dabei von Substraten, Intermediaten und Endprodukten reguliert, die oftmals allerdings unbekannt oder unbestimmt sind. Eine Rolle spielen auch die Umweltbedingungen wie z. B. Temperatur, pH-Wert, osmotischer Druck und Reaktorkonfiguration. Ein Modell kann diese Komplexität nur teilweise beschreiben, muß sich also auf die wesentlichsten Größen beschränken. Es kann sich daher nur unvollkommen an experimentelle Daten anpassen. Die Modellierung kann aber ein wertvolles Hilfsmittel für das Verständnis und die Auslegung des Fermentationsprozesses sein.

2-1 Formen der Kultivierung von Mikroorganismen

Bei der Kultivierung von Mikroorganismen wird die diskontinuierliche, die halbkontinuierliche und die kontinuierliche Verfahrensweise unterschieden:

Die diskontinuierliche Methode ist ein weitgehend geschlossenes System, in das oft nur Sauerstoff eingetragen wird. Beispiele sind Schüttel- und Batchkulturen. In letzteren kann auch durch Korrekturmittelzugabe der pH-Wert konstant gehalten und Schaumbildung unterdrückt werden. Vorteilhaft sind die niedrigen Investitionskosten durch meist geringen Regelaufwand. Ein Bioreaktor im Satzbetrieb kann flexibel für unterschiedliche Mikroorganismen und Produkte eingesetzt werden. Die Ausbeute wird durch Substrataufzehrung begrenzt. Die verhältnismäßig kurzen Kultivierungszeiten bergen nur geringe Gefahr von Infektionen und Mutationen. Nachteilig sind vor allem der erhöhte Personalaufwand und die nichtproduktiven Totzeiten zum Füllen, Sterilisieren, Entleeren und Reinigen des Fermenters [76].

Bei halbkontinuierlicher Kultivierung wird der Verbrauch an Substrat nachdosiert. Die damit verbundene Ausbeutesteigerung wird mit einem höheren Personal- und Investitionsaufwand für Messung und Substratzufuhr erkauft. Besonders vorteilhaft ist die Kultivierung im Fedbatch beim Vorliegen einer Substratüberschußinhibition. Im Idealfall wird eine extended culture angestrebt, in der die Substratkonzentrationen durch geregelte Zufütterung konstant gehalten werden [76].

Bei der kontinuierlichen Verfahrensweise handelt es sich um ein offenes System, in dem mit derselben Rate, mit der dem Bioreaktor frische Nährlösung zugeführt wird, Fermentationsbrühe abgeerntet wird.

Den geringsten Regelaufwand erfordert der Chemostat, der bei konstanter Durchflußrate betrieben wird. Übersteigt die Verdünnungsrate das Zellwachstum, so wird die Kultur aus dem Fermenter ausgewaschen. Häufig liegt das Maximum der Produktivität in der Nähe des Auswaschpunktes. In diesem Fall wird vorzugsweise der Turbidostat eingesetzt, der durch Trübungsmessung bei konstanter Biomasse arbeitet und somit der Gefahr des Auswaschens begegnet [5].

Im Auxostaten richtet sich die Zufuhr an Substrat nach dessen Verbrauch und somit nach der Stoffwechselaktivität. Auxostatstrategien empfehlen sich, wenn für die Produktbildung ein definiertes Niveau des limitierenden Substrates günstig ist. Tritt bei der Umsetzung des Substrates ein pH-Shift ein, so ist das Medium im pH-Auxostaten als Korrekturmittel einsetzbar. Ansonsten erfordern die Auxostatmethoden einen erhöhten Meß- und Regelaufwand.

Durch kontinuierlichen Betrieb soll sich ein zeitlich stationärer Zustand einstellen, der konstant hohe Raumzeitausbeuten und Umsätze gewährleistet. Die langen Kultivierungszeiten bergen aber die Gefahr einer Infektion oder Mutation der Mikroorganismen in sich. Zudem sind bei geringer Flexibilität die Investitionskosten hoch, da die kontinuierliche Fermentation in einen Gesamtprozeß eingebettet werden muß, der Medienbereitung und Produktaufarbeitung beinhaltet [76].

2-2 Formale Behandlung verschiedener Kultivierungsarten

Zur mathematischen Behandlung werden für alle Komponenten Bilanzgleichungen aufgestellt, in der Akkumulation aus der Summe aus Konvektion und Reaktion folgt:

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} \quad (\text{allgemein})$$

Die Akkumulation gibt die zeitlichen Konzentrationsänderungen der einzelnen Komponenten wieder.

Die Konvektion stellt den Austausch der Komponenten mit der Umgebung dar.

Die Reaktion beschreibt die Umsetzung der Substrate zu Biomasse und anderen Produkten, aber auch Grundbedarf, Absterben und Lysis der Zellen, sowie Abbau der Produkte.

Für die verschiedenen Kultivierungsarten gelten unterschiedliche Rahmenbedingungen bei der Bilanzierung:

In der diskontinuierlichen Kultur findet kein Austausch mit der Umgebung statt. Die Konvektion wird somit definitionsgemäß null. Also ist die Akkumulation eine direkte Folge der Reaktion:

$$\text{Akkumulation} = \text{Reaktion} \quad (\text{diskontinuierlich})$$

Im halbkontinuierlichen System gleicht die Nachdosierung der einzelnen Substrate (Konvektion) im Idealfall den Verbrauch (Reaktion) aus. Der Akkumulationsterm der Substrate wird dann null. Für die Biomasse- und Produktbilanzen gelten weiterhin die Verhältnisse wie bei diskontinuierlicher Betriebsweise:

$$0 = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} \quad (\text{Substrate halbkontinuierlich})$$

$$\text{Akkumulation} = \text{Reaktion} \quad (\text{Produkte halbkontinuierlich})$$

In einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel findet ein Austausch zwischen Fermenterbrühe und frischem Medium statt. Dabei werden die einzelnen Komponenten mit der Durchflußrate D in ihren Ausgangskonzentrationen c_0 zugeführt und in der aktuellen Konzentration c abgeführt. Nach einiger Zeit stellen sich Steady-State-Bedingungen ein. Der Akkumulationsterm wird somit null:

$$0 = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} \quad (\text{kontinuierlich})$$

2-3 Wachstumsphasen

Das Wachstum in einer Batchkultur läßt sich in sieben aufeinanderfolgende Phasen gliedern {vergleiche Abb. 6}:

1. Adaptations- oder lag-Phase

Nach dem Überimpfen der Vorkultur in den Fermenter müssen die Organismen zunächst einmal ihren Stoffwechsel an die neuen Umweltbedingungen anpassen. Die Länge der Adaptations-Phase hängt vom Alter der Vorkultur, von der Impfmenge und der Änderung der Umgebung ab [18,76]. Während der lag-Phase bleibt die Zellzahl konstant, die Zellmasse nimmt aber durch die Bildung von Ribosomen und Proteinen zu [21].

2. Akzelerationsphase

Nachdem sich der Syntheseapparat angepaßt hat, fangen sich die ersten Zellen zu teilen an. Sobald alle Organismen diesen Zustand erreicht haben, beginnt das exponentielle Wachstum [76].

3. Exponentielles Wachstum

Das Wachstum in der exponentiellen Phase ist ausschließlich durch zellinterne Parameter bestimmt. Externe Faktoren, wie z. B. Art und Konzentration der Substrate, haben keinen Einfluß auf die Form der Wachstumskurve. Sie bestimmen aber die spezifische Wachstumsrate μ [21].

4. Übergangsphase

Das unlimitierte Wachstum verlangsamt sich, sobald essentielle Nährstoffe, die zu weiterem Wachstum notwendig sind, nicht mehr in ausreichender Menge vorliegen oder sich Stoffwechselprodukte im Medium angereichert haben, die das Wachstum hemmen [76]. Nach Verbrauch der primären Substrate greift der Organismus auf Sekundärmetabolite zurück, auf denen nur ein langsames Wachstum möglich ist. Sobald der Grundbedarf zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen nicht mehr gedeckt werden kann, beginnt ein steigender Anteil der Zellen abzusterben.

5. Stationäre Phase

In der stationären Phase verbrauchen die Zellen ihre Reservestoffe. Zellwachstum und Absterben halten sich die Waage. Viele Mikroorganismen können unter diesen Hungerbedingungen durch Sporenbildung überleben [18].

6. Beginnende Sterbephase

Sobald die spezifische Geschwindigkeit des Absterbens σ die der Vermehrung μ übertrifft, nimmt die Biomasse allmählich ab [76].

7. Exponentielle Sterbephase

Mit dem Erliegen des Zellwachstums nimmt die Biomasse exponentiell ab [76].

2-4 Kinetik von Wachstum und Zelllysis

Für die Biomassebilanz im Batch gilt formal:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \sigma) \cdot X \quad (\text{Gl. 1})$$

mit X : Biomasse [g/l]
 t : Zeit [h]
 μ : Spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
 σ : Spezifische Sterberate [h^{-1}]

Unter Verwendung des Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S} = dX/dS$ folgt eine entsprechende Gleichung für den Substratverbrauch:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/S}} \cdot X \quad (\text{Gl. 2})$$

mit S : Substrat [g/l]
 $Y_{X/S}$: Ausbeutekoeffizient Biomasse aus Substrat [-]

Die spezifische Wachstums- und Sterberate sind Funktionen der Umweltbedingungen wie Temperatur, pH, Substrat- und Produktkonzen-

trationen. Hängt die Wachstumsrate nur von einem limitierenden Substrat ab, so folgt eine Sättigungskinetik nach Monod [55]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{k_S + S} \quad (\text{Gl. 3})$$

mit $\mu_{\max}$: Maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
 k_S : Halbmaximale Sättigungskonstante [g/l]

Häufig liegt aber eine unkompetitive Inhibierung durch überschüssiges Substrat vor [18,58,76]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{k_S + S \cdot (1 + S/k_i)} \quad (\text{Gl. 4})$$

mit k_i : Inhibitorkonstante [g/l]

Auch können Stoffwechselprodukte zu einer kompetitiven (Gl. 5) oder nichtkompetitiven (Gl. 6) Hemmung des Wachstums führen [18,58,76]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{k_S \cdot (1 + P/k_i) + S} \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{(k_S + S) \cdot (1 + P/k_i)} \quad (\text{Gl. 6})$$

mit P : Produkt [g/l]

Liegen im Medium mehrere Substrate vor, die unabhängig voneinander verbraucht werden, ist ein additiver Ansatz zu wählen [18]:

$$\mu = \mu_1 + \mu_2 + \dots + \mu_n \quad (\text{Gl. 7})$$

mit μ_i : Spezifische Rate für Wachstum auf Substrat S_i

Eine Katabolit-Repression bzw. Diauxie läßt sich als kompetitive Hemmung des Wachstums auf Substrat S_2 durch Substrat S_1 oder einen im direkten Zusammenhang mit S_1 stehenden Inhibitor I erklären:

$$\mu = \frac{\mu_{\max,1} \cdot S_1}{k_{S,1} + S_1} + \frac{\mu_{\max,2} \cdot S_2}{k_{S,2} \cdot (1 + S_1/k_i) + S_2} \quad (\text{Gl. 8})$$

Beim Vorliegen mehrerer Substrate, die für das Wachstum essentiell sind und somit gekoppelt verbraucht werden, wird eine multiplikative Verknüpfung bei einem einheitlichen $\mu_{\max}$ gewählt [18]:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S_1}{k_{S,1} + S_1} \cdot \frac{S_2}{k_{S,2} + S_2} \cdot \dots \cdot \frac{S_n}{k_{S,n} + S_n} \quad (\text{Gl. 9})$$

Wie schon in Gl. 4 - 6 beschrieben, können die einzelnen Substratterme einer unkompetitiven Substratüberschußhemmung bzw. einer kompetitiven Produktinhibierung unterliegen. Ebenfalls kann das Gesamtwachstum durch Inhibitoren nichtkompetitiv gehemmt werden.

Absterben und Lysis von Mikroorganismen sind im engen Zusammenhang mit dem Erhaltungsstoffwechsel der Zelle zu sehen. Der Organismus benötigt einen Teil seiner C-Quellen, um den allgemeinen Turnover von RNA, Proteinen und Zellwandpolymeren auszugleichen und physiologische Bedingungen im Zellinneren zu wahren. Der auch maintenance genannte Anteil ist in erster Näherung unabhängig vom Zellzustand [5]:

$$-\frac{dS_C}{dt} = m \cdot X \quad (\text{Gl. 10})$$

mit S_C : Substrat zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs [g/l]
 m : Maintenance [h^{-1}]

Erschöpft sich die C-Quelle, so kann ein steigender Anteil von Organismen seine Zellfunktionen nicht mehr aufrecht erhalten, stirbt ab und lysiert. Genügend C-Substrat dagegen reprimiert die spezifische Absterberate. Diese Überlegungen führen zu dem Ansatz:

$$\sigma = \frac{m}{1 + S_C/k_{i,X}} \quad (\text{Gl. 11})$$

mit $k_{i,X}$: Inhibitorkonstante des Biomasseabbaus [g/l]

2-5 Kinetik der Produktbildung

Unter Vernachlässigung einer Zerfalls- oder Abbaureaktion gilt für die Produktbilanz im Batch formal:

$$\frac{dP}{dt} = \pi \cdot X \quad (\text{Gl. 12})$$

mit π : Spezifische Produktbildung [h^{-1}]

Eine entsprechende Gleichung für den Substratverbrauch ergibt sich aus der Verwendung des Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S} = dP/dS$:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\pi \cdot X}{Y_{P/S}} \quad (\text{Gl. 13})$$

mit $Y_{P/S}$: Ausbeutekoeffizient Produkt aus Substrat [-]

Die Bildung von Produkten kann wachstumsgekoppelt wie auch wachstumsunabhängig erfolgen. Die Produktbildungsrate läßt sich durch

einen wachstumsgebundenen (a) und einen nur noch von der Zellmasse abhängigen Term (b) darstellen [53]:

$$\pi = a \cdot \mu + b \quad (\text{Gl. 14})$$

mit a : Wachstumsgekoppelter Produktbildungsfaktor [-]
b : Wachstumsunabhängige Produktbildung [h^{-1}]

Die spezifische Produktbildung ist ebenfalls eine Funktion der Umweltbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Substrat- und Produktkonzentrationen. Die Ursachen, die die spezifische Wachstumsrate beeinflussen, wirken sich immer auch auf den wachstumsgekoppelten Anteil aus. Die wachstumsgebundene Produktbildung kann jedoch zusätzlich durch eine Substanz, die das Wachstum nicht hemmt, nichtkompetitiv inhibiert werden:

$$a = \frac{a_{\max}}{1 + I/k_i} \quad (\text{Gl. 15})$$

mit $a_{\max}$: Maximales a [-]
I : Inhibitor [g/l]

Der wachstumsunabhängige Anteil unterliegt ebenfalls einer Sättigungskinetik, die durch Inhibitoren gehemmt sein kann (vergleiche Gl. 4 - 6). Die Michaelis-Menten-Konstanten der Produktbildung sind gegenüber den entsprechenden Monod-Konstanten der Wachstumskurve in der Regel deutlich kleiner:

$$b = b_{\max} \cdot \frac{S_1}{k_{m,1} + S_1} \cdot \frac{S_2}{k_{m,2} + S_2} \cdot \dots \cdot \frac{S_n}{k_{m,n} + S_n} \quad (\text{Gl. 16})$$

mit $b_{\max}$: Maximales b [h^{-1}]
 $k_{m,i}$: Michaelis-Menten-Konstante von Substrat S_i

Meist tritt nur wachstumsgebundene oder wachstumsunabhängige Produktbildung auf.

2-6 Subtilisinbildung im diskontinuierlichen Modell

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß *Bacillus licheniformis* bei nichtlimitierender Sauerstoffzufuhr auf einem synthetischen Medium mit Glycerin als C-Quelle und Ammoniumsulfat als N-Substrat wachsen und Protease synthetisieren kann. Die Produktbildung ist ein wachstumsunabhängiger Prozeß [7], der durch überschüssige Stickstoffquellen reprimiert wird.

Ein schlichtes Modell berücksichtigt diese Erfahrungen. Die einzelnen Stoffwechselwege, weitergehende Regulationsmechanismen und

m : Maintenance [$0,05 \text{ h}^{-1}$]
 $Y_{X/C}$: Ausbeutekoeffizient Biomasse aus Glycerin [$0,802$]
 $Y_{X/N}$: Ausbeutekoeffizient Biomasse aus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [$1,86$]
 $Y_{P/C}$: Ausbeutekoeffizient Subtilisin aus Glycerin [$0,749$]
 $Y_{P/N}$: Ausbeutekoeffizient Subtilisin aus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [$1,25$]

Folgende spezifische Raten werden angenommen:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S_C}{k_{S,C} + S_C} \cdot \frac{S_N}{k_{S,N} + S_N} \quad (\text{Gl. 22})$$

$$\sigma = \frac{m}{1 + S_C/k_{i,X}} \quad (\text{Gl. 23})$$

$$\pi_a = \frac{a_{\max} \cdot \mu}{1 + S_N/k_{i,P}} \quad (\text{Gl. 24})$$

$$\pi_b = \frac{b_{\max}}{1 + S_N/k_{i,P}} \cdot \frac{S_N}{k_{m,N} + S_N} \cdot \frac{S_C}{k_{m,C} + S_C} \quad (\text{Gl. 25})$$

mit $\mu_{\max}$: Maximale Wachstumsgeschwindigkeit [1 h^{-1}]
 $k_{S,C}$: Monod-Konstante für Glycerin [1 g/l]
 $k_{S,N}$: Monod-Konstante für $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [$0,4 \text{ g/l}$]
 $k_{i,X}$: Inhibitorkonstante des Biomasseabbaus [$0,01 \text{ g/l}$]
 $a_{\max}$: Wachstumsgekoppelter Produktbildungsfaktor [1]
 $b_{\max}$: Wachstumsunabhängige Produktbildung [$0,2 \text{ h}^{-1}$]
 $k_{i,P}$: Inhibitorkonstante der Subtilisinbildung [$0,4 \text{ g/l}$]
 $k_{m,C}$: Michaelis-Menten-Konstante für Glycerin [$0,01 \text{ g/l}$]
 $k_{m,N}$: Michaelis-Menten-Konstante für $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [$0,01 \text{ g/l}$]

Zur simultanen Modellierung von abgeleiteten und analogen Funktionen wurde das FORTRAN-Programm »SIMU« geschaffen, das das Runge-Kutta-Verfahren zur numerischen Integration nutzt [96]. Die Bilanzgleichungen zusammen mit den spezifischen Raten ergeben eine Simulation der diskontinuierlichen Kultur {Abb. 6}:

Mit der Erschöpfung der N-Quelle geht die Kultur in die stationäre Phase über, die mit dem Verbrauch des Glycerins zur Aufrechterhaltung des Erhaltungsstoffwechsels endet. Ein Teil der Zellen stirbt ab und lysiert. Die verbleibenden Organismen nehmen die freigesetzten Bausteine auf und decken mit dem Kohlenstoffanteil ihren maintenance-Bedarf. Der gebundene Stickstoff wird dabei wieder zu Ammonium abgebaut. Die beiden Subtilisine entstehen ein wenig später als die Biomasse, da anfänglich Ammonium deren Erzeugung reprimiert. Obwohl die maximale Bildungsrate $a_{\max}$ fünfmal höher liegt als $b_{\max}$, ergibt sich nur die doppelte Ausbeute, da die Erschöpfung von C- und N-Quelle die Produktionsrate des wachstumsgekoppelten Subtilisins früher reduziert als die des wachstumsunabhängigen. Mit dem Wachstumsende geht die Vermehrungsrate gegen

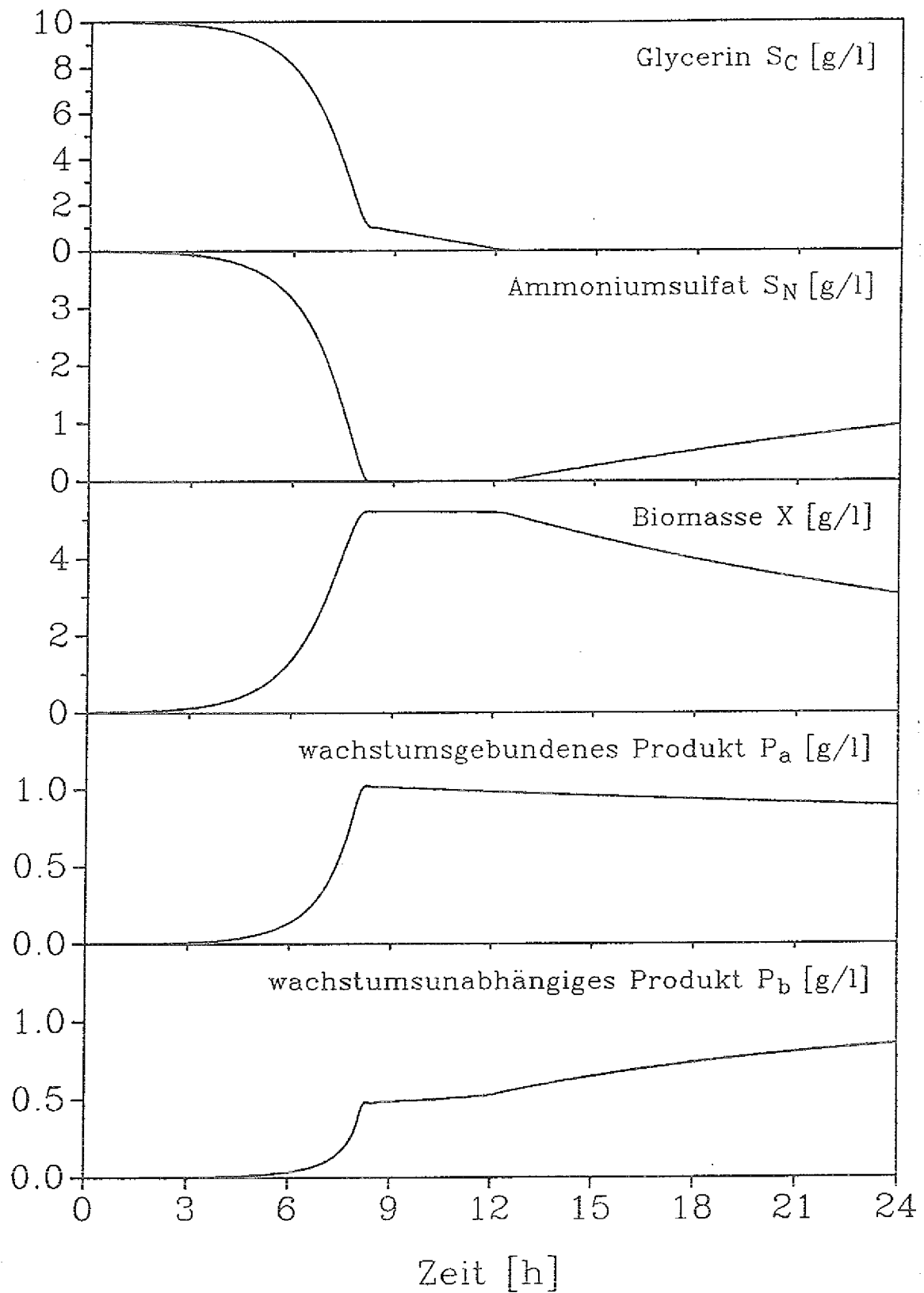


Abb. 6: Subtilisinbildung im diskontinuierlichen Modell

null, so daß auch die wachstumsgebundene Produktbildung zum Erliegen kommt. Der Gehalt an wachstumsunabhängigem Subtilisin steigt dagegen noch weiter an. Zunächst ist die Bildungsrate noch gering, da nur ein geringes Stickstoffangebot aus dem langsamen Abbau von Subtilisin und Biomasse zur Verfügung steht. Sie steigert sich jedoch nach der Erschöpfung des Glycerins, da durch die verstärkte Zelllysis mehr N-Substrate freigesetzt werden. Die Abnahme an Biomasse und der damit verbundene Anstieg des Ammoniumgehaltes führen jedoch zu einer Reduktion der Produktionsrate und schließlich auch zum Abbau des wachstumsunabhängigen Subtilisins.

Das Diagramm gibt das Wachstum einer Batchkultur mit seinen einzelnen Phasen gut wieder. Die Simulation startet allerdings sofort mit dem exponentiellen Wachstum, da lag- und Akzelerationsphase vom Zustand der Starterkultur abhängen und somit einer Modellierung schlecht zugänglich sind.

2-7 Subtilisinbildung im halbkontinuierlichen Modell

Der Fedbatch unterscheidet sich von der diskontinuierlichen Kultur nur in den Substratbilanzen (Gl. 17 + 18), da hier die Zufuhr an Nährstoffen Z berücksichtigt werden muß:

$$\frac{dS_C}{dt} = Z_C - \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/C}} \cdot X - \frac{\pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2}{Y_{P/C}} - \frac{\pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2}{Y_{P/C}} - m \cdot X \quad (\text{Gl. 26})$$

$$\frac{dS_N}{dt} = Z_N - \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/N}} \cdot X - \frac{\pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2}{Y_{P/N}} - \frac{\pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2}{Y_{P/N}} \quad (\text{Gl. 27})$$

mit Z_C : Zufuhr an Glycerin [g/(l·h)]
 Z_N : Zufuhr an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [g/(l·h)]

Im Idealfall der extended culture gleichen die Zuflußraten den Verbrauch der einzelnen Substrate aus:

$$Z_C = \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/C}} \cdot X + \frac{\pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2}{Y_{P/C}} + \frac{\pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2}{Y_{P/C}} + m \cdot X \quad (\text{Gl. 28})$$

$$Z_N = \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/N}} \cdot X + \frac{\pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2}{Y_{P/N}} + \frac{\pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2}{Y_{P/N}} \quad (\text{Gl. 29})$$

Das Modell berücksichtigt keinerlei Inhibierung von Wachstum und Produktbildung durch Stoffwechselprodukte. Daher stellen sich bei gleichbleibenden Substratkonzentrationen konstante Wachstums- und Produktbildungsraten ein, die zu einem exponentiellen Anstieg von Biomasse, Produkten und Zufuhr an Substraten führen. Der ideale Fedbatch endet spätestens, wenn das Maximum der Zufuhr an Glycerin oder Ammoniumsulfat erreicht ist.

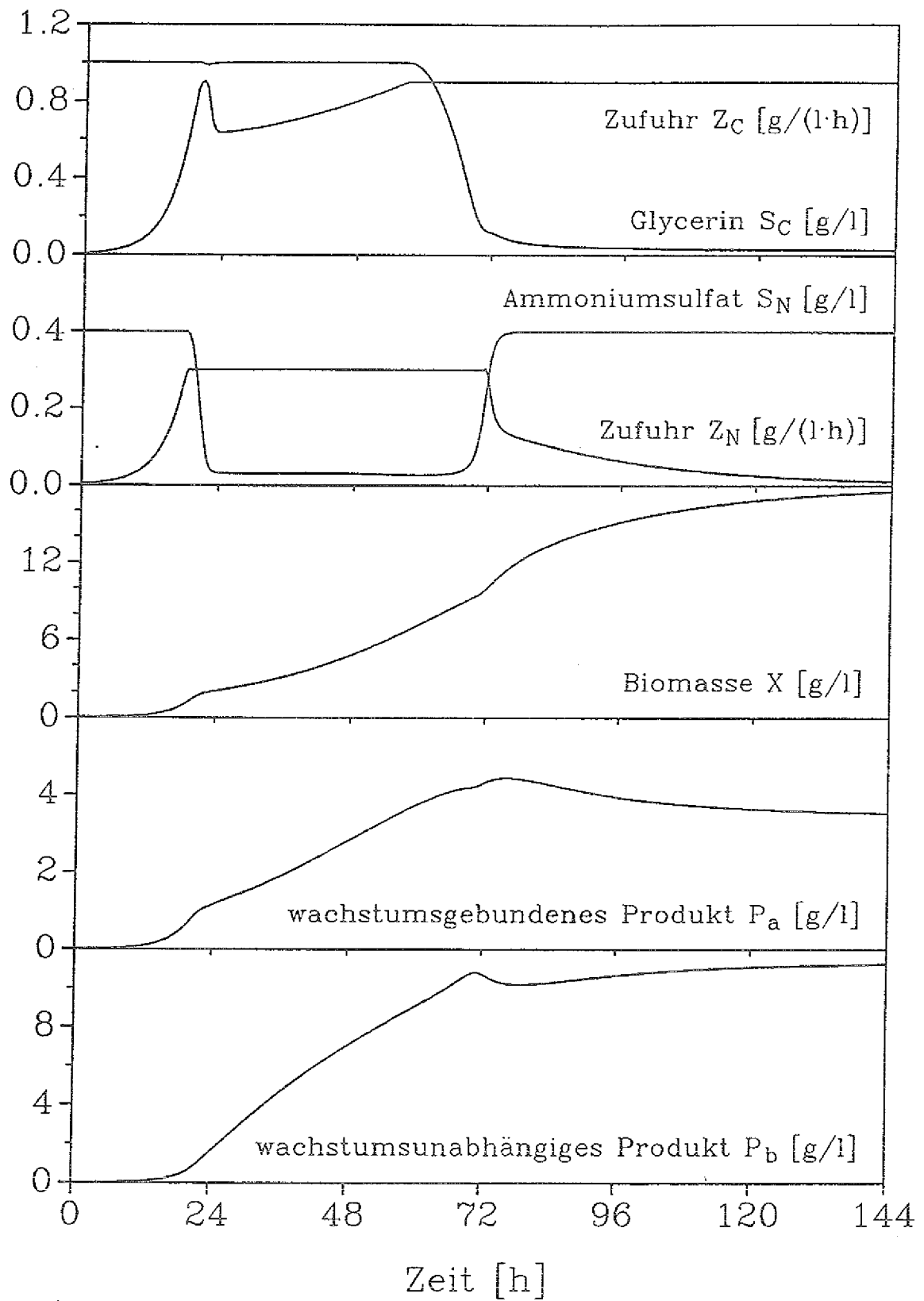


Abb. 7: Subtilisinbildung im halbkontinuierlichen Modell

In der Simulation {Abb. 7} tritt zunächst ein Engpaß bei der Nachdosierung von Ammoniumsulfat auf. Die exponentielle Bildung von Biomasse und Produkten geht in einen linearen Anstieg über, dessen Steigung von der maximalen Ammoniumzufuhr abhängt. Die leichten Abweichungen von der Linearität beruhen auf dem Zerfall des Subtilisins, der dem Wachstum zugute kommt. Die Biomassezunahme hat einen höheren Bedarf an Glycerin zur Folge. Erst wenn die Glycerinnachfuhr limitierend wird, nimmt die Sterberate zu, bis ein stationärer Zustand erreicht ist. Da die Ammoniumsulfatzudosierung nicht mehr der begrenzende Faktor ist, nimmt die N-Quelle ihr altes Niveau wieder an. Im Vergleich zum Batch {Abb. 6} wird das wachstumsunabhängige Produkt gegenüber dem wachstumsgebundenen im Fedbatch deutlich bevorzugt.

Bei der Behandlung der halbkontinuierlichen Kultur wurde die Volumenzunahme vernachlässigt, die in der Regel mit der Substratzufuhr verbunden ist. Soll sie im Modell berücksichtigt werden, so müssen bei der Modellierung dimensionslose Größen eingeführt werden. Grenzwertbetrachtungen zeigen, daß allein die Verdünnung der extended culture zu quasistationären Zuständen führt [76].

2-8 Subtilisinbildung im kontinuierlichen Modell

In den kontinuierlich betriebenen Rührkessel fließt mit einer Durchflußrate D Medium in den Ausgangskonzentrationen zu und spült die gleiche Menge Fermentationsbrühe mit den aktuellen Konzentrationen aus. Die Bilanzierung (Gl. 17 - 21) der diskontinuierlichen Kultur muß somit um einen Konvektionsterm erweitert werden:

$$\frac{dS_C}{dt} = (S_C^0 - S_C) \cdot D - \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/C}} \cdot X - \frac{\pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2}{Y_{P/C}} - \frac{\pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2}{Y_{P/C}} - m \cdot X \quad (\text{Gl. 30})$$

$$\frac{dS_N}{dt} = (S_N^0 - S_N) \cdot D - \frac{\mu - \sigma}{Y_{X/N}} \cdot X - \frac{\pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2}{Y_{P/N}} - \frac{\pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2}{Y_{P/N}} \quad (\text{Gl. 31})$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \sigma - D) \cdot X \quad (\text{Gl. 32})$$

$$\frac{dP_a}{dt} = \pi_a \cdot X - k_P \cdot P_a^2 - D \cdot P_a \quad (\text{Gl. 33})$$

$$\frac{dP_b}{dt} = \pi_b \cdot X - k_P \cdot P_b^2 - D \cdot P_b \quad (\text{Gl. 34})$$

mit S_C^0 : Konzentration an Glycerin im Medium [10 g/l]
 S_N^0 : Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Medium [4 g/l]
 D : Durchflußrate [$0,2 \text{ h}^{-1}$]

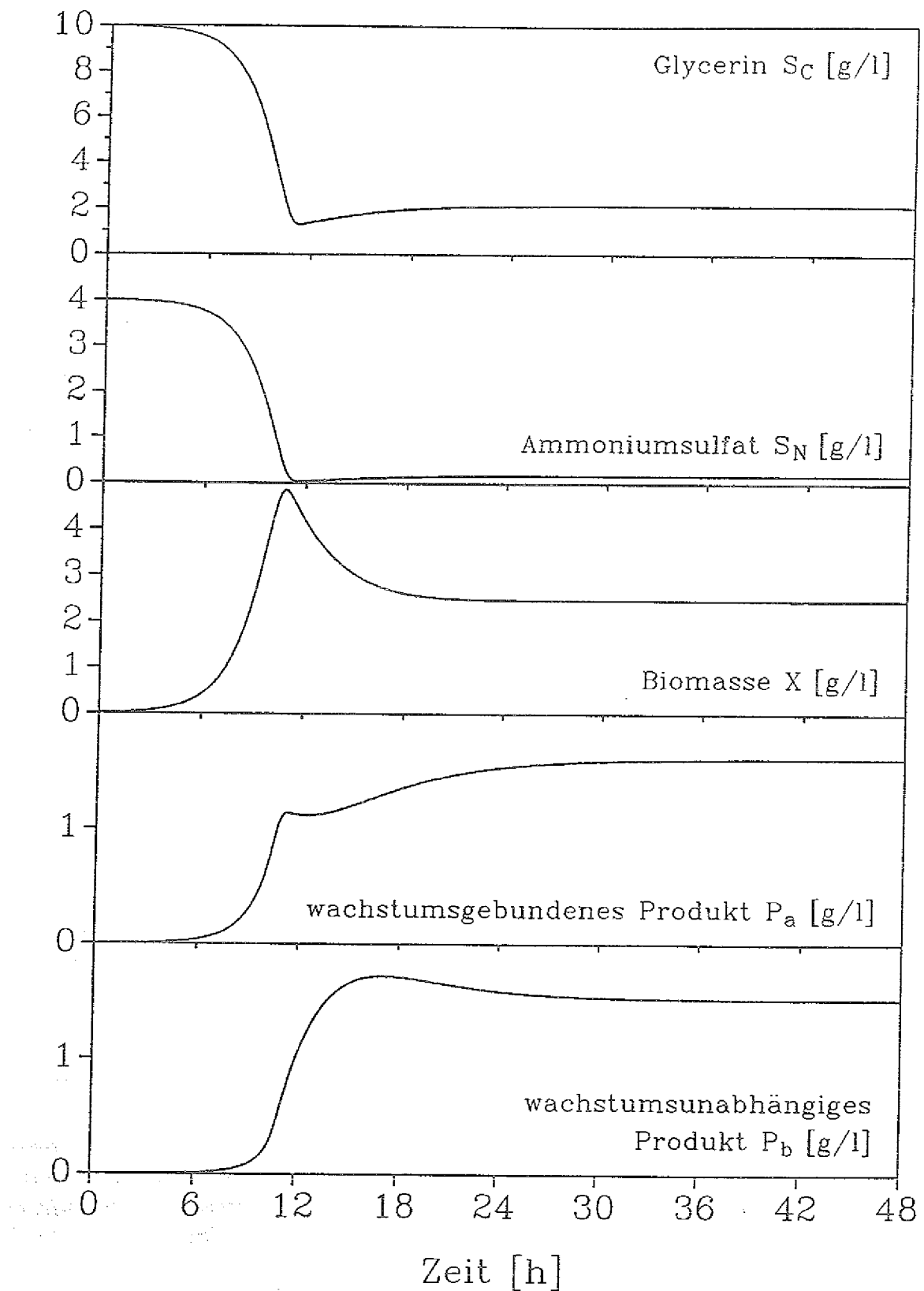


Abb. 8: Subtilisinbildung im kontinuierlichen Modell

Mit diesen Gleichungen läßt sich die Chemostatkultur modellieren. Insbesondere das Anfahrverhalten {Abb. 8}, aber auch Puls-, Sprung- und Gradienteneingaben sind simulierbar. Nach etwa 5 Verweilzeiten bildet sich ein stationärer Zustand aus. Eine Verweilzeit beschreibt als Quotient aus Reaktorvolumen zur Durchflußrate die mittlere Aufenthaltsdauer des Mediums im Fermenter.

Da im Fließgleichgewicht die Akkumulationsterme null werden, lassen sich aus Gl. 30 - 34 in Verbindung mit den spezifischen Raten (Gl. 22 - 25) zeitlich invariante Konzentrationen (kursiv markiert) in Abhängigkeit von der Durchflußrate bestimmen:

$$S_C = S_C^0 - \frac{P_A + P_B}{Y_{P/C}} - \frac{X}{Y_{X/C}} - \frac{m \cdot X}{D} \quad (\text{Gl. 35})$$

$$S_N = S_N^0 - \frac{P_A + P_B}{Y_{P/N}} - \frac{X}{Y_{X/N}} \quad (\text{Gl. 36})$$

$$\mu_{\max} \cdot \frac{S_C}{k_{S,C} + S_C} \cdot \frac{S_N}{k_{S,N} + S_N} = \frac{m}{1 + S_C/k_{i,X}} + D \quad (\text{Gl. 37})$$

$$P_A = \frac{a_{\max} \cdot \mu_{\max}}{1 + S_N/k_{i,P}} \cdot \frac{S_N}{k_{S,N} + S_N} \cdot \frac{S_C}{k_{S,C} + S_C} \cdot \frac{X}{k_P + D \cdot P_A} \quad (\text{Gl. 38})$$

$$P_B = \frac{b_{\max}}{1 + S_N/k_{i,P}} \cdot \frac{S_N}{k_{m,N} + S_N} \cdot \frac{S_C}{k_{m,C} + S_C} \cdot \frac{X}{k_P + D \cdot P_B} \quad (\text{Gl. 39})$$

Im Gegensatz zum Monod-Modell mit seinen einfachen Lösungen [56] ergibt die Berücksichtigung zweier essentieller Substrate und der Auf- und Abbau von Biomasse und Produkten komplexere Zusammenhänge. Ersetzt man in Gl. 37 die Substratkonzentrationen aus Gl. 35 und 36, so resultiert eine komplizierte Funktion, aus der die Biomasse X folgt. Die Substrat- und Produktkonzentration des Gleichgewichtszustandes sind somit analytisch lösbar. Einfacher ist es jedoch, die Steady-State-Konzentration zu simulieren. Die Gleichgewichtskonzentrationen werden üblicherweise in Abhängigkeit von der Durchflußrate D aufgetragen {Abb. 9}:

Mit von null ansteigender Verdünnungsrate ist zunächst ein Gebiet gekennzeichnet, in dem der Glyeringehalt sehr niedrig ist, aber auch im Batch ($D=0$) nicht ganz null wird. Die Ammoniumkonzentration fällt stark ab, während Biomasse und Produktgehalt kräftig ansteigen. Diese Region endet, wenn der Ammoniumanteil gegen null geht. Hier überlappt das Diagramm mit dem nächsten Abschnitt, in dem statt Glycerin Ammonium limitiert ist. Der Übergang der beiden Kurvenzweige ist nicht stetig. Je nachdem von welcher Seite das Gleichgewicht angestrebt wird, folgt ein Steady-State bei Ammoniumüberschuß und hohem Biomassegehalt oder bei Glycerinüberangebot und hoher Produktkonzentration.

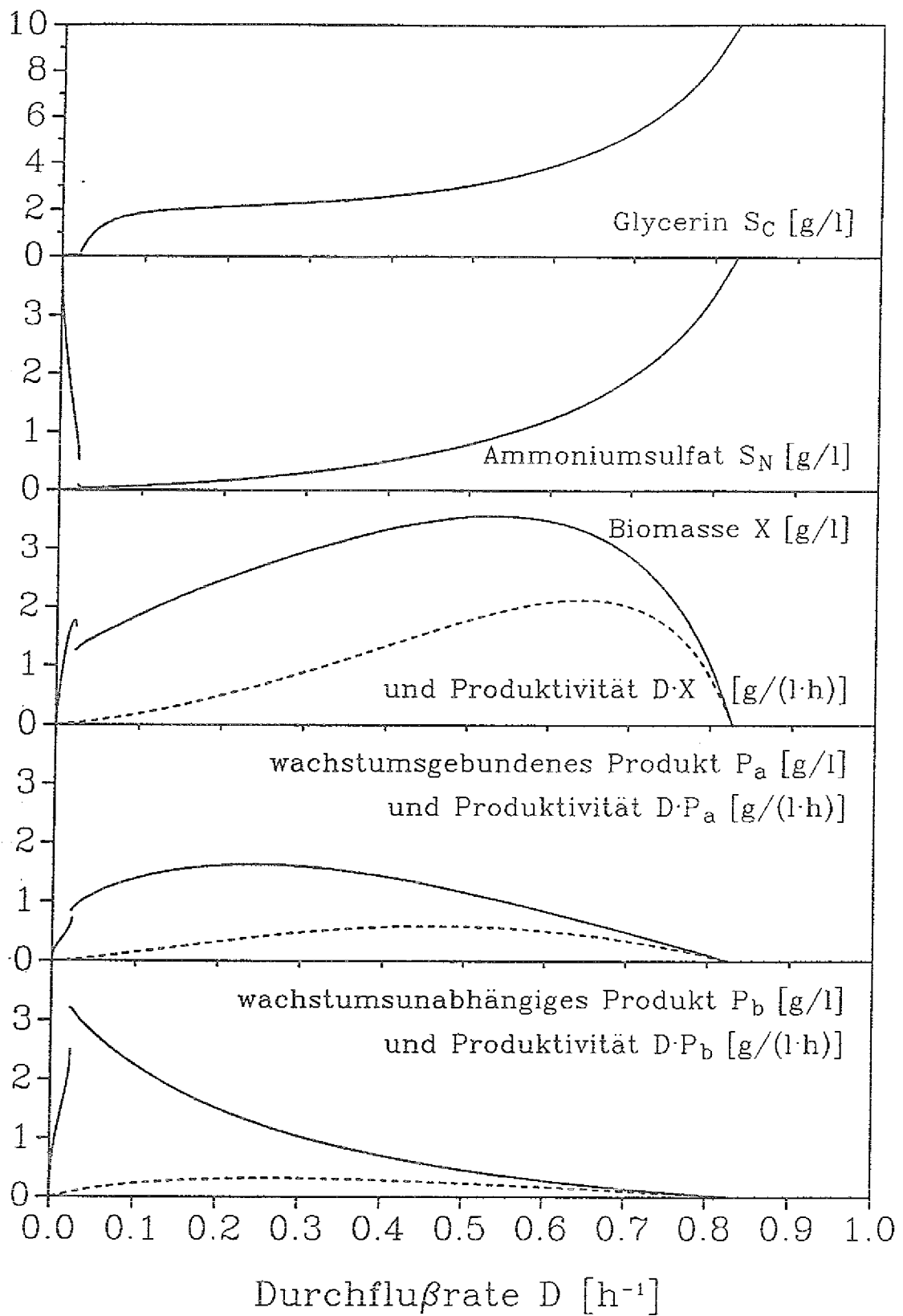


Abb. 9: XD-Diagramm der Subtilisinbildung im Modell

Mit weiter steigender Durchflußrate erhöhen sich der Glycerin- und Ammoniumgehalt. Mit ihnen nimmt die Zellysis ab und das Wachstum zu. Der stärkeren Zellvermehrung wirkt die höhere Verdünnung durch neues Medium entgegen. Die Biomasse nimmt daher zunächst noch zu, durchläuft dann ein Maximum und wird schließlich schon weit unter der maximalen Wachstumsrate ausgewaschen.

Ähnlich verhält es sich mit dem wachstumsgekoppelten Produkt, nur daß das Optimum wegen der Inhibierung der Subtilisinbildung durch Ammoniumsulfat wesentlich früher erreicht wird. Wegen der kleinen k_m -Werte hat das wachstumsunabhängige Subtilisin sein Maximum zu Beginn des zweiten Kurvenzuges, wird also zu höheren Durchflußraten hin immer mehr ausgewaschen.

Im Diagramm sind zusätzlich die Produktivitäten für die einzelnen Produkte aufgetragen (gestrichelte Kurven). Sie sind als das Produkt der jeweiligen Zielgröße mit der Verdünnungsrate definiert. Sie zeigen den Nutzen der kontinuierlichen Kultur für verschiedene Produkte. Biomasse oder ein wachstumsgekoppeltes Produkt lassen sich sehr gut durch kontinuierliche Reaktionsführung gewinnen. Bei Substratüberschußinhibierung sinken Ausbeute und Produktivität schon deutlich. Ein wachstumsunabhängiges Produkt dagegen läßt sich im Batch oder Fedbatch besser erzeugen, da hohe Ausbeuten nur bei mäßigen Produktivitäten zu erzielen sind.

Anhand dieses einfachen Modells lassen sich für unterschiedlich regulierte Produkte Vor- und Nachteile einzelner Kultivierungsstrategien aufdecken. In Bezug auf die Subtilisinbildung ergibt sich somit folgendes Bild: Da die Biosynthese nach allgemeiner Auffassung wachstumsunabhängig erfolgt [67], wird die kontinuierliche Kultivierung nur zu unbefriedigenden Ergebnissen führen {Abb. 9}. Sie wird zudem durch Ammoniumsulfat reprimiert. Diese Überschußinhibierung läßt sich am besten in halbkontinuierlicher Kultur überwinden, wie der Vergleich zwischen Batch und Fedbatch {Abb. 6 + 7} zeigt. Die extended culture bietet zudem die Möglichkeit, optimale Substratkonzentrationen für die Proteasebildung aufrechtzuerhalten. Beispielsweise liegt der günstigste Gehalt für die N-Quelle beim geometrischen Mittel von halbmaximaler Sättigungs- und Inhibierungskonstante:

$$S_{N,max} = (k_{m,N} \cdot k_{i,p})^{\frac{1}{2}} \quad (Gl. 40)$$

mit $S_{N,max}$: Optimaler Gehalt an $(NH_4)_2SO_4$ [g/l]

3-0 Material und Methoden

3-1 Schüttelkolben

Für Schüttelkulturen wurden 1 l Erlenmeyerkolben (Schott, Mainz) mit 4 Schikanen genutzt, die mit Kapsenberg-Deckeln verschlossen wurden. Vorkulturkolben besaßen zusätzlich im Boden einen Anschluß, der ein steriles Animpfen des Fermenters ermöglichte. Die Schüttelkolben wurden mit 200 ml Medium gefüllt und 30 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Animpfen wurden sie bei 37°C mit einer Frequenz von 100 Upm geschüttelt.

3-2 Fermenter

Für die Untersuchungen in kontinuierlichen {Abb. 10 - 11} sowie in Batch- bzw. Fedbatch-Versuchen {Abb. 12 - 14} standen zwei Laborfermenter (Biostat ER-5; Braun Diessel, Melsungen) zur Verfügung:

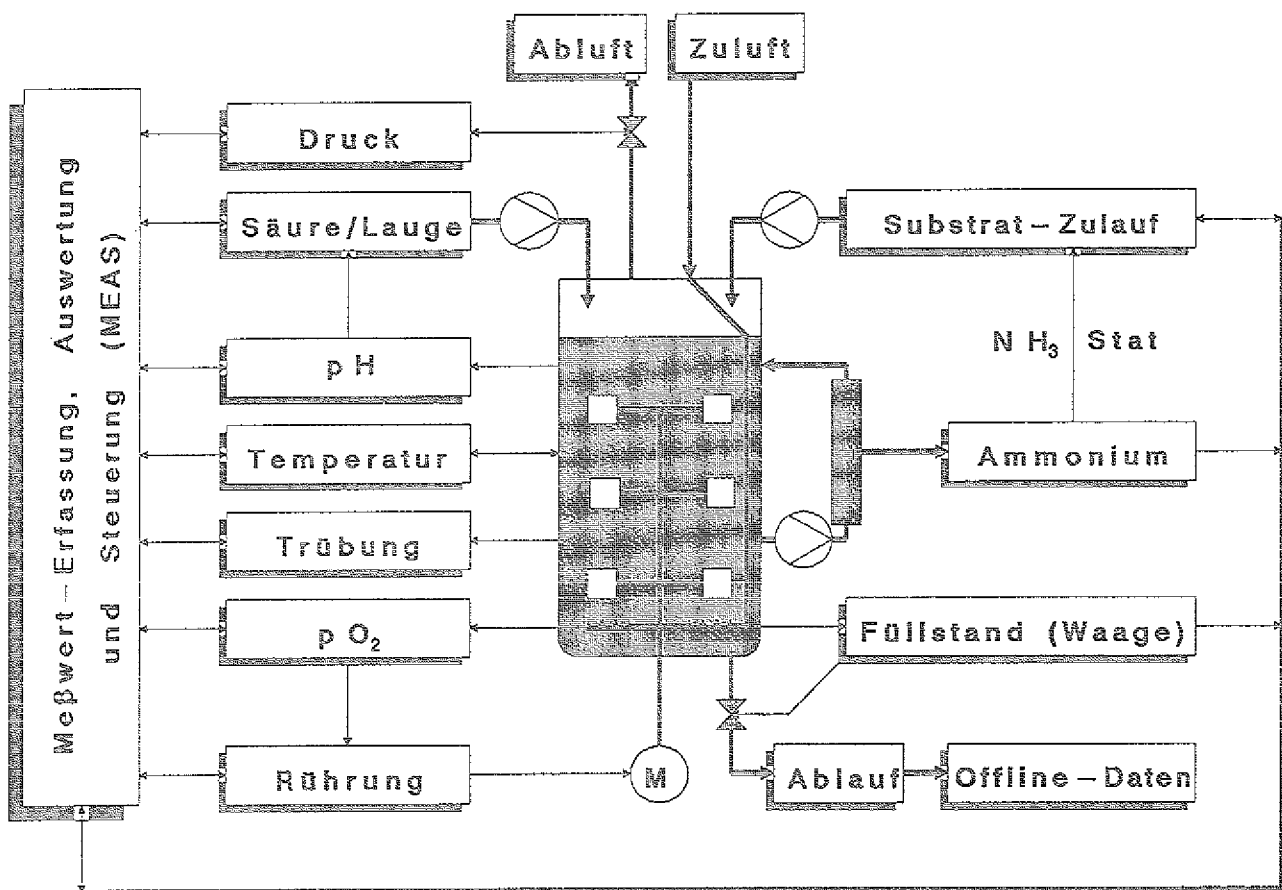


Abb. 10: Fließschema für die kontinuierliche Kultur

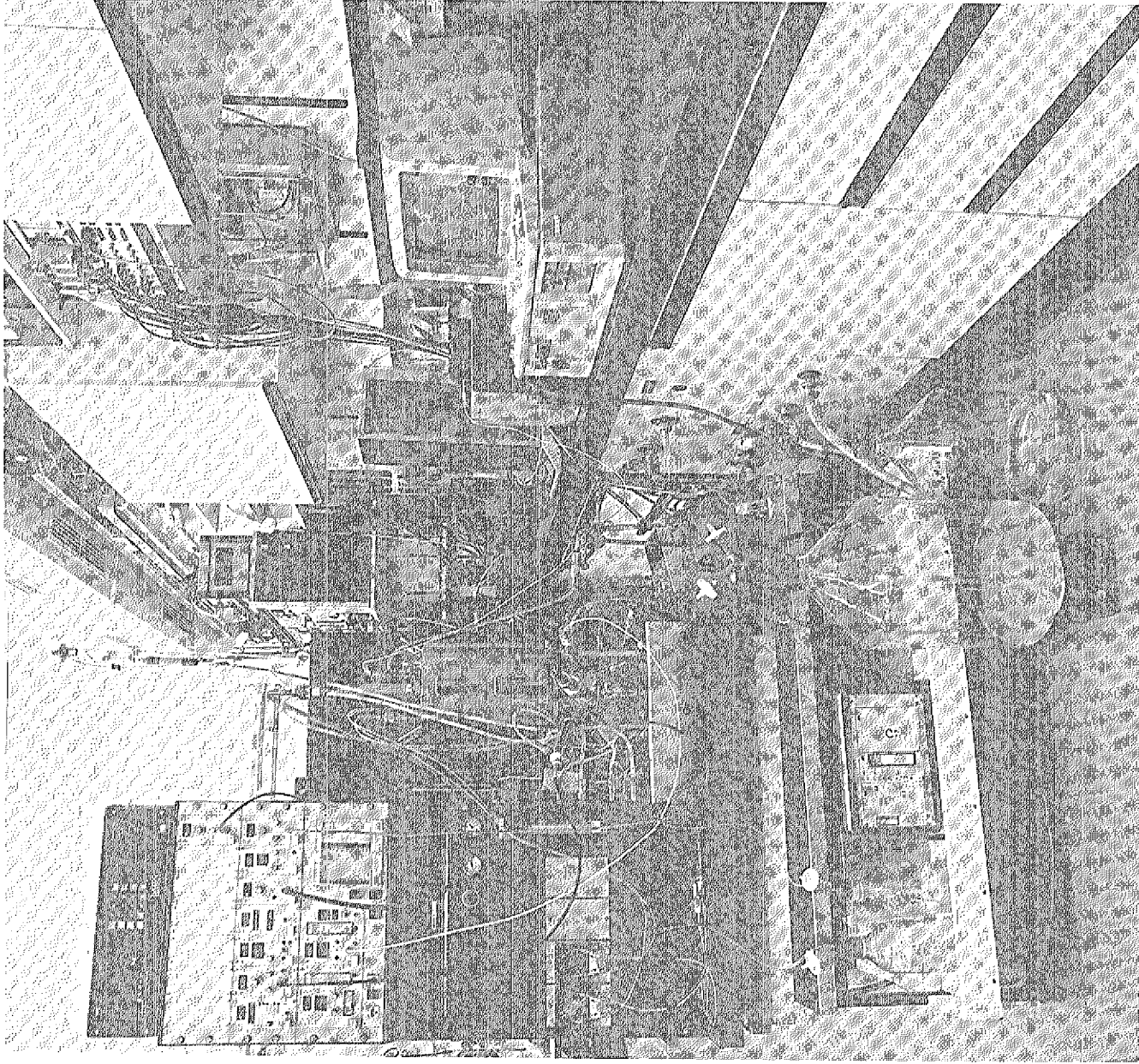


Abb. 11: Gesamtansicht des kontinuierlich betriebenen Fermenters:

- 6,4 l Kulturgefäß mit Elektroden, Zu- und Ableitungen
- Fermentergrundgerät mit Waage, Meß- und Regeleinschüben
- Meßverstärker für Trübungssonde (unten)
- Substratpumpe, Prozeßrechner und Interface (rechts)

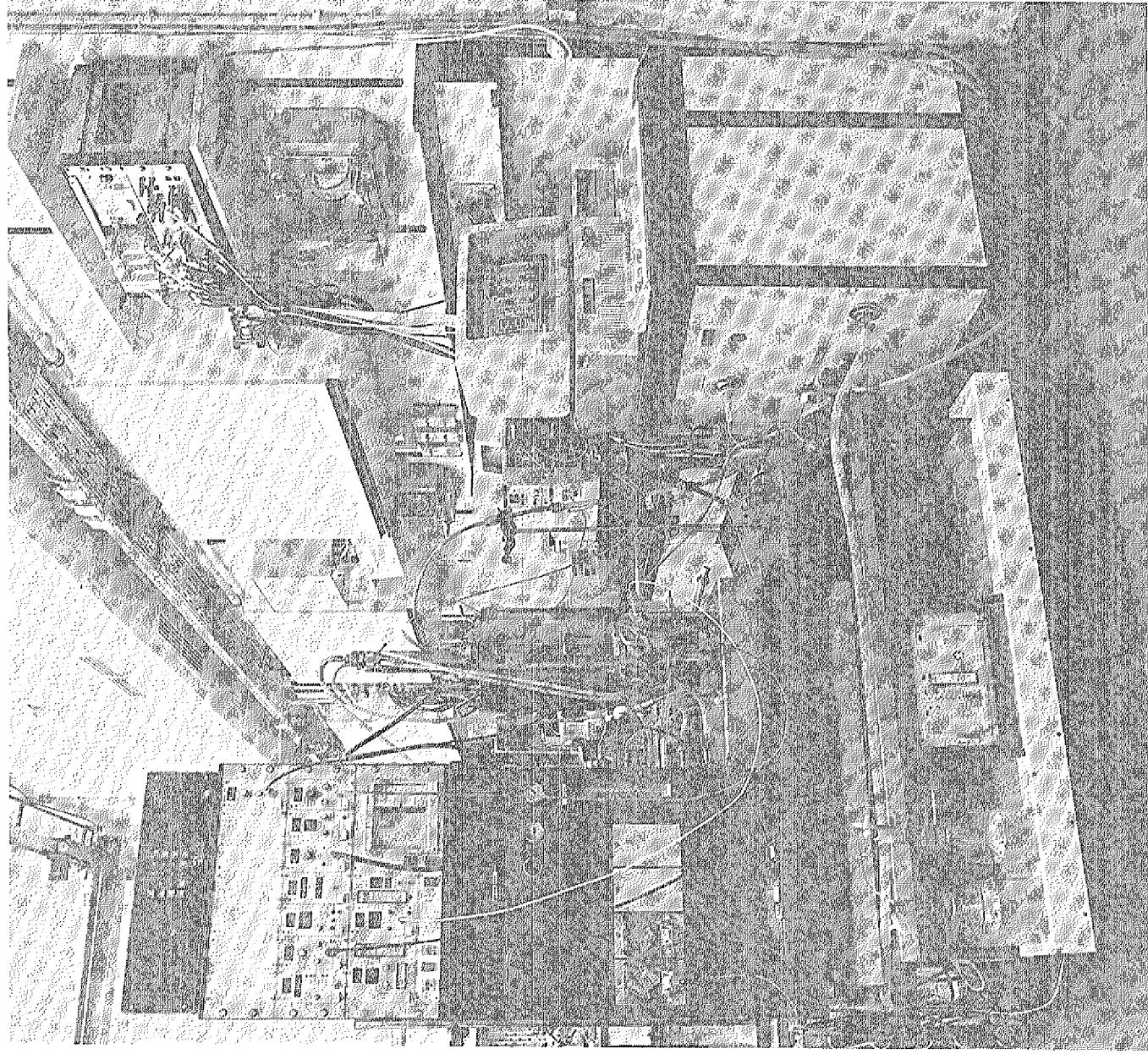


Abb. 12: Vorderansicht des Fedbatchfermenters:

- 6,4 l Kulturgefäß mit Elektroden, Zu- und Ableitungen
- Fermentergrundgerät mit Waage, Meß- und Regeleinschüben
- Meßverstärker für Trübungssonde (unten)
- Substratpumpen, Prozeßrechner und Interface (rechts)

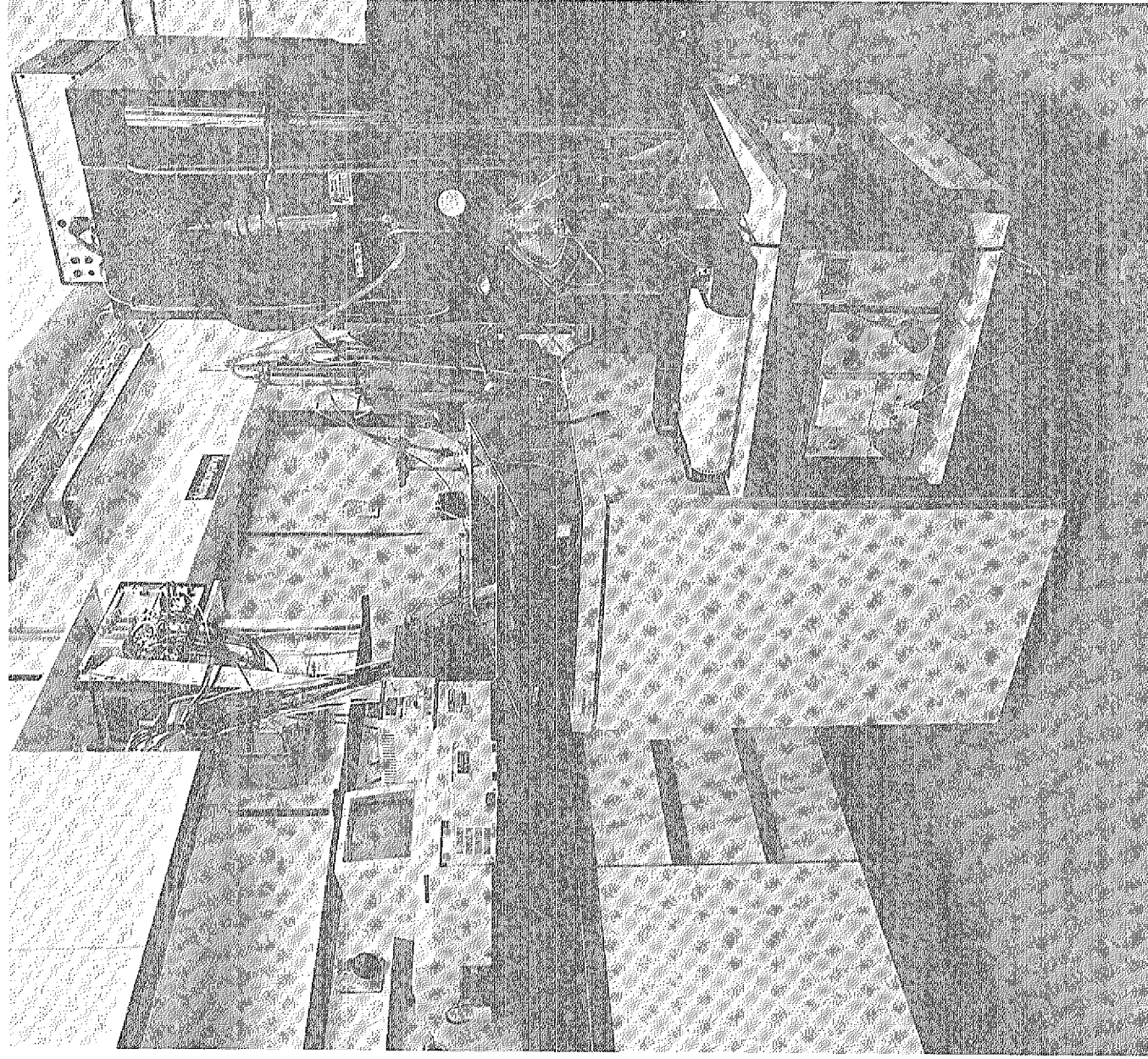


Abb. 13: Rückansicht des Fedbatchfermenters:

- 6,4 l Kulturgefäß (hinten) mit Schaumfalle (rechts)
- Flow-Injection-Analyzer (Zentrum)
- Photometer (links)
- Fluoreszenzmonitor (rechts unten)

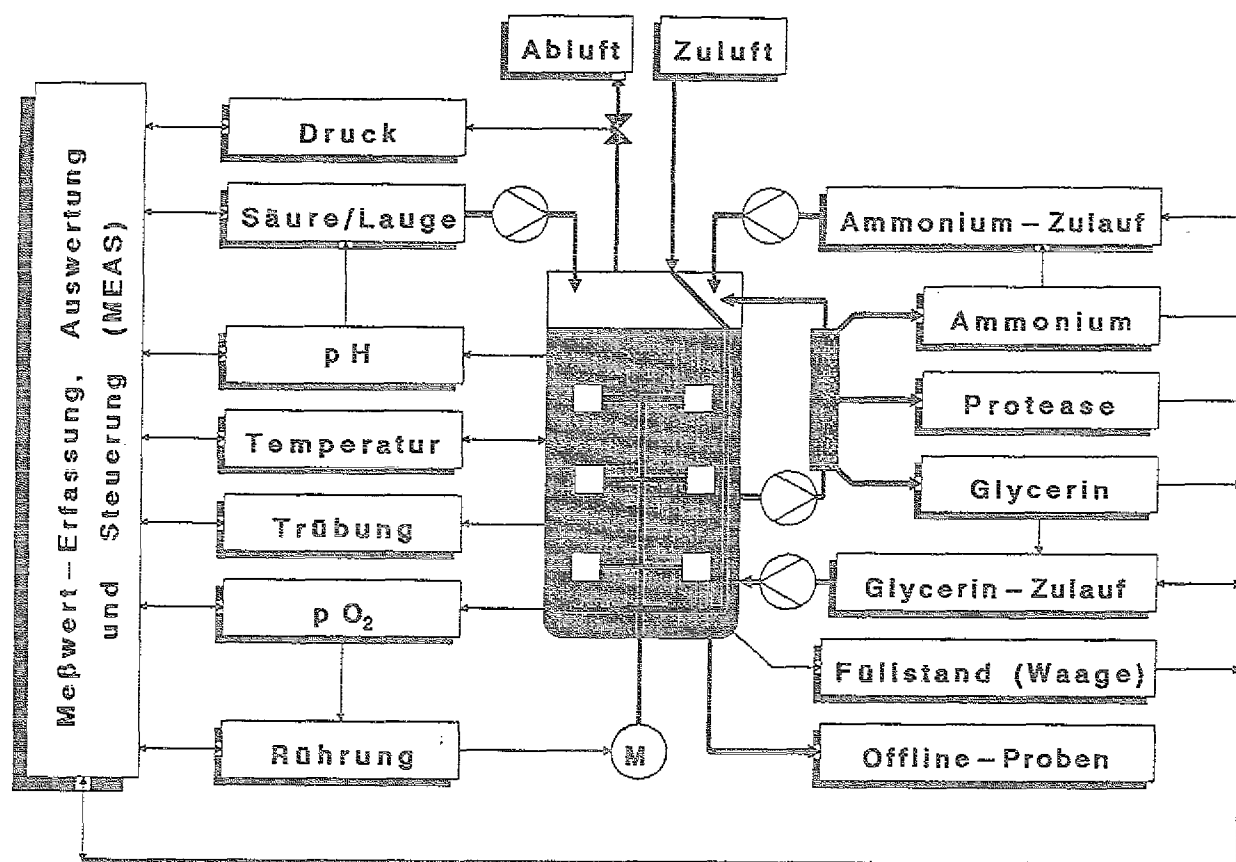


Abb. 14: Fließschema für die Fedbatchkultur

Die Fermenter besaßen ein als Rührkesselreaktor ausgelegtes Kulturgefäß mit einer Innenhöhe von 350 mm, einem Innendurchmesser von 152 mm und einem Gesamtvolumen von 6,4 l. Es bestand aus einem Deckel und einem halbkugelförmigen Boden aus Edelstahl sowie einem Zylinder aus Borosilikatglas. Die Deckelplatte und das Bodenteil waren mit Stützen und Stechanschlüssen versehen, die zur Aufnahme von Elektroden, Meßfühlern, Zu- und Ableitungen dienten. Die Rührwelle war bodenseitig gelagert und mittels einer Gleitringdichtung abgedichtet. Auf ihr waren im Abstand von 85 mm drei 6-Blattscheibenrührer montiert. Als Schikane diente der im Bodenteil befestigte Wärmeaustauscher.

3-3 Thermostatisierung und Sterilisation

Die Temperierung der Kulturflüssigkeit auf 39°C erfolgte indirekt über einen geschlossenen Umlauf zwischen dem Thermostaten des Grundgerätes und dem im Reaktorgefäß eingebauten Wärmeaustauscher. Die Temperatur im Fermenter wurde mit einem Pt 100-Temperaturfühler gemessen. Die gewünschte Betriebstemperatur wurde an einem Digitalschalter des Thermostateinschubes eingestellt oder von einem externen Sollwertsignal vorgegeben.

Der Temperaturregler besaß PDPID-Verhalten mit un stetigen puls-dauermodulierten Ausgängen für die 2400 W Heizung und das Ventil des Kühlwasserstromes [12].

Der Thermostateinschub verfügte über einen Umschalter zur Wahl der Betriebsarten »Fermentation« und »Sterilisation«. Bei der in situ Sterilisation des Kulturgefäßes mit Medium, Elektroden und der Abluftstrecke wurde die Temperatur von der 2400 Watt-Heizung in Verbindung mit der 1200 Watt-Zusatzheizung auf 121°C gebracht. Diese Temperatur wurde während der am Thermostateinschub wählbaren Dauer der Sterilisationsphase eingehalten. Der Vorgang schloß mit der Abkühlphase ab [12].

Alle weiteren Anschlüsse mußten extern im Autoklaven sterilisiert und danach über Stechanschlüsse steril mit dem Kulturgefäß verbunden werden.

3-4 Füllstands-Messung und -Regelung

Das Arbeitsvolumen wurde mit einem speziell für den Fermenter modifizierten Wägesystem (Type 3520.03; Toledo, Köln) ermittelt. Dazu stand das gesamte Grundgerät mit dem Kulturgefäß auf einer Wägeplattform. Das Nettogewicht wurde vom Gesamtgewicht durch Tarierung subtrahiert. Da es sich bei Fermentationsbrühen im allgemeinen um verdünnte wässrige Lösungen handelt, entsprach der Gewichts Differenz in g das Arbeitsvolumen in ml.

Zur Regelung des Füllstandes in kontinuierlicher Kultur wurde beim Erreichen des oberen Schaltpunktes (10 g über dem Sollgewicht) ein Ablassventil geöffnet, durch das über eine thermische Sterilfalle Kulturbrühe in ein Auffanggefäß gelangte. Es schloß, wenn das Gewicht den unteren Schaltpunkt (Sollgewicht) unterschritten hatte.

3-5 pH-Messung und -Regelung

Der pH-Wert der Fermentationsbrühe wurde mit einer sterilisierbaren Einstabmeßkette mit Brückenelektrolyt (Type 104653018; Ingold, Steinbach) gemessen. Die Elektrode besaß zwei Elektrolytkammern. Die innere enthielt die Silber/Silberchlorid-Elektrode und mit Silberchlorid gesättigte 3 M KCl-Lösung (Bezugselektrolyt). Die äußere war mit silberfreier 3 M KCl-Lösung (Brückenelektrolyt) gefüllt und stand über zwei Diaphragmen mit dem Bezugselektrolyt und der Kulturlösung in Kontakt [12]. Zum Einbau in den Fermenter war die pH-Elektrode mit einer Druckarmatur versehen. Mit Druckluft wurde ein leichter Überdruck in der Elektrode gegenüber dem Reaktorinneren aufrechterhalten, um ein Eindiffundieren von Kulturlösung durch das Diaphragma zu verhindern. Die pH-Elektrode wurde vor der Sterilisation geeicht.

Zur Regelung des pH-Wertes der Kulturbrühe wurden 2 N Schwefelsäure und 2 N Natronlauge als Korrekturmittel verwendet. Der pH-Sollwert wurde an einem Digitalschalter des Regeleinschubes eingestellt oder von einem externen Sollwertsignal vorgegeben. Der PI-Regler steuerte die Säure- und Laugepumpen unstet und pulsdauermoduliert an. Der Proportionalbereich und eine Totzone, in der der Regler inaktiv war, ließen sich an Potentiometern einstellen [12]. Die Dosierzeiten der Korrekturmittelpumpen wurden aufsummiert und in der Auflösung von einer Sekunde registriert.

3-6 Belüftung und Innendruckregelung

Zur Belüftung diente Druckluft aus der Hausleitung, die zur Abscheidung von Aerosolen einen Vorfilter durchströmte. Sie paßte zwei Druckminderer, an denen der maximale Fermenterdruck und der Überlagerungsdruck für die Elektroden einjustiert wurde. Die Einstellung der Begasungsrate erfolgte an einem Gasmengendurchflußmesser mit einem Präzisionsnadelventil. Die Zuluft gelangte über einen Keramiksterilfilter in ein ringförmiges Begasungsrohr im Boden des Kulturgefäßes und trat durch eine Reihe feiner Öffnungen in Form kleiner Blasen in die Fermentationsbrühe ein. Die Abluft verließ den Fermenter über einen im Deckel angebrachten Rückflußkühler. Sie gelangte über eine Schaumfalle, einen weiteren Keramiksterilfilter und ein Ventil zur Reaktorinnen-druckregelung ins Freie.

Die Messung des Innendruckes erfolgte mit einem im Fermenterdeckel eingeschraubten piezoresitiven Druckaufnehmer. Zur Gewährleistung der Sterilität wurde an einem Digitalschalter des Regeleinschubes ein Sollüberdruck von 100 mbar eingestellt. Alternativ ließ sich auch ein externer Sollwert vorgeben. Proportional zur Sollwertabweichung wurde das Stellventil geöffnet oder geschlossen [12].

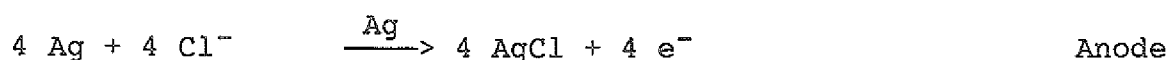
3-7 Drehzahlregelung

Die Rührwelle wurde von einem Gleichstrommotor angetrieben. Die Ist-Drehzahl wurde mit einem auf dem Motor aufgeflanschten Tachogenerator erfaßt. Die gewünschte Drehzahl (bis 1000 Upm) wurde an einem Digitalschalter des Regeleinschubes eingestellt oder von einem externen Sollwertsignal vorgegeben. Mit zwei kalibrierten Potentiometern konnte die Rührerdrehzahl auf einen minimalen und maximalen Wert begrenzt werden. Der Drehzahlregler wirkte mit PI-Charakteristik auf einen Thyristorsteller, der bei unterlagerter Ankerstromregelung die Ankerspannung des Motors anpaßte [12].

Neben dem Drehzahl-Istwert stand auch der Ankerstrom als Meßsignal zur Verfügung. Die Größe ist proportional zum Drehmoment und damit zur Viskosität [12].

3-8 pO₂-Messung und -Regelung

Die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration $c(\text{O}_2)$ als Sauerstoffpartialdruck $p\text{O}_2$ erfolgte mit einer sterilisierbaren pO₂-Elektrode (Type 322756702; Ingold, Steinbach). Die nach dem Clark-Prinzip arbeitende Sonde bestand aus einer Silberanode und einer Platinkathode, die durch einen chloridhaltigen Elektrolyten leitend miteinander verbunden waren. Durch eine gaspermeable polymere Membran diffundierte Sauerstoff aus der Meßlösung in die abgetrennte Elektrodenkammer, wo er bei geeigneter Polarisationsspannung vollständig reduziert wurde [12]:



Aus den Elektrodenreaktionen resultierte ein elektrischer Strom, der zum Sauerstoffpartialdruck $p\text{O}_2$ in der Meßlösung proportional war. Über das Henry'sche Gesetz folgt hieraus die Gelöstsauerstoffkonzentration $c(\text{O}_2)$:

$$c(\text{O}_2) = H \cdot p\text{O}_2$$

Die Henry-Konstante H ist eine Funktion der Temperatur, des Lösungsmittels und der darin gelösten Stoffe. Da sich während einer Fermentation die Konzentrationsverhältnisse stark ändern, wird meist auf die umständliche Berechnung von $c(\text{O}_2)$ verzichtet. Aus praktischen Gründen begnügt man sich mit einer relativen Eichung der pO₂-Elektrode:

Direkt nach der Sterilisation wurde das Medium im Fermenter unter Betriebsbedingungen (39°C, pH 7, 300 Upm, 1 vvm, 100 mbar Überdruck) mit Stickstoff und Luft begast, um den 0 und 100 % Wert einzujustieren.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration, ausgedrückt als Sauerstoffpartialdruck, hängt direkt vom Gesamtdruck und dem Sauerstoffanteil des Gases ab. Im offenen System eines belüfteten Fermenters spielen aber auch die Begasungsrate und der Eintrag in das Kulturmedium eine Rolle. Der Übergang von der Gas- in die Flüssigkeitsphase ist proportional zur Grenzfläche zwischen beiden Phasen. Die Größe und die Verweilzeit der Gasblasen im Medium hängen von der Viskosität, der Einblasvorrichtung, der Rührerform und der Rührerdrehzahl ab.

Zur pO₂-Regelung wurde die Rührerdrehzahl als Stellglied verwendet. Die Drehzahl lag minimal bei 300 Upm. Zur Aufrechterhaltung des pO₂-Solls wurde mit einem ID-Kompensationsregler [Kap. 3-15] die Drehzahl verstellt.

3-9 Kontinuierliche Probenahme

Die Online-Analyse von Inhaltsstoffen der Fermentationslösung ist eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Prozeßkontrolle. Da es an zuverlässigen, in situ autoklavierbaren, spezifischen Sonden mangelt, müssen derartige Substanzen außerhalb des Bioreaktors bestimmt werden. Dazu wird sterile Fermenterprobe unter Vermeidung jeglicher Kontamination gewonnen und von Analysenpumpen den kontinuierlichen Messungen permanent zugeführt.

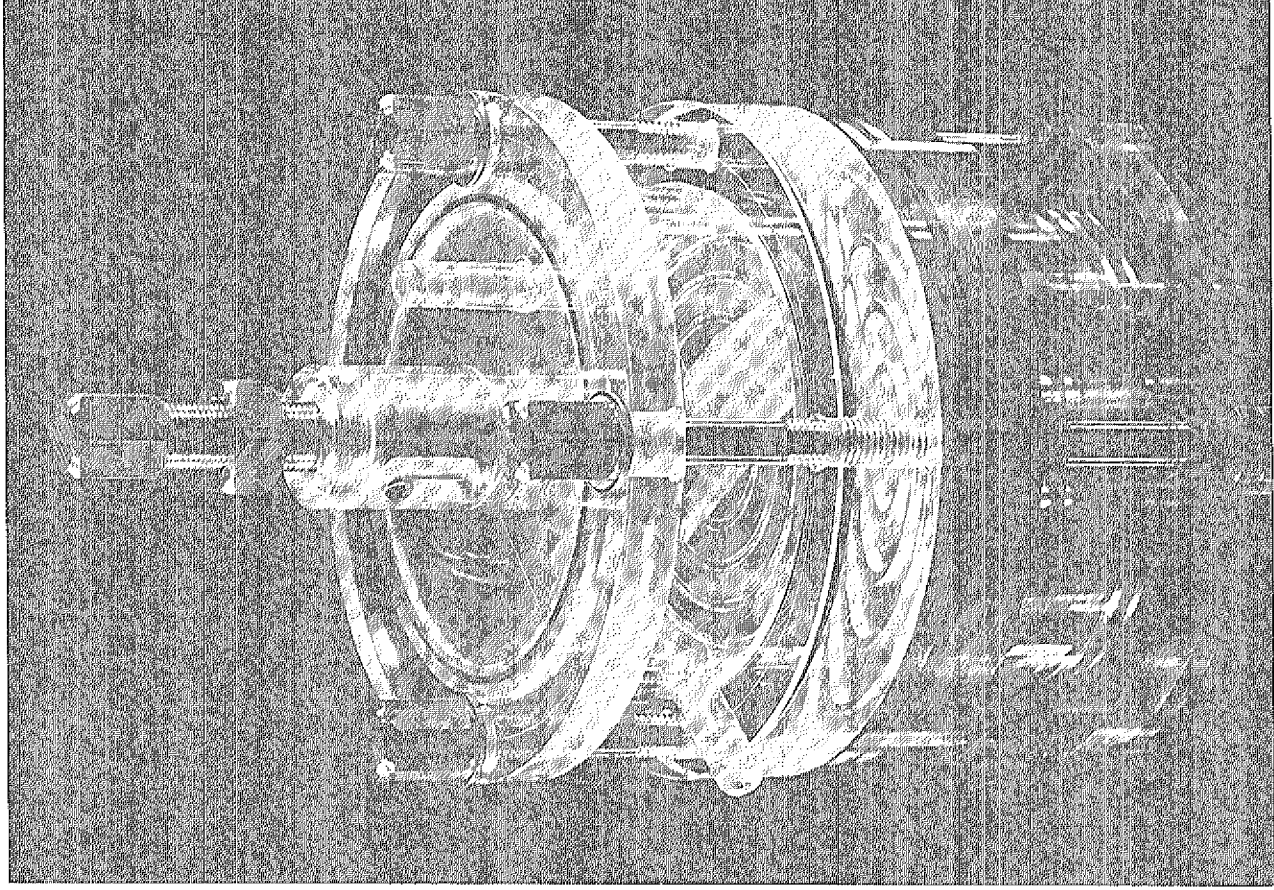


Abb. 15: BioPEM-Probe-Entnahme-Modul aus Plexiglas

Biomassefreies Kulturfiltrat wurde an einem sterilisierbaren Membranmodul abgezogen, an dem Fermentationsbrühe mit einer Schlauchpumpe (Watson-Marlow 501 U/R 170 Upm; Verder, Düsseldorf) im Umlauf vorbeigeführt wurde.

Anfangs wurde hierfür ein kommerziell erhältliches Probenahmemodul aus Edelstahl (BioPEM; Braun Diessel, Melsungen) {Abb. 15} eingesetzt. Die neuartige Filtrationszelle bestand aus einer zylindrischen Durchflußkammer, die im Boden eine 0,22 µm Flachmembran mit 90 mm Durchmesser (Type GVWP 090 50; Millipore, Bedford, USA) aufnahm. Das Filtrat wurde über eine Auslaßöffnung im Bodenteil abgezogen. Es besaß ein Totvolumen von ca. 1,1 ml. Durch magnetische Rührung wurde dem Membranfouling entgegengewirkt [46]. Aufgrund dieser Konstruktion konnte die Scherrate an der Membran unabhängig von der Flußrate des Prozeßfluids gewählt werden. Da der Magnetkern direkt über dem Flachfilter angebracht war, kam es jedoch leicht zu Verletzungen der empfindlichen Membran.

Als Alternative wurden ein- und achtsträngige Hollowfibermembranmodule entwickelt {Abb. 16} [71,79]. Ihr Grundkörper bestand aus einem 120 mm langen Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 7 mm, das an den Enden Gewinde für GL 18 Hülsen besaß. Als Hollowfibrermembran diente Polypropylenschlauch (Accurel PP Tabular Membran V8/2; Enka, Wuppertal) mit folgenden Eigenschaften {Tab. 4}:

Polypropylenmembran	einfaseriges Modul	achtfaseriges Modul
Trenngrenze	0,2 µm	0,2 µm
Innendurchmesser	5,5 mm	1,8 mm
Wanddicke	1,6 mm	0,4 mm
effektive Länge	85,0 mm	85,0 mm
Filtrationsfläche	2937,4 mm ²	7690,6 mm ²
Mantelvolumen	1,5 ml	1,0 ml

Tab. 4: Eigenschaften der Hollowfibermembranmodule

Die Polypropylenschläuche waren im Glasmantel mit Silikonkautschuk (Type RTV-E-602, Wacker) abgedichtet. Am Anfang einer Fermentation mußten das Filtrationsmodul mit Ethanol benetzt werden, da die Polypropylenmembran hydrophobe Eigenschaften besaß. Dem Fouling der Filterfläche wurde durch eine starke tangentielle Überströmung der Membran begegnet. Der Permeatstrom wurde vom unteren der beiden seitlichen Anschlüsse abgeführt. Am oberen konnte zur Steigerung des Filtratflusses ein leichter Unterdruck angelegt werden. Bei den Fermentationen wurde nur das einsträngige Rohrmodul eingesetzt, da es sich nach Gebrauch mit einer Bürste vorreinigen und mit 2 N NaOH-Lösung regenerieren ließ.

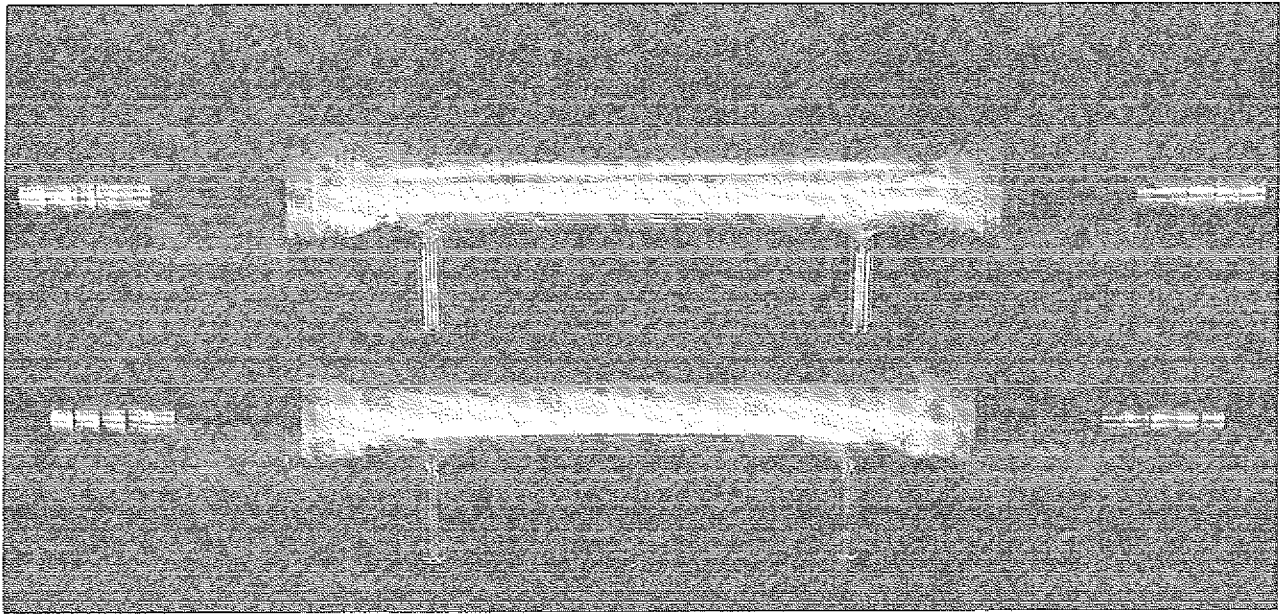


Abb. 16: Hollowfibermembranmodule

Im Vergleich zur BioPEM-Filtrationseinheit konnten mit dem ein-faserigen Hollowfibermembranmodul deutlich höhere Standzeiten und Filtrationsleistungen erzielt werden. Beide Module besaßen ein relativ kleines Totvolumen. Durch Diffusionsprozesse über die Membran war die Totzeit geringer als die mittlere Verweilzeit. Mit zunehmender Kultivierungsdauer ging jedoch der Permeatstrom wegen der Bildung schleimiger Biopolymere zurück.

3-10 NH_3 -Messung und -Regelung

Der Ammoniumgehalt wurde mit einer gassensitiven Ammoniak-elektrode (Type 152303000; Ingold, Steinbach) [44] gemessen. Die Meßlösung wurde mit 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 12 versetzt, um alle Ammoniumionen in freien Ammoniak zu überführen. NH_3 diffundierte durch eine Teflonmembran in die Meßkammer und verursachte in der Elektrolytlösung einen pH-Shift, der einem pH-Meter als Meßsignal diente. Geeicht wurde mit einer 1 mM Ammoniumlösung. Die Steilheit der Elektrode wurde mit einer 10 mM Ammoniumlösung überprüft. Nach dem Nernst'schen Gesetz sollte die Meßspannung (EMK) bei Standardbedingungen um 59,1 mV zunehmen:

$$\text{EMK} = - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{c_0}{c_1} = - 59,1 \cdot \lg \frac{c_0}{c_1} \quad [\text{mV}]$$

Durchführung der Offline-Messungen:

0,5 ml zentrifugierte Probe oder Standardlösung

4,5 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 12

in ein kleines Becherglas geben und mit der Ammoniakelektrode unter Magnetrührung bis zum Erreichen des Maximums messen. Die Methode wies relativ hohe Schwankungen auf, da durch das Rühren der alkalischen Lösung laufend Ammoniak entwich.

Durchführung der Online-Messungen:

Für die Online-Messungen wurde der Membrankörper der gassensitiven Elektrode modifiziert. Direkt vor der Teflonmembran wurde in den Membrankörper eine ca. 0,1 ml fassende Durchflußkammer installiert. Zum Vergleich sind hier die modifizierte und die originale Ammoniakelektrode abgebildet {Abb. 17 + 18}.

Probe bzw. Standard und 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 12 wurden von einer Mehrkanalschlauchpumpe (Watson-Marlow 503 U/AA4 220 Upm; Verder, Düsseldorf) gefördert, im Verhältnis 1:12 gemischt und der Durchflußzelle der Ammoniakelektrode zugeführt. Das Signal war stabil und gut reproduzierbar.

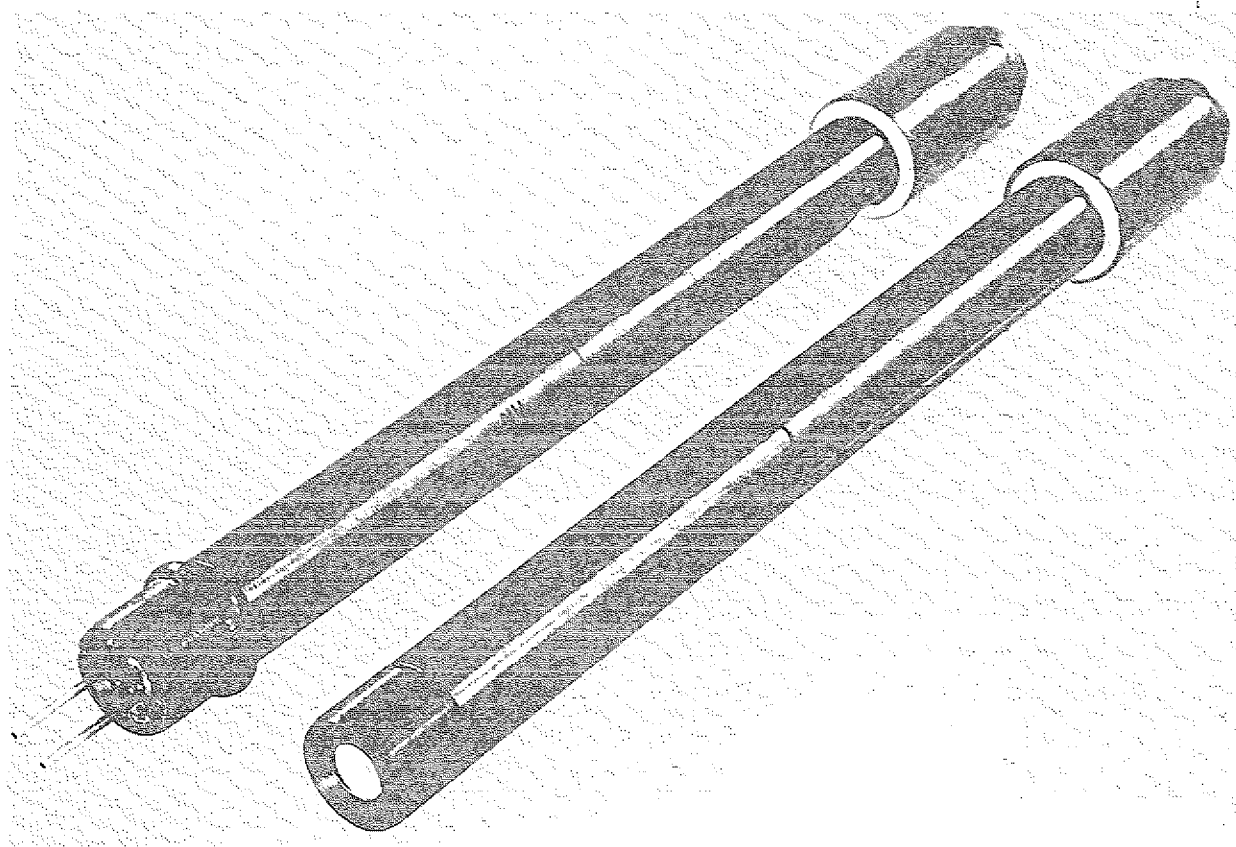


Abb. 17: Photo der modifizierten und originalen Ammoniakelektrode

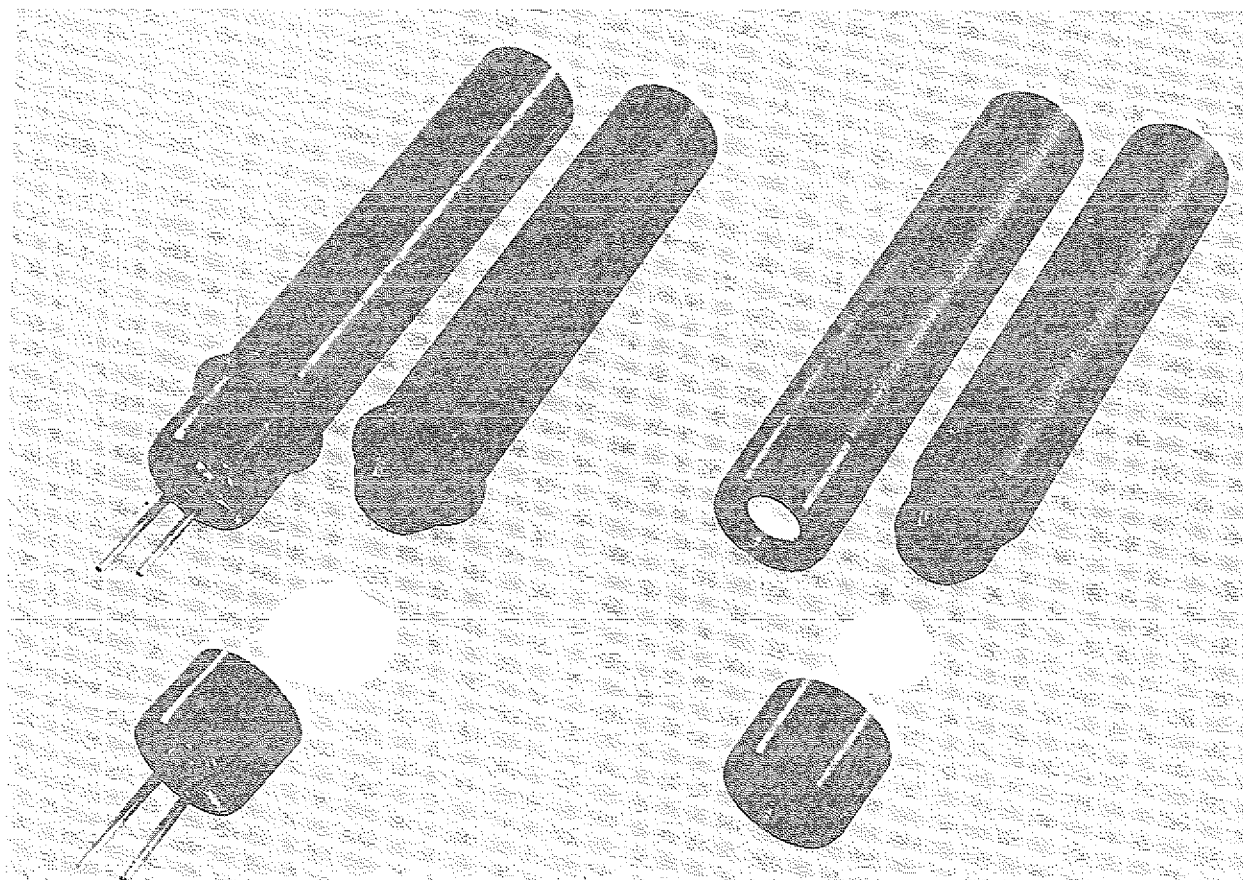


Abb. 18: Photo des modifizierten und originalen Membrankörpers

Das NH₃-Soll wurde mit einem ID-Kompensationsregler [Kap. 3-15] aufrechterhalten, der als Stellglied eine Pumpe zur Nachdosierung von 2,5 M Ammoniumsulfatlösung (Fedbatch; Watson-Marlow-Schlauchpumpe 101 U/R, 32 Upm; Verder, Düsseldorf) oder Medium (NH₃-Auxostat; Dosierstrecke YPP01; Sartorius, Göttingen) ansprach.

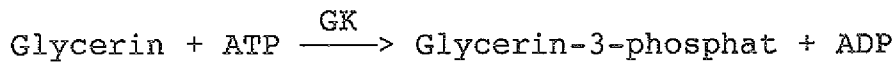
3-11 Glycerin-Messung und -Regelung

Während bei der Online-Analyse von Glycerin nur eine enzymatische Reaktion stattfand, umschloß die Offline-Bestimmung drei biokatalytische Teilschritte. Die Online-Methode war in ihrem Ansatz zwar einfacher, sie war aber wegen Nebenaktivitäten der Dehydrogenase nicht so spezifisch.

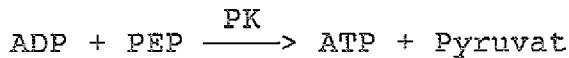
3-11-1 Offline-Glycerin-Messung

Der Glyceringehalt wurde nach einem Enzymtest der Firma Boehringer ermittelt [20]:

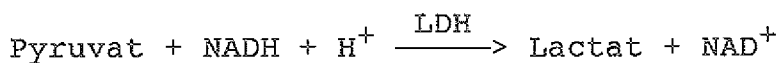
Glycerin wurde in der durch Glycero-Kinase (GK) katalysierten enzymatischen Reaktion durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert:



Mittels Pyruvat-Kinase (PK) wurde das entstandene Adenosin-5-diphosphat (ADP) durch Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Pyruvatbildung wieder in ATP überführt:



Pyruvat wurde durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart von Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wurde:



Der Verbrauch an NADH war der Glycerinmenge äquivalent und ließ sich aufgrund seiner Extinktion bei 340 nm verfolgen.

Reagenzien:

Puffer:

3,6 mM Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Merck)
270,0 mM Triethanolamin-hydrochlorid (Boehringer)
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

NADH/ATP/PEP-Lösung:

7,0 mM reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
(Dinatriumsalz; Boehringer)
26,0 mM Adenosin-5'-triphosphat (Dinatriumsalz; Boehringer)
35,0 mM Phosphoenolpyruvat (Mononatriumsalz; Boehringer)
417,0 mM Natriumhydrogencarbonat (Merck)

PK/LDH-Suspension (Boehringer):

3 g/l Pyruvat-Kinase
1 g/l Lactat-Dehydrogenase

GK-Suspension (Boehringer):

1 g/l Glycero-Kinase

Testansatz:

1000 μl Puffer
50 μl NADH/ATP/PEP-Lösung
50 μl Probe (Leerwert mit Wasser)
5 μl PK/LDH-Suspension

Die Probe wurde auf einen Glyceringehalt zwischen 0,7 und 3,5 mM verdünnt. In einer Vorreaktion wurde unter NADH-Verbrauch bereits im Testansatz vorhandenes ADP zu ATP umgesetzt. Im Anschluß wurde die Startextinktion E_0 bei 340 nm gemessen.

5 µl GK-Suspension

Die eigentliche Reaktionsfolge zur quantitativen Bestimmung des Glyceringehaltes wurde mit der Glycero-Kinase gestartet. Nach der Umsetzung des Glycerins kam die Reaktion zum Stehen und die Endextinktion E_1 wurde abgelesen.

Die Blindreaktion wurde nach einer Leerwertbestimmung mit Wasser als Probe subtrahiert.

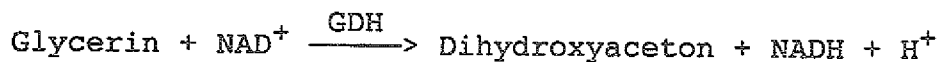
Die Glycerinkonzentration ließ sich aus den Extinktionen nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnen:

$$c_{\text{Glycerin}} = \frac{[(E_{P,1} - E_{P,0}) - (E_{L,1} - E_{L,0})] \cdot V}{\epsilon_{340\text{nm}} \cdot d \cdot v}$$

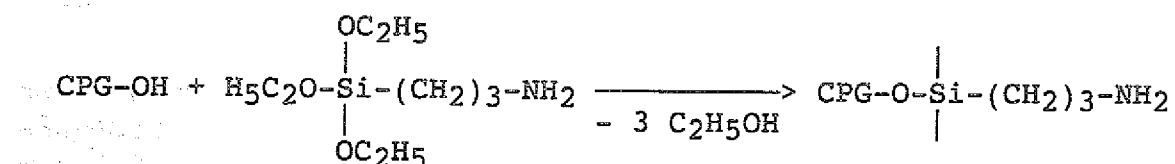
mit c_{Glycerin}	: Glyceringehalt [mM]
d	: Schichtdicke der Küvette [1 cm]
V	: Testvolumen [1110 µl]
v	: Probevolumen [50 µl]
$E_{P,0}$	: Startextinktion der Probe [-]
$E_{P,1}$	: Endextinktion der Probe [-]
$E_{L,0}$	: Startextinktion des Leerwertes [-]
$E_{L,1}$	: Endextinktion des Leerwertes [-]
$\epsilon_{340\text{nm}}$	: Molarer Extinktionkoeffizient von NADH bei 340 nm [6,3 mM/cm]

3-11-2 Online-Glycerin-Messung und -Regelung

Die Online-Analyse von Glycerin [71,79] beruhte auf der von Glycerin-Dehydrogenase (GDH) katalysierten Umsetzung von Glycerin und NAD^+ zu Dihydroxyaceton und NADH mit einem Optimum bei pH 10 und 25°C:



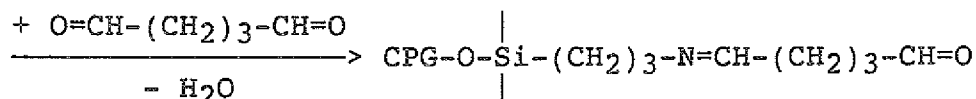
Die Reaktion fand mittels Fließinjektionsanalyse in einer 30 mm langen Plexiglassäule mit Gewinden für 5 mm Latek-Fittings statt. Das Röhrchen enthielt einen 15 mm langen Kanal mit einem Durchmesser von 3 mm, der mit immobilisierter Glycerin-Dehydrogenase gefüllt war. Das Zwischenkornvolumen betrug nur 92 µl. Als Träger für das Enzym diente sogenanntes Controlled-Pore-Glas (CPG), das mit Aminopropyl-triethoxy-silan zum α -Aminopropyl-Controlled-Pore-Glas modifiziert erhältlich war (Aminopropyl-CPG-1400 A; Fluka):



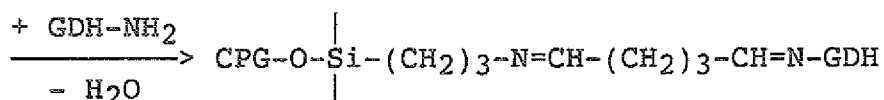
Das Trägermaterial besaß durch gezielte Kondensation relativ einheitliche Eigenschaften:

- Partikelgröße 75 - 125 μm
- Porengröße 0,14 μm
- Porenvolumen 1,19 ml/g
- spezifische Oberfläche 24 m^2/g

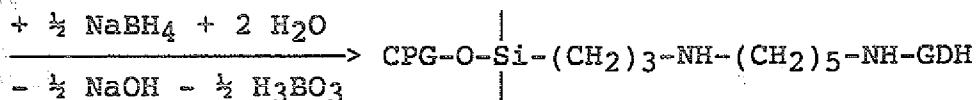
Die Aktivierung von 310 mg α -Aminopropyl-CPG mit 2 ml 25 % wässriger Glutardialdehydlösung (Fluka) als Spacer fand bei Raumtemperatur unter Vakuum während 30 min statt. Nach weiteren 30 min Reaktionszeit ohne Vakuum wurde das Produkt abfiltriert und mit 200 ml bidest. H_2O gewaschen:



Zur Immobilisierung wurden 9 mg (600 U) Glycerin-Dehydrogenase von *Cellumonas species* (Sigma) im 4 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6 gelöst und zum aktivierten Glas gegeben. Bei Raumtemperatur banden während 30 min unter Vakuum und weiteren 30 min ohne Vakuum Aminogruppen von Lysinresten des Enzyms an die noch freie Aldehydgruppe des Spacers:



Die hydrolyseempfindliche Iminbindung wurde mit 4 mg Natriumborhydrid (Fluka) zu einer stabilen Aminbindung reduziert. Der Ansatz wurde 30 min unter Vakuum gehalten und anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Das hydrierte Immobilisat wurde nacheinander mit 250 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 250 ml bidest. H_2O und nochmals mit 250 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 gewaschen:



Die immobilisierte Glycerindehydrogenase wurde in die Enzymsäule abgefüllt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Außerhalb der Analysenzeiten wurde das immobilisierte Enzym in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen betrug die Aktivitätsabnahme 0,071 d^{-1} .

Die Glycerin-Dehydrogenase wird gleichsam von Ammonium- und Kaliumionen aktiviert {Abb. 19} [52]. Diesbezügliche Störungen konnten ausgeschaltet werden, indem die Reaktion bei Sättigung beider Kationen durchgeführt wurde.

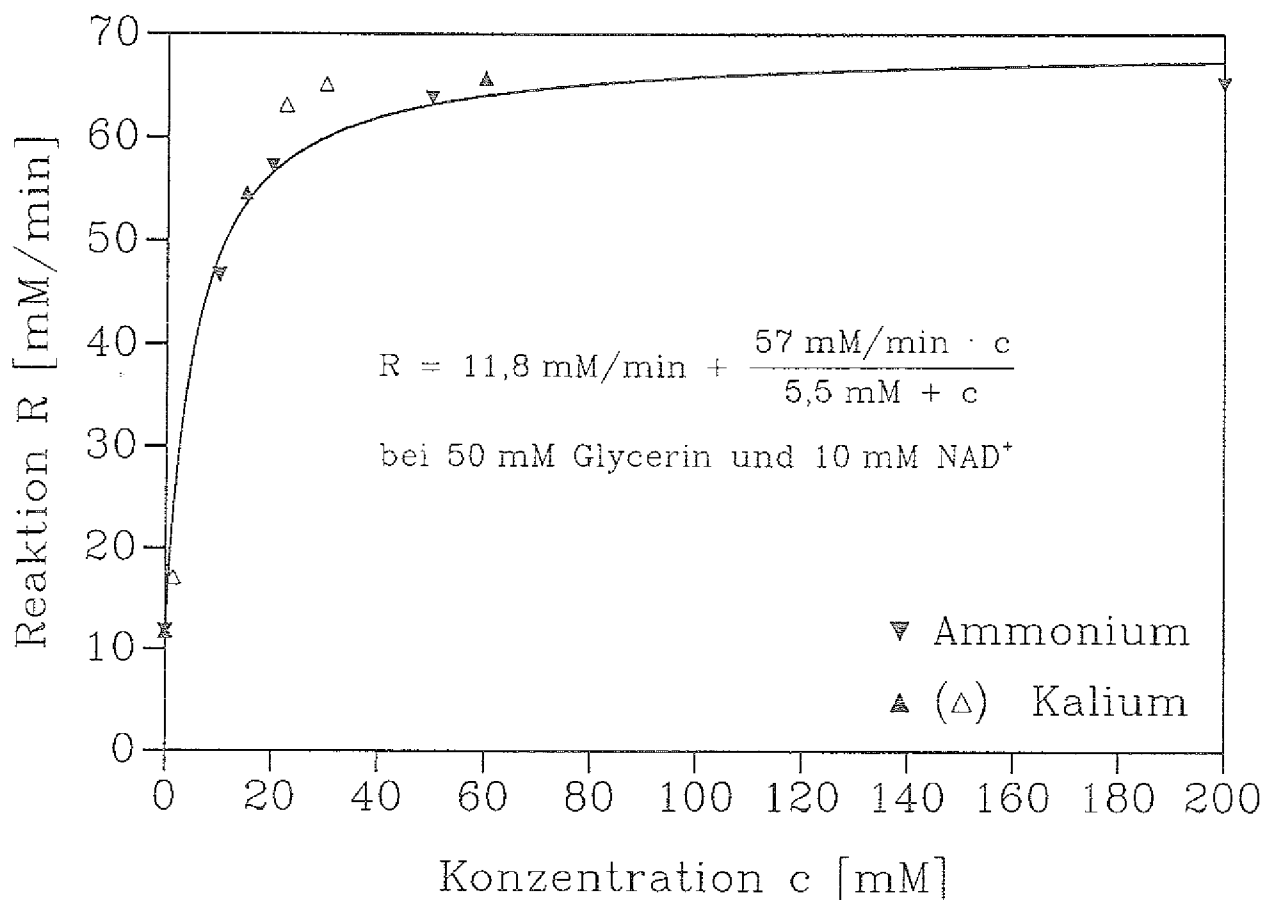


Abb. 19: Flow-Injection-Analyse von Glycerin:
Aktivierung durch NH_4^+ - und K^+ -Ionen [nach 71]

Reagenzien für die Fließinjektionsanalyse:

Standard-Lösung:

50 mM Glycerin (87 %; Merck)

NAD^+ -Lösung:

10 mM Nicotinamid-adenin-dinucleotid (Merck)

Puffer:

10 mM Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)

10 mM Dikaliumhydrogenphosphat (Merck)

100 mM Ammoniumsulfat (Merck)

200 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck)
mit NaOH auf pH 8,15

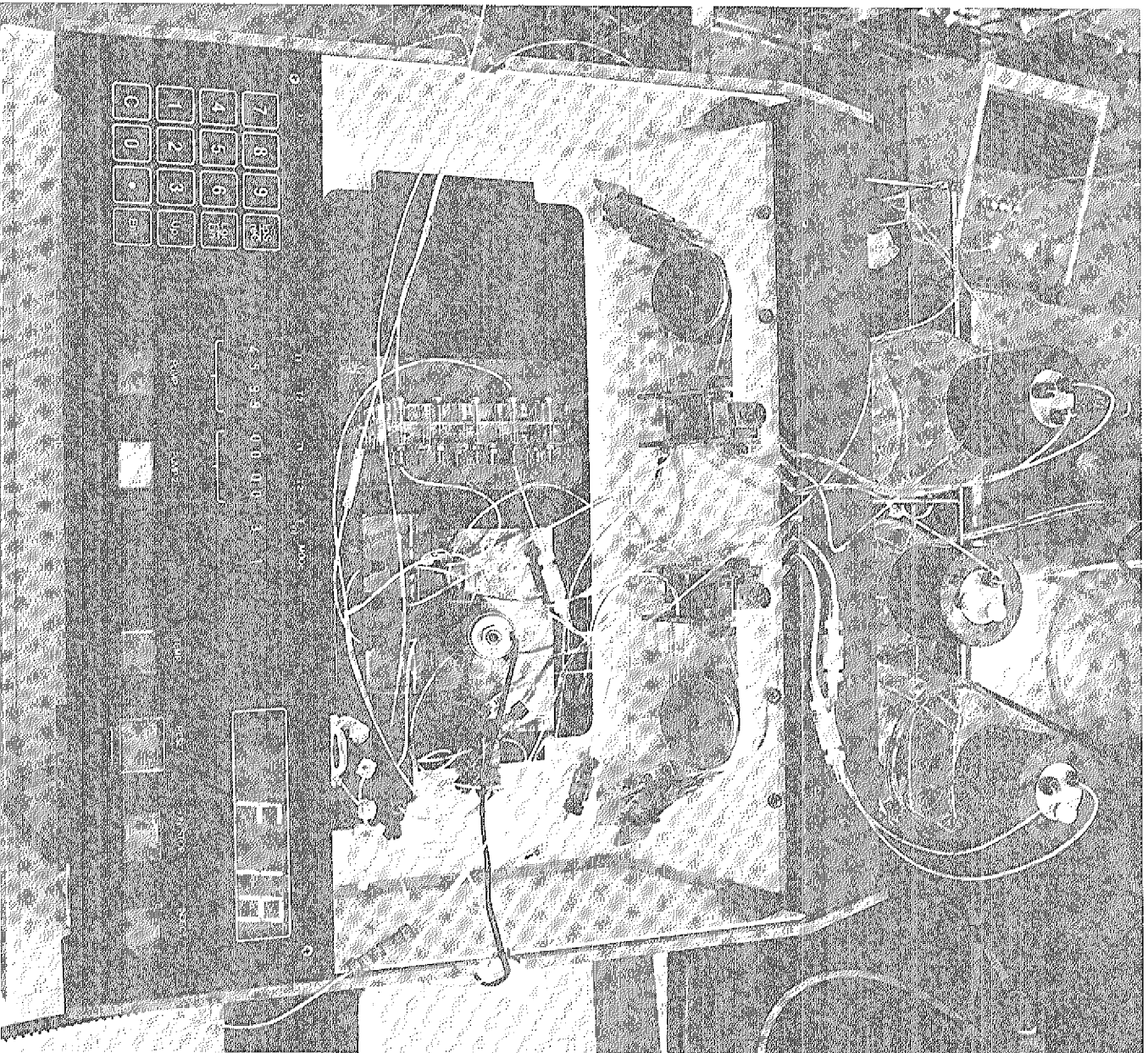


Abb. 20: Ansicht des Flow-Injection-Analyzers:

- Pumpe für die Proteaseanalytik (Mitte, rechts)
- Pumpe für die Glycerinanalytik (Mitte, links)
- Mäanderzelle (Zentrum)
- Manifold (rechts daneben)
- 3/2-Wege-Ventil für Probe/Glycerinstandard (darüber)
- Doppelinjektionsventil (unten, rechts)
- Vorratsflaschen (Hintergrund)

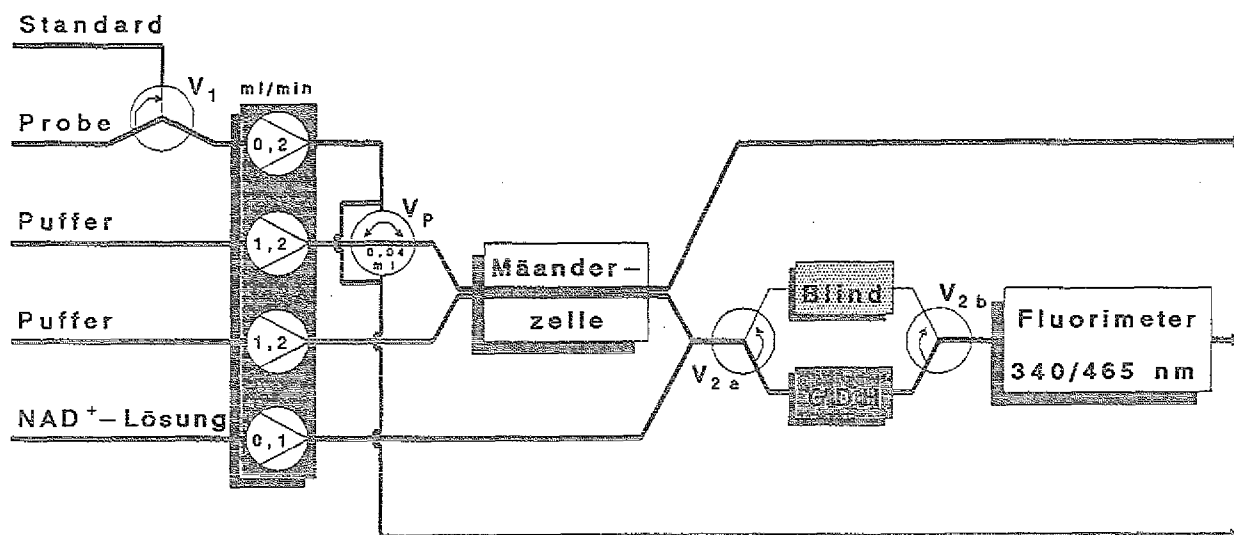


Abb. 21: Fließschema der Flow-Injection-Analyse von Glycerin

Zwei Photos zeigen den Flow-Injection-Analyzer {Abb. 20} (FIastar 5020; Tecator, Rodgau) und seine Umgebung {Abb. 13}. Außerdem gibt ein Fließschema die Online-Analyse von Glycerin wieder {Abb. 21}:

Über ein Injektionsventil gelangte 40 μ l Probefiltrat oder Glycerinstandard in einen Pufferträgerstrom, der zur Abtrennung von Protease und anderen höhermolekularen Substanzen einer Mäanderdialysezelle zugeführt wurde. Über eine Cellulosemembran mit einem cut off von 10000 g/mol (Thomapor-Dialysierfolien für Mäanderzellen; Reichelt, Heidelberg) diffundierten niedermolekulare Stoffe wie z. B. Glycerin in einen parallelen Pufferstrom, der ebenfalls einen Flow von 1,2 ml/min aufwies. An einem Manifold wurde das Dialysat mit 0,1 ml/h NAD^+ -Lösung angereichert. Das Gemisch aus Puffer, Substrat und Coenzym durchströmte eine mit immobilisierter Glycerin-Dehydrogenase (Glycerinwert) oder eine mit α -Aminopropyl-CPG (Blindwert) gefüllte Säule. Das NADH -Signal wurde von einem Fluoreszenzmonitor (Type F-1050; Merck-Hitachi, Darmstadt) in einer 12 μ l großen Durchflußküvette bei 340/465 nm erfaßt.

Ein Analysenzyklus dauerte 10 min und umfaßte drei Läufe. Zunächst wurde Kulturfiltrat injiziert. Da das Maximum der NADH -Fluoreszenz nur zum Teil aus der Umsetzung von Glycerin in der GDH-Säule resultierte, mußte im nächsten Lauf der Blindwert der Probe bestimmt und vom 1. Ergebnis subtrahiert werden. Hieraus ergab sich im Vergleich mit der nachfolgenden Rekalibrierung mit Glycerinstandard, die durch das Fehlen einer Eigenfluoreszenz nur eine Messung benötigte, die Konzentration im Kulturfiltrat.

Die Bedienung des Flow-Injection-Analyzers und der magnetischen 3/2-Wege-Teflon-Membranventile (Latek, Eppelheim) erfolgte über rechnergesteuerte Relais [Kap. 3-14]. Allerdings nahm das Meßgerät im Schnitt einmal alle 50 Läufe das Steuersignal zur Injektion von

Probefiltrat oder Glycerinstandard nicht an. Zur Elimination der daraus resultierenden Fehlmessungen wurde eine Ausgleichsgerade berechnet, die die vier letzten Werte mit steigender Gewichtung berücksichtigte. Lieferte die Glycerinanalyse einen negativen Wert, so wurde die Messung durch den Erwartungswert ersetzt.

Dieses Signal diente einen ID-Kompensationsregler [Kap. 3-15] zur Nachdosierung von Glycerin (Watson-Marlow-Schlauchpumpe 101 U/R, 32 Upm; Verder, Düsseldorf).

Der 1972 eingeführten Fließinjektionsanalyse [72] genügen geringe Teilreaktionen, da die Umsatzrate vom Gehalt der Reaktanden abhängt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Glycerinanalyse ließ sich durch Eichung des Fluoreszenzsignals mit NADH-Standard bestimmen, da sich aus dem freien Säulenvolumen und dem Flow eine Kontaktzeit der injizierten Probe mit dem Enzym von 4,2 s berechnen ließ. Die Raten und die aus den Eichkurven für Glycerin und NAD^+ abgeleiteten Konstanten beziehen sich allerdings auf die Konzentration der eingespritzten Probe! Wegen der relativ hohen halbmaximalen Sättigungskonstanten des Michaelis-Menten-Modells existierte für Glycerin bis 100 mM {Abb. 22} und umgekehrt auch für NAD^+ bis 20 mM {Abb. 23} ein nahezu linearer Meßbereich:

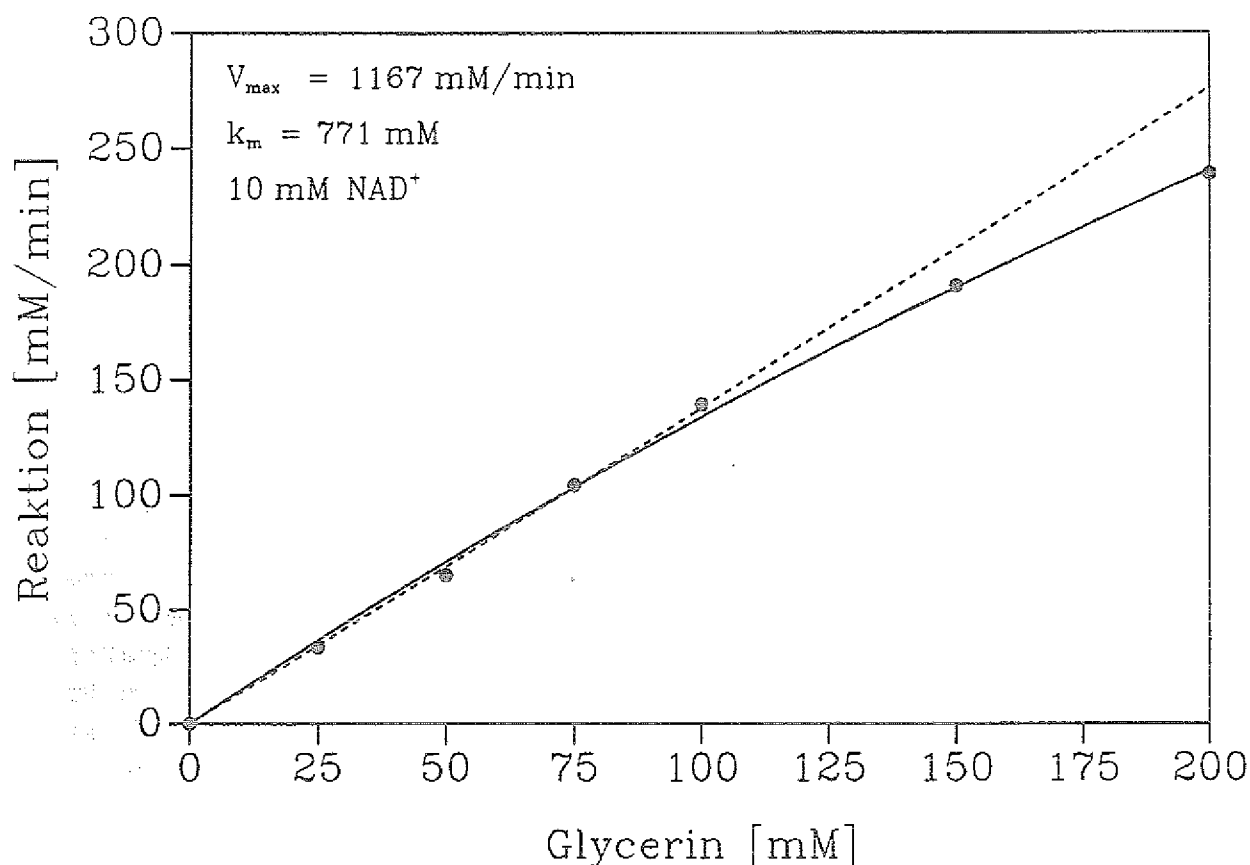


Abb. 22: Flow-Injection-Analysis von Glycerin: Substrateinfluß [nach 71]

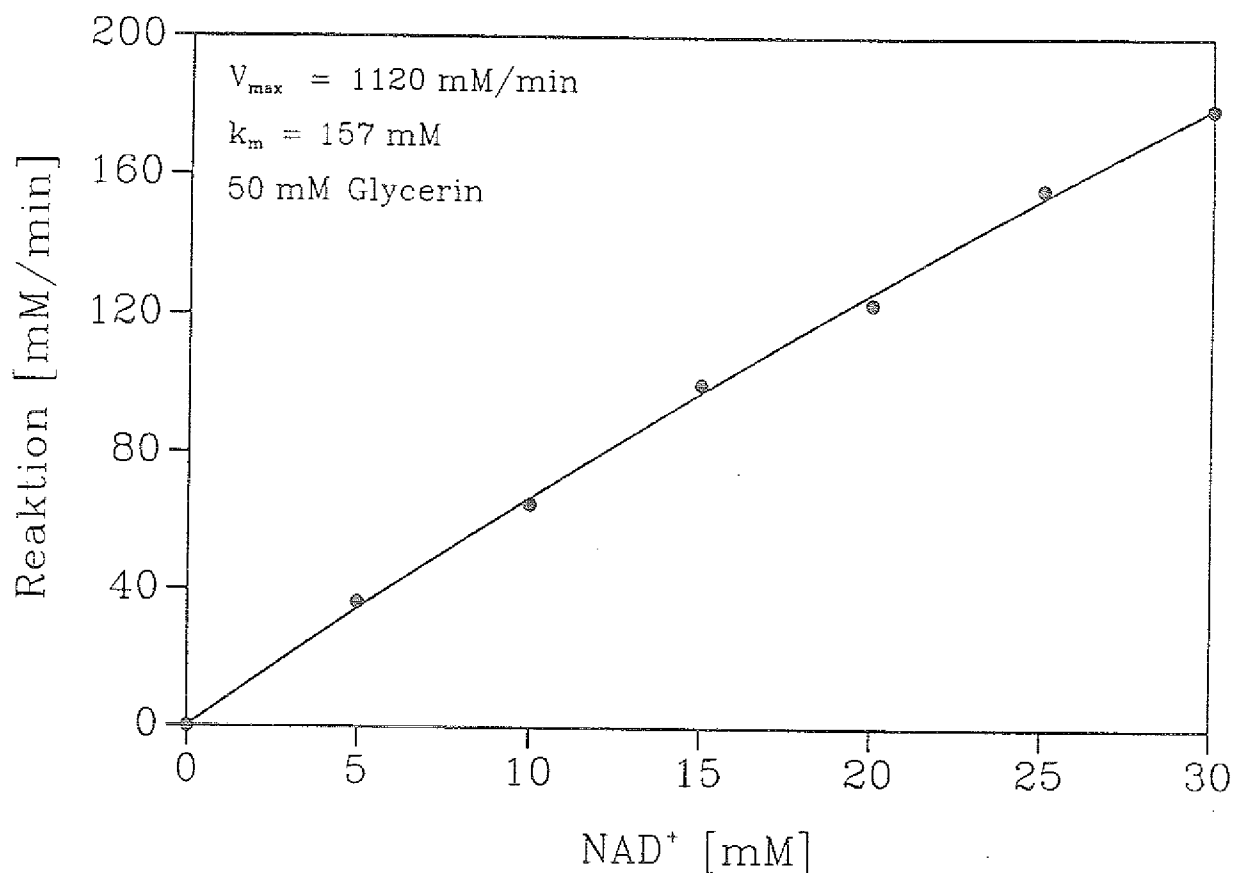


Abb. 23: Flow-Injection-Analyse von Glycerin: Coenzymeinfluß [nach 71]

3-12 Protease-Messung

3-12-1 Offline-Messungen

Wegen der Vielzahl unterschiedlicher Proteasen wurden mehrere Analysenmethoden entwickelt. Häufig wird die proteolytische Aktivität der Enzymprobe direkt durch die Hydrolyse eines Peptids bestimmt [94]. Für eine gute Reproduzierbarkeit wird ein wohldefiniertes lösliches Peptidsubstrat benötigt. Verwendung finden natürliche Stoffe (z. B. Hämoglobin [1], Casein [48]), markierte natürliche Substanzen (z. B. Azo [49,57,59,66,82], Remazol-Brilliant-Blau [70], Indigo-Carmin und Kongo-Rot [61] farbstoffgekoppelte Proteine oder mit ^3H [11] bzw. ^{14}C [26] Isotopen gelabelte Peptide) oder synthetische Peptide. Nach Inkubation mit der Protease wird meist das verbleibende Protein mit Trichloressigsäure ausgefällt. Im Überstand wird der Gehalt an freigesetztem Marker oder entstandenen Aminosäuren gemessen. Besonders leicht ist der Nachweis von Tyrosin mit phenolischem Folinreagenz bei 578 nm [23] oder direkt bei 275 nm [32]. Der sogenannte Anson-Test [1] dient wegen seiner Universalität als Referenz für andere Proteaseassays [85]:

Reagenzien:Tyrosin-Standard:

5 mM Tyrosin (Merck) in 50 mM Salzsäure lösen

Casein-Lösung:

2 % Casein nach Hammersten (Merck)
in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 lösen

Trichloressigsäure:

300 mM Trichloressigsäure (Merck) in bidest. H₂O lösen

Testansatz:

2,5 ml Caseinlösung auf 37°C temperiert mit
0,2 ml Probe oder Tyrosin-Standard
mischen und bei 37°C 10 min inkubieren.

5,0 ml Trichloressigsäure
zugeben, ausgefallenes Protein abzentrifugieren und im Überstand
Tyrosin bei 275 nm messen. Eine Anson-Unit wird als die Enzymmenge
definiert, die 1 µM Tyrosin je Minute Inkubationszeit freisetzt.

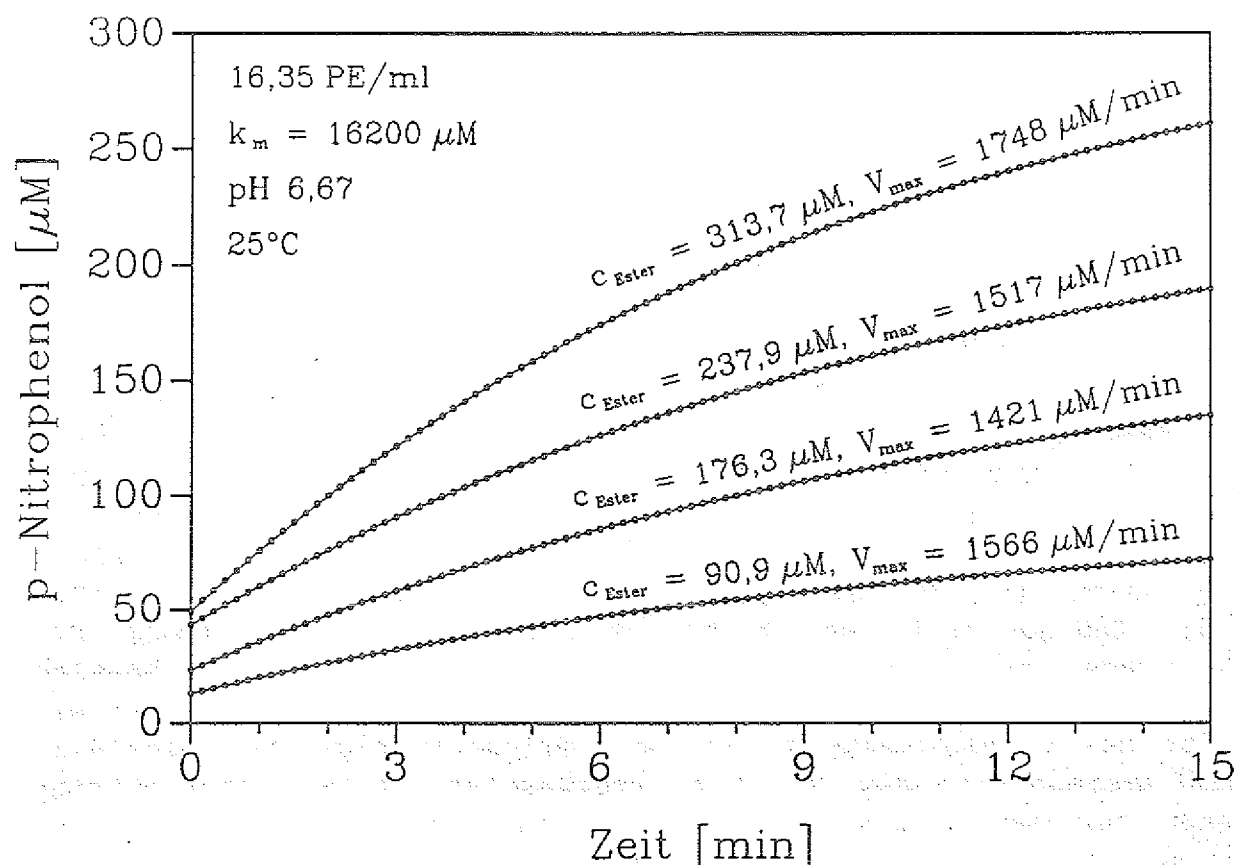
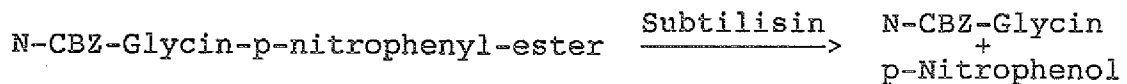


Abb. 24: Zeitverlauf der Esterolyse durch Subtilisin (S. 55)

Wie eine Vielzahl proteolytischer Enzyme besitzen alkalische Serinproteasen auch esterolytische Aktivität. Somit können zur Analyse wohldefinierte Ester als Substrate eingesetzt werden. Die Säure- oder Alkoholgruppe des Esters kann einen Farbstoff oder eine radioaktive Markierung tragen, mit deren Hilfe sich die Esterolysegeschwindigkeit leicht verfolgen läßt. Alternativ dazu läßt sich die freigesetzte Säure durch Laugetitration bestimmen [3,64]. Der hier angewandte Test beruhte auf der enzymatischen Hydrolyse von N-Carbobenzoxy-glycin-p-nitrophenyl-ester [88]:



Reagenzien:

Acetonpuffer:

50 mmol Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Merck) in
700 ml bidest. H_2O (Endvolumen)

lösen und mit Salzsäure pH 6 einstellen. Mit Aceton (Merck) auf 1000 ml auffüllen. Danach lag ein pH-Wert von 6,67 vor.

Der Acetonanteil wurde benötigt, um N-CBZ-Glycin-p-nitrophenyl-ester und p-Nitrophenol in Lösung zu halten.

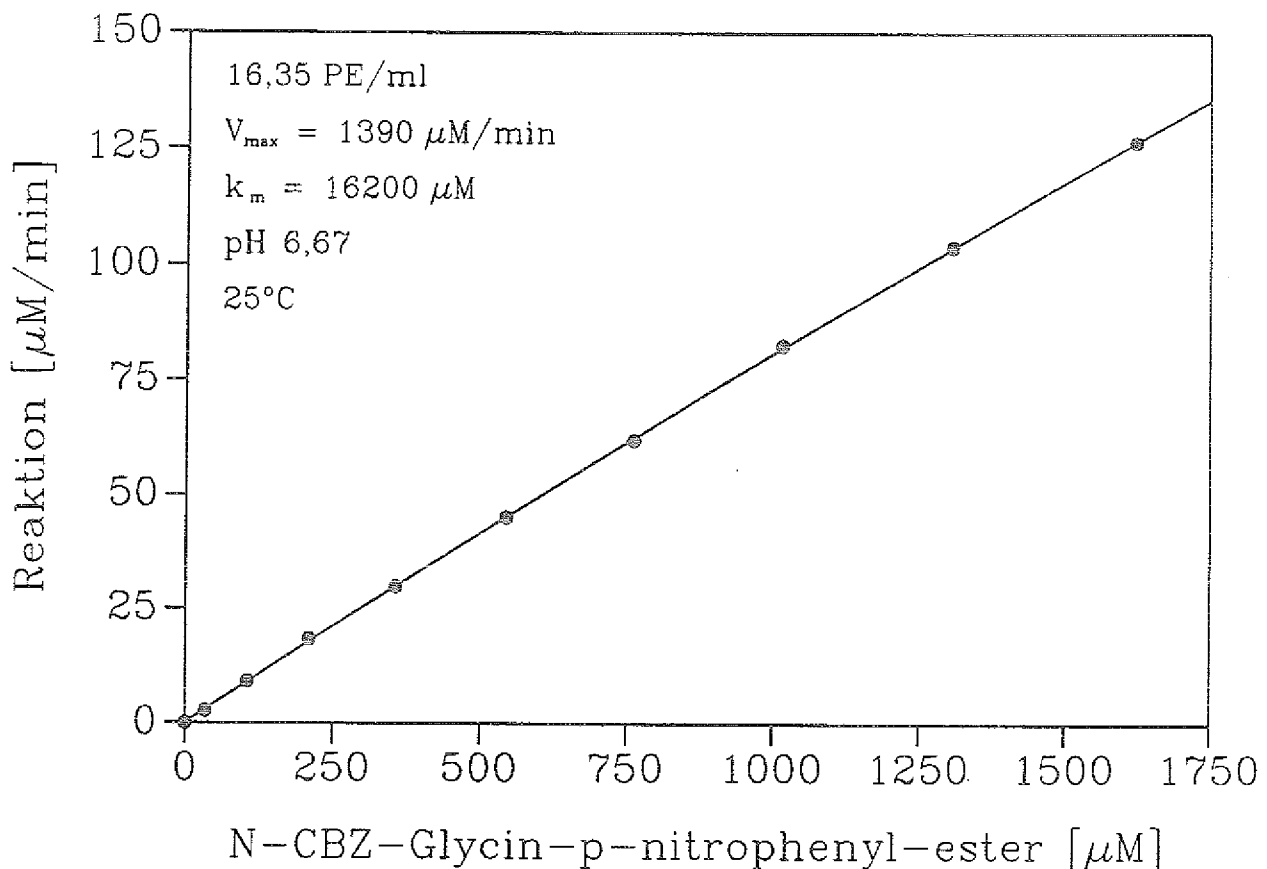


Abb. 25: Substrateinfluf der Esterolyse durch Subtilisin (S. 55)

Esterlösung:

2 g/l N-CBZ-Glycin-p-nitrophenyl-ester (Sigma)
in Aceton lösen

Maxatase-Standard:

2 g Maxatase (Gist-Brocades, Delft, Niederlande)
mit einer garantierten proteolytischen Aktivität von 509.000 DU/g (Delft-Units des Herstellers [27]) wurden in 300 ml 50 mM NaCl-Lösung suspendiert. Nichtlösliche Stoffe wurden abzentrifugiert. Die Aktivität des Überstandes war als 800 Proteaseeinheiten je Milliliter (PE/ml) definiert, wobei 1 Anson-Unit 348 PE/ml entsprach. Der Standard konnte bei -20°C stabil gelagert werden.

Testansatz:

1000 µl Acetonpuffer
100 µl Esterlösung
in einer Küvette auf 25°C temperieren

50 µl Probe oder Maxatase-Standard
zugeben, mischen und während einer Minute über die Extinktionszunahme bei 340 nm die Freisetzung von p-Nitrophenol bestimmen.

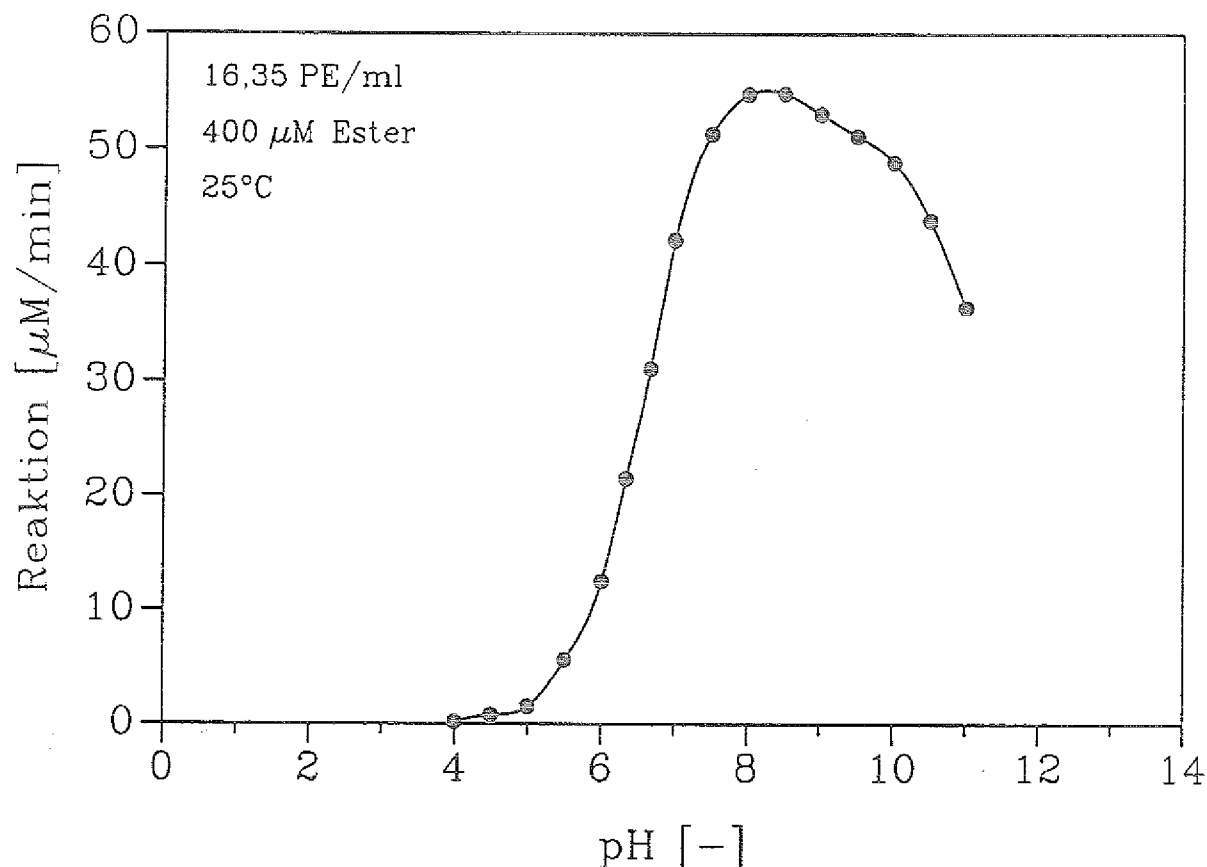


Abb. 26: pH-Einfluß der Esterolyse durch Subtilisin (S. 56)

Zum Vergleich wurde aus einer Fermentationsprobe Subtilisin Carlsberg mit Aceton fraktioniert ausgefällt [Kap. 4-2]. Das Enzym wurde durch Gelfiltration an einer Sephadex G-25 Säule (Pharmacia-LKB, Freiburg) mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 von autolytischen Peptiden befreit [63]. Das reine Subtilisin Carlsberg besaß eine Aktivität von 4443 PE/mg [8].

Der Zeitverlauf der Hydrolyse unterschiedlicher Ester Mengen ließ sich gut mit dem Michaelis-Menten-Modell beschreiben {Abb. 24}. Zur Optimierung von Parametern analoger und differenzieller Modellfunktionen wurde das FORTRAN-Programm »OPTI« entwickelt. Ableitungen, wie hier die Geschwindigkeitsgleichung, wurden numerisch nach dem Runge-Kutta-Verfahren integriert [96], da sie erst als Integralruns der nichtlinearen Regression zugänglich waren. Als Anpassungsparameter dienten die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, der bis Meßbeginn entstandene p-Nitrophenolgehalt und zum Ausgleich von Pipetierfehlern die eingesetzte Esterkonzentration. Die halbmaximale Sättigungskonstante wurde vom Einfluß des Estergehaltes auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit {Abb. 25} übernommen, da der Wert ein Mehrfaches über dem einsetzbaren Estergehalt lag und die geringen Abweichungen bei der Anpassung wenig aussagekräftig

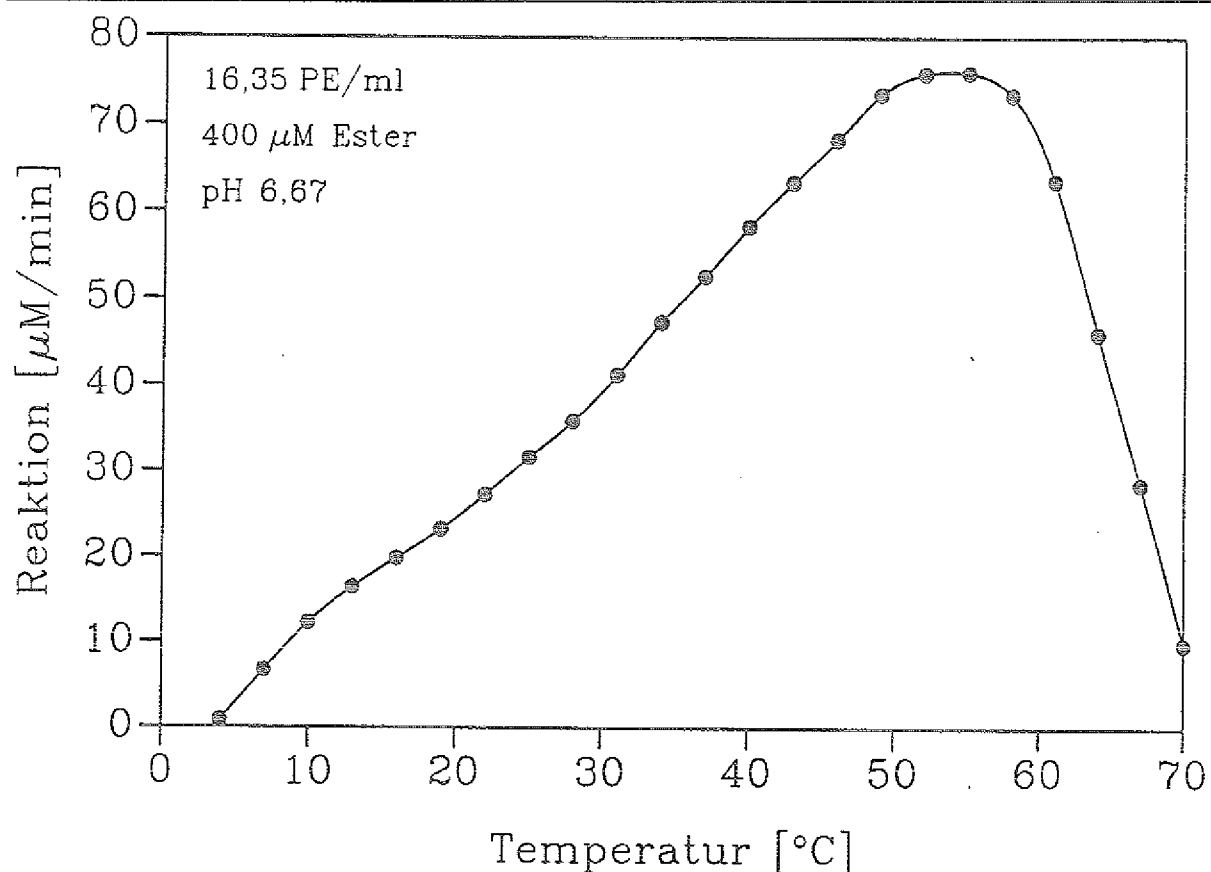


Abb. 27: Temperatureinfluß der Esterolyse durch Subtilisin unter Testbedingungen (S. 56)

waren. Dies war notwendig, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit vergleichbar zu halten. Beide Bestimmungsmethoden stimmten hierin gut überein. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bzw. die Proteaseaktivität konnte ohne großen Fehler während der ersten Minute mit einem linearen Ansatz bestimmt werden {Abb. 24}.

Subtilisin besitzt als in Waschmitteln verwendete alkalische Serinprotease Aktivitätsmaxima bei pH 8 - 10 {Abb. 26} und bei 50 - 60°C {Abb. 27}. Da die Testbedingungen nicht optimal waren, führten schon geringe Abweichungen der Temperatur und des pH-Wertes zu empfindlichen Änderungen der enzymatischen Esterolysegeschwindigkeit. Abweichungen im Estergehalt und im pH-Wert wurden durch den Bezug auf den Maxatase-Standard eliminiert. Entscheidend für die Exaktheit des Verfahrens war jedoch die Genauigkeit beim Pipettieren und beim Temperieren auf 25°C.

3-12-2 Online-Messung

Bislang sind nur wenige Methoden zur Online-Messung des Proteasegehaltes verwirklicht worden. Sie beruhen auf der proteolytischen Spaltung von Remazol-Blau-markiertem [45,51] oder natürlichem [45] Casein. Bei Verwendung eines natürlichen Proteins ist ein Filtrationsschritt zur Abtrennung von nichtumgesetztem Substrat unbedingt erforderlich. Ein vollständiger Analysenzyklus dauert wegen der relativ langsamen Hydrolyse fast eine halbe Stunde.

Die Bestimmung der esterolytischen Aktivität der Protease mit N-CBZ-Glycin-p-nitrophenyl-ester war mittels Fließinjektionsanalyse im Rhythmus von 5 min durchführbar. Die Methode lieferte somit ein echtes quasikontinuierliches Fermentationssignal. Die Esterolyse wurde parallel zur Glycerinmessung im selben Flow-Injection-Analyzer durchgeführt {Abb. 13, 28}:

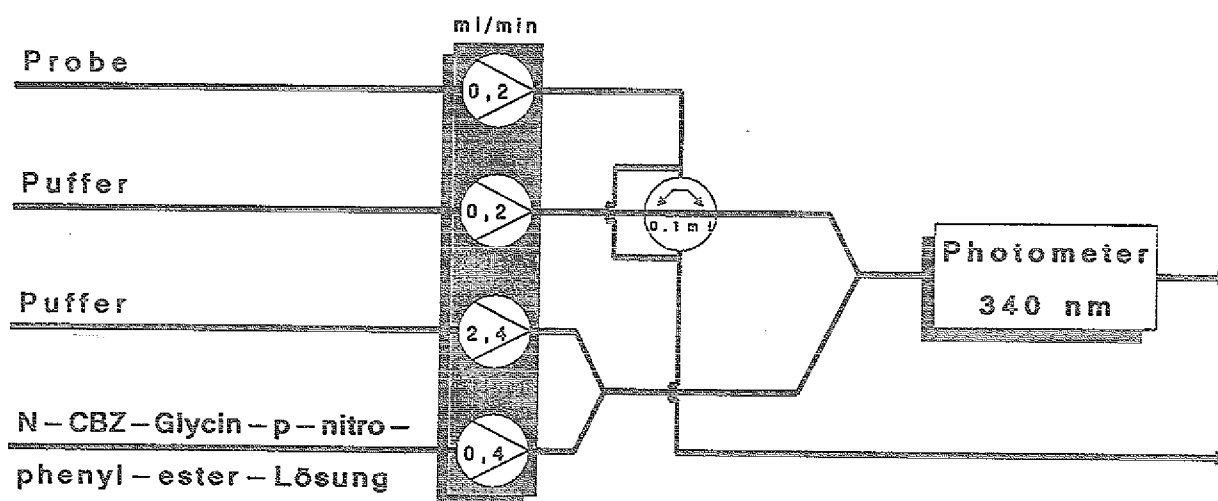


Abb. 28: Fließschema der Flow-Injection-Analyse von Protease

Für die Fließinjektionsanalyse wurden die Reagenzien des Offline-Tests verwendet. Das Fließschema wurde so konzipiert, daß es der Offline-Bestimmung möglichst nahe kam. 2,4 ml/min Acetonpuffer wurden in einem Manifold mit 0,4 ml/min Esterlösung vermischt. In diesen Strom floß an einem weiteren Manifold mit einer Rate von 0,2 ml/min weiterer Acetonpuffer ein, in dessen Strom über ein Injektionsventil 100 µl Probefiltrat eingeschleust wurden. Der Strom mit der Probe wurde in eine 100 µl große, auf 25°C thermostatisierte Durchflußküvette mit einer Schichtdicke von 2 mm gefördert und verweilte dort 99 s. Während der Stopzeit wurde nach 5 s bei 340 nm (Zweistrahl-Photometer UV-160; Shimadzu, Kyoto, Japan) bis zu einer Extinktion von 1,3 maximal 90 s lang die Freisetzung von p-Nitrophenol durch die Esterhydrolyse verfolgt. Die Extinktionssteigerung wurde auf die Offline-Werte geeicht.

Das Fördern acetonhaltiger Lösungen mit peristaltischen Pumpen war problematisch. So ließen sich die Manifoldschläuche aus Marprene (Verder, Düsseldorf) erst einsetzen, nachdem die Weichmacher mit Aceton aus dem Schlauchmaterial herausgelöst waren. Trotz dieser Konditionierung veränderten sich die Schlaucheigenschaften während der Online-Analyse stark. Zumindest die acetonische Esterlösung sollte deshalb mit einer inerten Kolbenpumpe gefördert werden.

3-13 Biomasse-Bestimmung

3-13-1 Trockengewichts-Bestimmung

30 ml Fermenterprobe wurden 10 min bei 15000 Upm zentrifugiert (Kühlzentrifuge J2-21/JA-20; Beckmann, München). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Zentrifugenröhrchen mit dem Feststoffanteil wurde bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Aus der Gewichts Differenz zum Leerröhrchen ließ sich die Trockenmasse in g/l berechnen. Diese war größer als die Biotrockenmasse, da auch andere Feststoffpartikel abzentrifugiert wurden. So bildete *Bacillus licheniformis* größere Mengen Schleim und Pulcherrimin, die ebenfalls erfaßt wurden.

3-13-2 Inline-Messung der optischen Dichte

Mit einer Inline-Trübungssonde (Meßumformer MEX-2, Sonde TSS 30/10; BTG früher EUR-Control, Bochum) wurde die optische Dichte der Kulturbrühe bestimmt. Die in situ sterilisierbare Elektrode besaß zwei Photozellen und zwei Leuchtdioden für polychromatisches Licht. Je eine Photozelle und eine Lichtquelle bildeten eine Gruppe, die zur anderen Gruppe spiegelbildlich im Abstand von 1 cm angeordnet war. Im Wechsel der Leuchtdioden ergaben sich jeweils zwei Lichtwege für die Trübung und die Turbidizität, das indirekt auf die Photozelle fallende Streulicht. Der Meßverstärker berech-

nete hieraus das Trübungssignal, das auf die Trockenmassebestimmung eingeeicht wurde. Da Fremdlicht die Messung störte, wurde der Fermenter mit dem Splitterschutz abgedunkelt {Abb. 9, 13}.

Die Trübung wird nicht nur von der Biomasse verursacht. Besonders störend sind Gasblasen. Bei einer Zunahme der Rührerdrehzahl oder der Belüftung, um einem Absinken des pO_2 -Wertes unter sein Soll zu verhindern, wächst die Phasengrenzfläche. Das Licht wird stärker gestreut und täuscht eine höhere Biomassekonzentration vor.

3-14 Prozeßleitsystem

Als Prozeßleitsystem diente das am Institut entwickelte Meßwert-Erfassungs- und Auswerte- System »MEAS«. Dem unter Concurrent-DOS lauffähigen Programm oblag über ein Interface die Kommunikation zwischen dem Personal-Computer (AT 02/03, IBM) und dem aktuellen Versuch. Das nahezu beliebig mit SMP-Peripheriekarten (Siemens) ausbaubare Interface besaß für die Überwachung und Kontrolle der Fermentationen folgende Ausrüstung {Fliebschemata und Photos siehe Abb. 10 - 14}:

- 16 Analog-Eingänge zur Wandlung von analogen Strom- und Spannungssignalen in digitale Meßwerte:
Temperatur, Rührerdrehzahl, Fermenterinnendruck, pH-Wert, Korrekturmittelverbrauch, Sauerstoffsättigung, Trübung, Waage zur Füllstandskontrolle, Ammoniakелеktrode, Photometer zur Proteaseanalyse (Fedbatch), Fluoreszenzmonitor zur Glycerinbestimmung (Fedbatch), Substratzufuhr (kontinuierliche Fermentation)
- 8 Analog-Ausgänge zur Wandlung digitaler Sollwerte für die Stellgrößen in analoge Spannungen oder Stromstärken:
Rührerdrehzahl, Glycerin- und Ammoniumzufuhr (Fedbatch)
- 8 Relais-Ausgänge zum Schalten von Magnetventilen und zur Steuerung des Flow-Injection-Analyzers.
- Userprogramm-Schnittstelle zum Transfer digitaler Daten:
Substratzufuhr (NH_3 -Auxostat)

Es bestehen weitgehende Freiheiten bei der Versuchskonfiguration. Die Meßdaten lassen sich über einen Formelinterpreter zu anderen Größen verrechnen und in Zeitzyklen von 1 s bis 1 h erfassen. Der Formelinterpreter erlaubt auch die Ansteuerung von Peripheriegeräten nach frei programmierbaren Strategien. Die abgespeicherten Daten sind mit einer Pixel-Graphik darstellbar. Präsentationsgraphiken wurden jedoch mit PLOTIT 1.5 (ICS, Frankfurt) erstellt. Zur Übertragung repräsentativer Versuchsdaten ins PLOTIT-Format wurde das vielseitige Datenreduktionsprogramm »DARE« entwickelt.

3-15 Integraler und differentialer Kompensationsregler

Häufig ist es von Nutzen, einzelne Größen eines Fermentationsprozesses zu kontrollieren. Bislang werden hierfür meist analoge Regler mit ihren standardisierten Bausteinen für Proportional-, Integral- und Differential-Verhalten eingesetzt. Vor Beginn einer Fermentation werden für die zu regelnden Größen jeweils Werte für den Verstärkungsfaktor, die Nachstell- und Vorhaltezeit bestimmt. Mit dem Aufwachsen der Kultur verändern sich jedoch die Regelparameter derjenigen Größen, deren Bilanzgleichungen von der Biomasse abhängen. Im allgemeinen handelt es sich hierbei um Eduktkonzentrationen, die einem Fließgleichgewicht aus Konvektion und reaktivem Verbrauch durch die Mikroorganismen unterliegen. Ohne Anpassung der Proportionalfaktoren, der Integrier- und Differenzierzeiten geraten die Eduktkonzentrationen in Regelschwingungen [39]. Ein analoger Regler muß in diesen Fällen mit einem selbstadaptiven Mechanismus zur Anpassung der PID-Faktoren ausgestattet werden.

Als moderne Alternative bieten sich höherwertige Algorithmen an, die von mathematischen Modellvorstellungen ausgehen. Dem Prozeßrechner kommt die Aufgabe eines Beobachters zu, der laufend die Meßdaten zur Identifikation der Modellparameter heranzieht. Darüber hinaus lassen sich mit dieser Methode schwer zugängliche Größen abschätzen. Die Simulation der zukünftigen Entwicklung erlaubt eine optimale Anpassung der Stellgrößen. Dieses relativ aufwendige Konzept besitzt jedoch nur gegenüber solchen Prozessen Gültigkeit, die sich durch das mathematische Modell beschreiben lassen [77].

Eine vom Rechenaufwand wesentlich einfachere und universellere Lösung stellen Kompensationsregler dar, da sie ohne Prozeßanpassung auskommen. Die Formulierung gestaltet sich besonders einfach, wenn die Regelgröße zeitlich äquidistant abgegriffen wird. Das hier angewandte Konzept gleicht Verbrauch und Abweichung vom Sollwert in einem Schritt aus {Abb. 29}. Aus einer vektoriellen Betrachtung lassen sich die beiden folgenden Gleichungen ableiten:

$$c_i = c_{i-1} + Z_{i-1} \cdot dt + R_{i-1}$$

$$c_s = c_i + Z_i \cdot dt + R_{i-1}$$

mit c : Substratkonzentration (Istwert)
 c_s : Sollkonzentration (Sollwert)
 R : Substratverbrauch (Störgröße)
 Z : Substratzufuhr (Stellgröße)
 dt : Zeitdifferenz zwischen zwei Messungen i

Beide Gleichungen lassen sich so verknüpfen, daß der unbekannte Reaktionsterm R_{i-1} eliminiert wird. Die Auflösung nach dem neuen Stellwert Z_i liefert die Formel eines integralen differentialen Kompensationsreglers, dessen Regelparameter den Wert 1 besitzen:

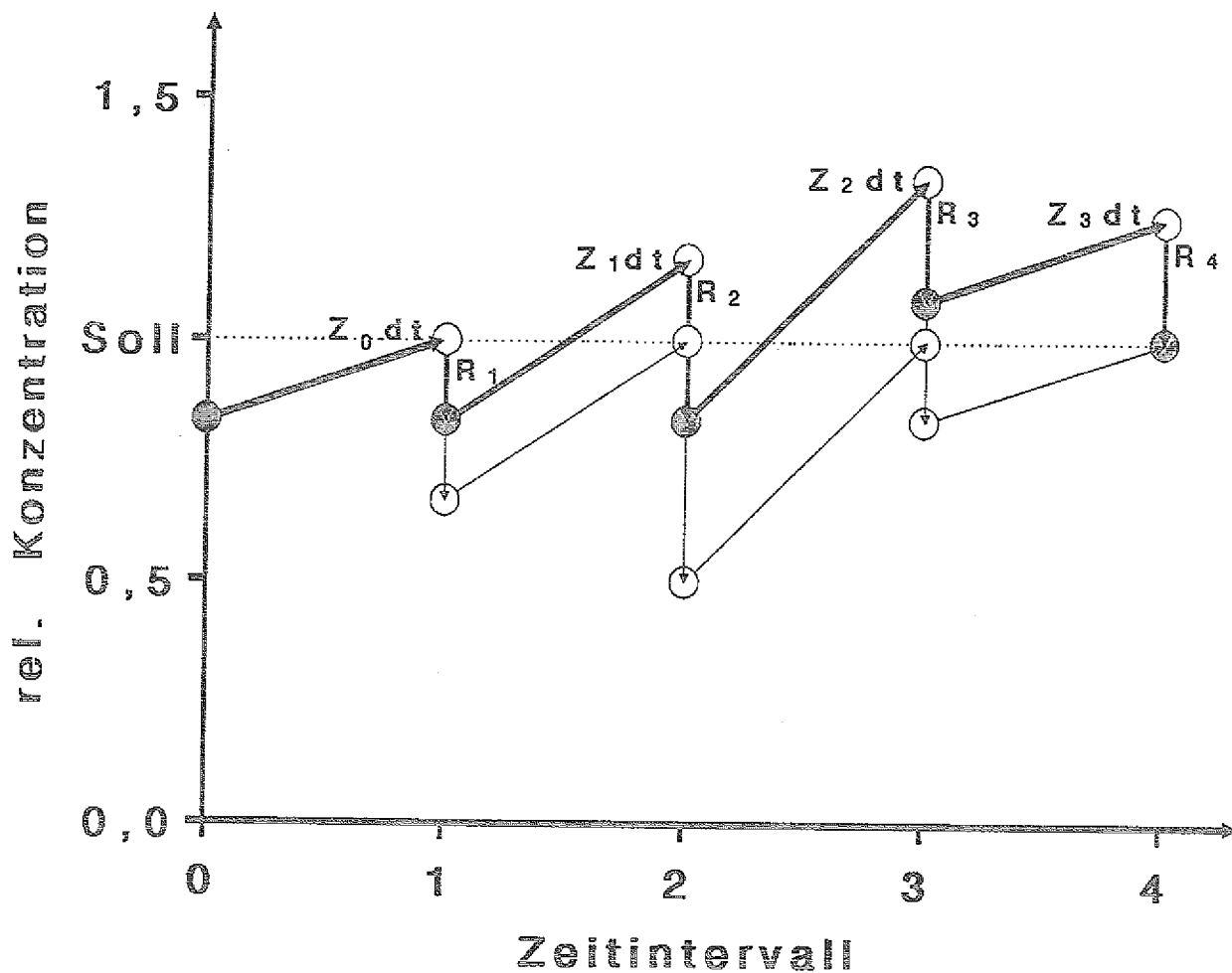


Abb. 29: Schema des integralen differentialen Kompensationsreglers

$$Z_i = Z_{i-1} + \frac{(c_s - c_i) + (c_{i-1} - c_i)}{dt}$$

Die langfristige Anpassung an den Sollwert erfolgt über das integrale Glied $(c_s - c_i)/dt$, während der wie eine Feder wirkende differentiale Term $(c_{i-1} - c_i)/dt$ Veränderungen entgegenwirkt.

In einer Fedbatchsimulation [Kap. 2-7] wurde untersucht, inwiefern der Algorithmus von der Intervallbreite eines Regulationszyklus und eventuellen Totzeiten bei der Messung beeinflusst wird. Durch Nachdosierung von Ammonium wurde ein Soll von 0,4 g/l angestrebt:

Tritt keine Meßverzögerung auf, so erfolgt die Nachdosierung schon nach dem 3. Intervall ohne Schwingungen. Die Dauer eines Regulationszyklus besitzt nur Einfluß darauf, wie grob die Schritte sind, mit denen die Ammoniumzufuhr dem Idealprofil der extended culture angepaßt wird {Abb. 30a,b}.

Der Algorithmus reagiert allerdings sehr empfindlich auf Meßzeitverzögerungen. Die Folge sind Dosierspitzen, denen eine längere

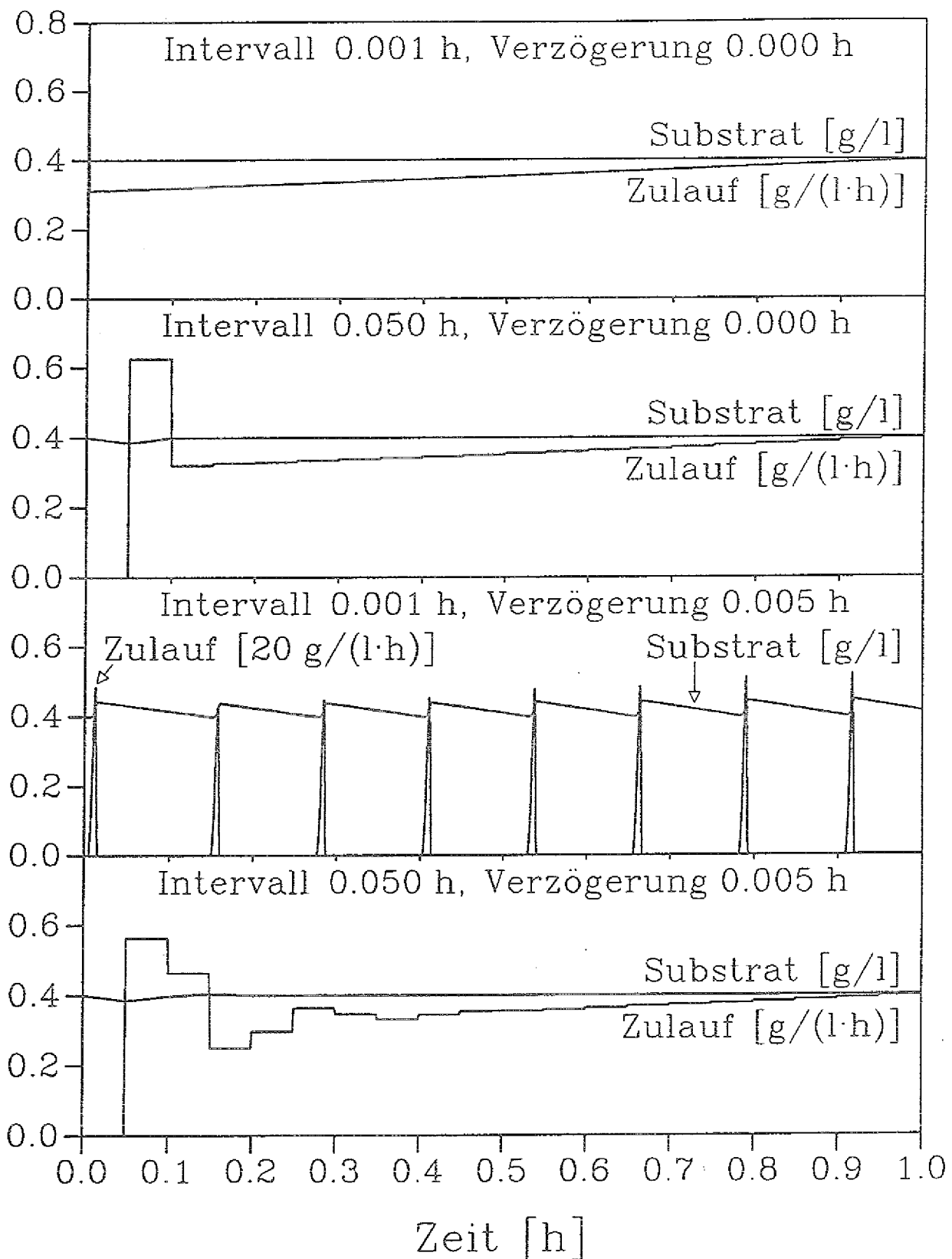


Abb. 30: Fedbatchsimulation zur Nachdosierung von Ammonium mit Hilfe des ID-Kompensationsreglers

Phase folgt, bis der Ammoniumüberschuß wieder abgebaut ist {Abb. 30c, zwanzigfach konzentrierter Zulauf!}. Regelschwingungen lassen sich jedoch vermeiden, wenn die Dauer des Anpassungszyklus die Totzeit der Analyse um das Dreifache übersteigt {Abb. 30d}.

Derartige Effekte traten auch in der Fermentationspraxis auf:

Der Sauerstoffpartialdruck der Kulturbrühe wurde mit einer Inline- pO_2 -Elektrode nahezu verzögerungsfrei [Kap. 3-8] erfaßt und alle 3 s abgespeichert. Der ID-Kompensationsregler arbeitete im gleichen Rhythmus, griff aber für sein differentielles Glied gleitend auf einen vor einer Minute gemessenen Wert zurück und besaß somit eine Zyklusdauer von 1 min. Als äquivalentes Stellglied für die Sauerstoffzufuhr diente in guter Näherung die Rührerdrehzahl. Durch deren Anpassung wurde ein Soll von 5 % Sauerstoffsättigung angestrebt. Die Rührung wurde allerdings auf minimal 300 Upm begrenzt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Die Drehzahlregelung setzte ein, wenn mit dem Aufwachsen der Kultur der Sauerstoffpartialdruck auf den Sollwert absank. In der Folge ließ sich der pO_2 -Wert mit Ausnahme einer kurzfristigen Störung, in der Glycerinmangel herrschte, konstant bei 5 % halten {Abb. 31}:

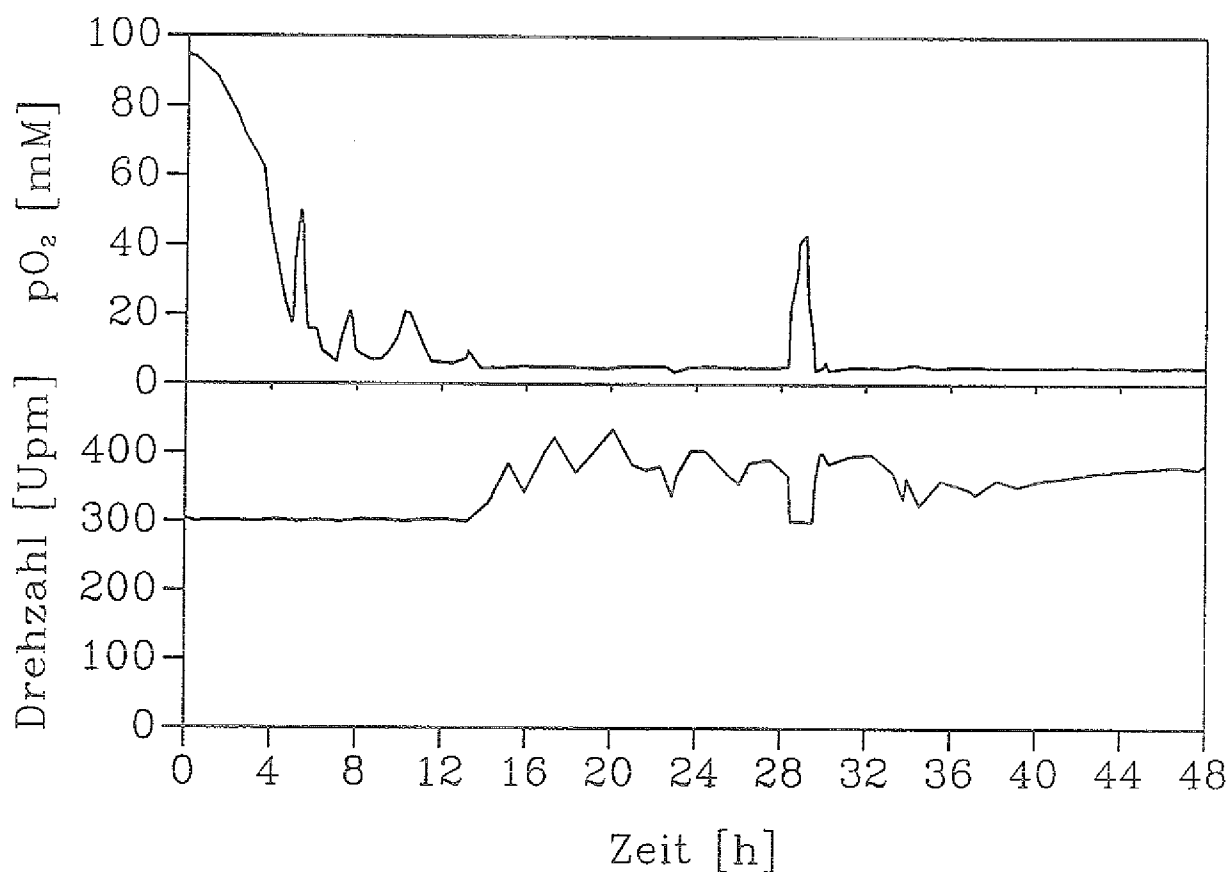


Abb. 31: Drehzahlregelung des pO_2 -Wertes mit Hilfe des ID-Kompensationsreglers

Für den Ammoniumgehalt der Fermentationslösung stand ebenfalls ein Online-Signal zur Verfügung. Die Meßwerterfassung und der ID-Kompensationsregler zur Nachdosierung von Ammonium griffen daher auf dieselben Zykluszeiten zurück wie bei der pO_2 -Messung und -Regelung. Allerdings fand die Ammoniumanalyse nach einem Filtrationsschritt an einer gassensitiven Ammoniak elektrode außerhalb des Bioreaktors statt [Kap. 3-10]. Der Meßprozeß war mit einer Totzeit von etwa 10 min behaftet. Da während der praktischen Arbeiten die Simulationsergebnisse des ID-Kompensationsreglers {Abb. 30} noch nicht vorlagen, wurde die Dauer eines Regulationszyklus nicht verlängert. Das ungünstig kleine Verhältnis zur Meßzeitverzögerung führte wie im Modell zu Pulsen bei der Zufuhr und im Gehalt von Ammonium {Abb. 32}:

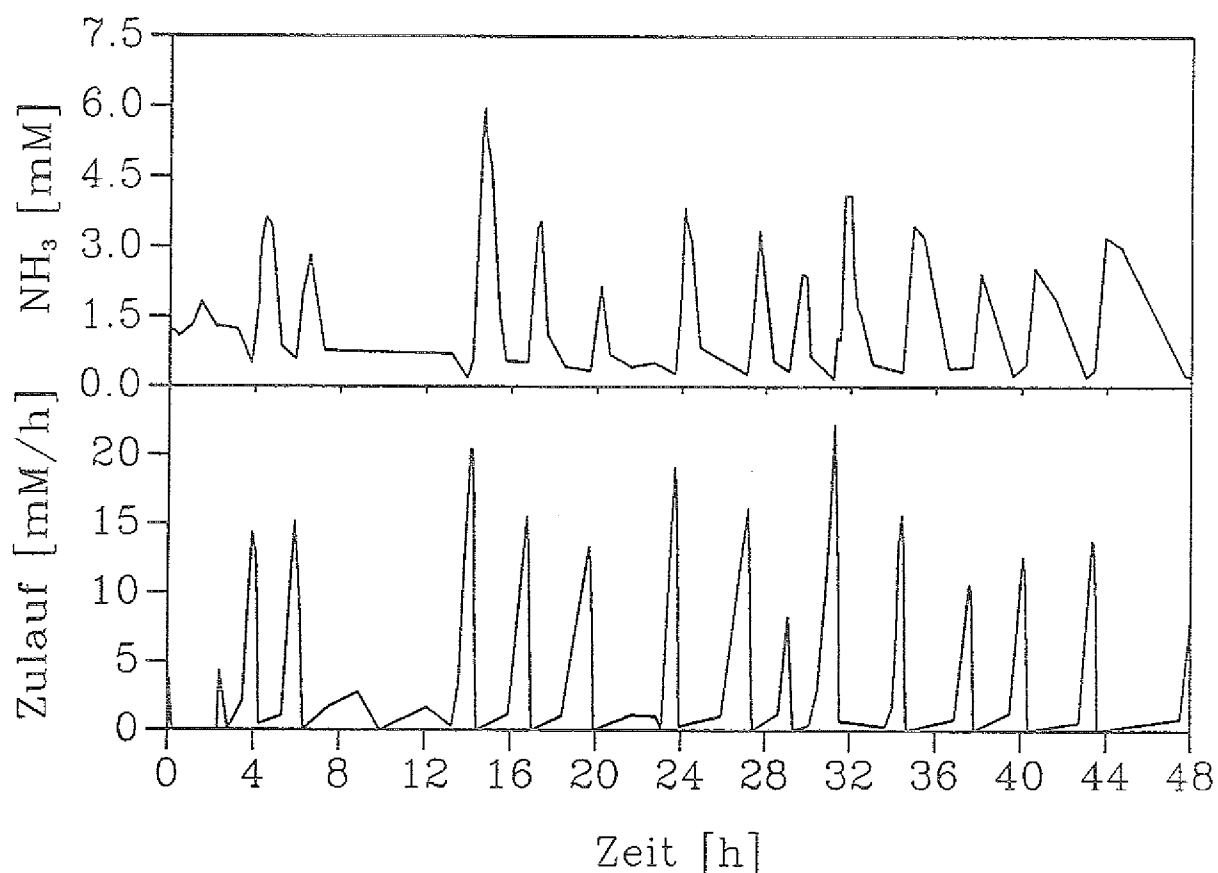


Abb. 32: Nachdosierung vom Ammonium mit Hilfe des ID-Kompensationsreglers

Die externe Bestimmung der Glycerinkonzentration im Kulturfiltrat wies eine ähnliche Verzögerung wie die Ammoniummessung auf. Allerdings nahm die Fließinjektionsanalyse von Glycerin eine zehnmünütige Meßdauer in Anspruch [Kap. 3-11]. Die Intervallbreite des ID-Kompensationsreglers besaß damit zwangsweise etwa die Dauer der Totzeit. Dadurch bildeten sich Regelschwingungen mit weiten Amplituden für den Gehalt und die Zufuhr von Glycerin aus {Abb. 33}:

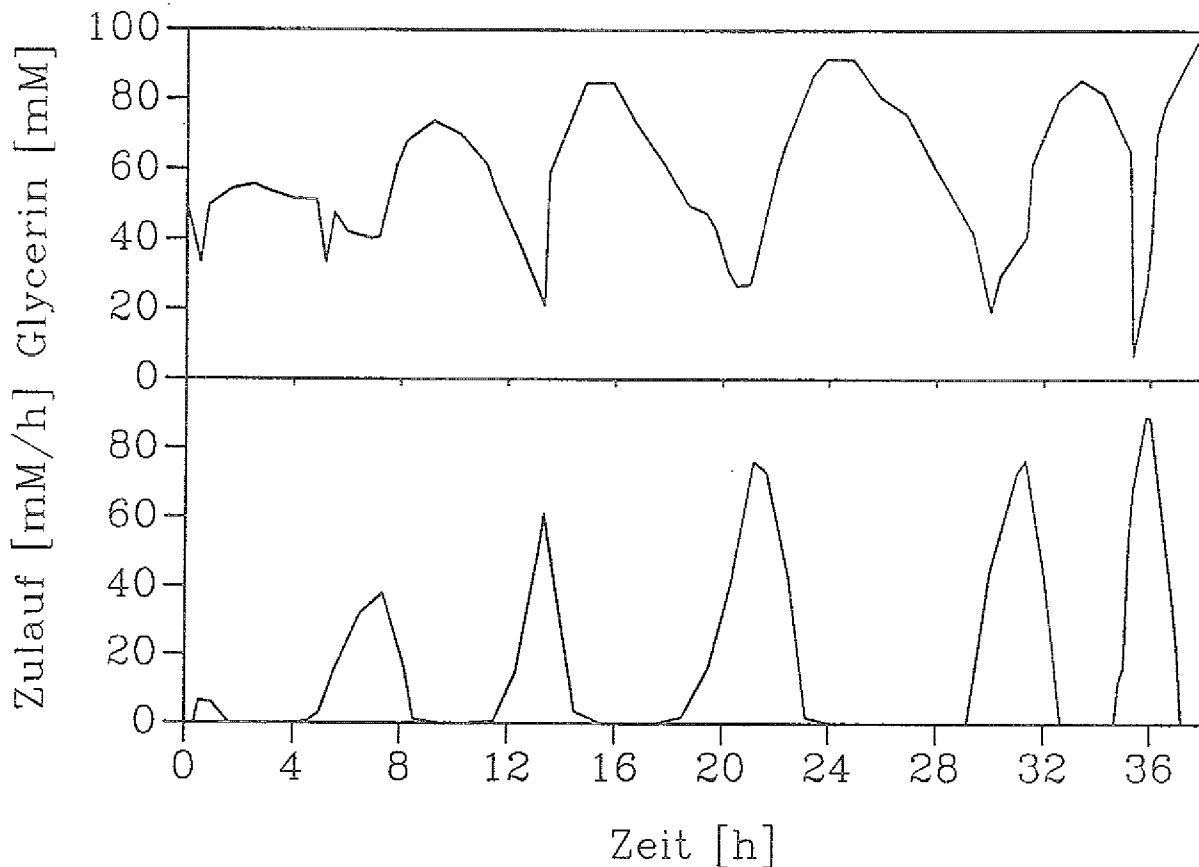


Abb. 33: Nachdosierung von Glycerin mit Hilfe des ID-Kompensationsreglers

Somit deutete auch die Praxis an, daß selbst totzeitbehaftete Prozesse vom ID-Kompensationsregler stabil gesteuert werden können. Die Intervalldauer eines Anpassungszyklus muß dazu deutlich (dreifach) länger als die Meßzeitverzögerung dauern.

4-0 Fermentationsergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen zur Gewinnung der alkalischen Serinprotease Subtilisin Carlsberg wurden mit dem Hochleistungsproduzenten *Bacillus licheniformis* DSM 641 durchgeführt. Der oligosporogene Stamm wurde nach klassischen Verfahren isoliert. Mitte der siebziger Jahre wurde er in der industriellen Produktion eingesetzt.

In den Fermentationsversuchen wurde ein vorgegebenes komplexes Proteinmedium und ein neu entwickeltes synthetisches Glycerinmedium verwendet. In komplexen Medien lassen sich meist bessere Fermentationsergebnisse erzielen [67]. Zudem liegen die Substratkosten häufig niedriger. Im speziellen Fall der Proteasegewinnung werden jedoch relativ teure proteinhaltige Komponenten (Casein) verwendet, so daß sich auch ein synthetisches Medium rechnen kann.

4-1 Fermentationen mit dem komplexen Proteinmedium

4-1-1 Stammhaltung

Bacillus licheniformis wurde im Kühlschrank bei 4°C auf Schrägagarröhrchen gehalten und im Abstand von 3 - 4 Wochen überimpft. Allerdings ließ bei dieser Methode die Stammaktivität nach, so daß mehrfach eine reaktivierte Dauerkultur [Kap. 4.2.1] verwendet werden mußte. Die Schrägagarröhrchen wurden wie folgt hergestellt:

37,0 g Standard I-Nähragar (Merck)

in 1000 ml dest. H₂O lösen, je 4 ml in Reagenzgläser geben, mit Zelltuchstopfen verschließen, 30 min bei 121°C autoklavieren und in Schräglage erstarren lassen.

4-1-2 Vorkulturbedingungen

In Fermentervorkulturen wurde folgendes Medium eingesetzt [84]:

Proteinhaltiges Vorkulturmedium:

40,0 g/l Kartoffelstärke (Roquette, Frankfurt)
0,2 g/l Amylase (Termamyl L 120; Novo, Mainz)
4,0 g/l Casein nach Hammarsten (Merck)
2,0 g/l Sojamehl (Sojamin 50T; Edelson, Hamburg)
8,0 g/l Maisquellwasser (Roquette, Frankfurt)
1,6 g/l (NH₄)₂HPO₄ (Merck)

Kartoffelstärke wurde in einem Viertel der Gesamtmenge an bidest. H₂O suspendiert, mit Amylase versetzt und bei 90°C und pH 6,5 bis zur Hydrolyse gerührt.

Casein wurde in einem weiteren Viertel bidest. H₂O suspendiert, mit KOH auf pH 8,5 eingestellt und unter Rühren und Heizen gelöst. Alle übrigen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge im restlichen bidest. H₂O gelöst und mit Stärkehydrolysat und Caseinlösung vermischt. Das Medium wurde auf pH 7,0 gebracht, zu 200 ml in Schüttelkolben abgefüllt und 30 min bei 121°C autoklaviert.

Die Vorkulturen wurden mit einer Impföse aus den Schrägagarröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 100 Upm bebrütet.

4-1-3 Fermenterkulturbedingungen

Das Hauptkulturmedium schäumte beim Autoklavieren so stark, daß eine in situ Sterilisation unmöglich war. Es wurde daher separat sterilisiert und anschließend in den autoklavierten Laborfermenter gepumpt. Da es in seiner ursprünglichen Form [84] sehr dunkel und breiig war und sich mit Schlauchpumpen nicht fördern ließ, wurden die Konzentrationen aller Komponenten auf ein Viertel reduziert. Außerdem wurde Polypropylenglycol als Antischaummittel zugefügt:

Modifiziertes Proteinmedium:

- 22,500 g/l Maisstärke (Roquette, Frankfurt)
- 0,100 g/l Amylase (Termamyl L 120; Novo, Mainz)
- 6,250 g/l Natrium-Caseinat (Emulac 50; Meggle, Wasserburg)
- 4,750 g/l Sojamehl (Sojamin 50T; Edelson, Hamburg)
- 1,750 g/l Maisquellwasser (Roquette, Frankfurt)
- 0,125 g/l (NH₄)₂HPO₄ (Merck)
- 0,125 g/l Na₂HPO₄·12 H₂O (Merck)
- 0,050 g/l KH₂PO₄ (Merck)
- 0,012 g/l FeSO₄·7 H₂O (Merck)
- 0,005 g/l MnSO₄·H₂O (Merck)
- 1,000 g/l Polypropylenglycol (PPG 1200, Fluka)

Maisstärke wurde in einem Viertel des Gesamtvolumens Leitungswasser suspendiert, mit Amylase versetzt und bei 90°C und pH 6,5 bis zur Hydrolyse gerührt.

Casein und Sojamehl wurden jeweils in einem weiteren Viertel des Gesamtvolumens Leitungswasser gelöst.

Alle übrigen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge im restlichen Leitungswasser gelöst und mit dem Stärkehydrolysat, der Casein- und der Sojamehllösung vermischt.

Das Proteinmedium wurde in Mengen zu 20 l in 25 l Laborflaschen oder zu 80 l in einen 100 l Medientank gefüllt, mit KOH auf pH 7,0 gebracht und 60 min bei 121°C sterilisiert.

In Serien von Schüttelkolbenversuchen wurden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten variiert. Wie erwartet, erwies sich das Medium als optimal zusammengesetzt. Das Stärkehydrolysat diente als Kohlenstoffquelle und das Ammonium als primäre Stickstoff-

quelle. Den als Protein vorliegenden Stickstoff aus Casein, Sojamehl und Maisquellwasser konnte *Bacillus licheniformis* erst nach der Ausschüttung der Protease verwerten. Die Proteolyse setzte die Aminosäuren so langsam frei, daß der Gehalt an leicht metabolisierbaren Stickstoffquellen die Proteasebildung nicht reprimierte.

Wurden die Schüttelkulturen anfangs mit 5 mM L-Aminosäuren angereichert, so wurde die Proteasebildung durch Cystein, Isoleucin und Leucin deutlich und durch Arginin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Serin und Valin merklich gehemmt.

Vitaminzusätze dagegen beeinflussten mit Ausnahme der totalen Repression der Proteaseproduktion durch Thiamin den Prozeß kaum.

Das Proteinmedium erwies sich auch in seiner Komposition der Spurenelemente als optimal gestaltet. Die Zugabe weiterer Spurenelemente behinderte die Proteasefreisetzung teilweise stark.

Wesentlich wichtiger war die vollständige Standardisierung aller Zubereitungsschritte des Mediums. Die Bedingungen der Stärkehydrolyse, die Reihenfolge beim Zusammenfügen der Medienkomponenten, das Einstellen des pH-Wertes und der Autoklaviervorgang mußten möglichst identisch ablaufen. Dennoch zeigten sich danach schon in der Färbung und der Konsistenz häufig leichte Differenzen. Diese Schwankungen und unterschiedliche Aktivitäten der Vorkultur erschwerten die Reproduzierbarkeit der Fermentationsergebnisse.

Im industriellen Fermentationsprozeß kann es bei Verwendung eines proteinhaltigen Komplexmediums Schwierigkeiten bereiten, die alkalische Serinprotease von anderen Proteinen abzutrennen. Daher wird das Enzym teilweise nur zusammen mit dem Kulturbrei getrocknet, in Prills gepreßt, mit Titandioxid weiß gefärbt und in dieser Form den Waschpulvern zugesetzt.

4-1-4 Batchfermentationen mit dem Proteinmedium

Einige Batchfermentationen wurden mit dem ursprünglichen Proteinmedium durchgeführt. Das im Vergleich zur modifizierten Vorschrift vierfach konzentrierte Medium besaß eine Trockenmasse von 46 g/l. Der hohe Feststoffanteil ließ die Ermittlung der Biomasse nicht zu. Nach dem Animpfen herrschten folgende Betriebsparameter:

Kulturvolumen	4 l
Temperatur	39°C
pH-Wert	ungeregelt
pO ₂ -Wert	ungeregelt
Drehzahl	700 Upm
Belüftung	1,5 vvm
Innendruck	100 mbar Überdruck

Tab. 5: Bedingungen in der Batchkultur mit dem Proteinmedium

Die Bedingungen bezüglich Drehzahl und Belüftung waren so gewählt, daß die Batchkultur während der gesamten Versuchsdauer niemals in eine Sauerstofflimitierung geriet. Wegen des hohen Feststoffanteiles im Medium konnte die Biomasseentwicklung nur indirekt am Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes verfolgt werden. Der Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase begann mit dem Durchschreiten des pO_2 -Minimums. Danach erst setzte die Proteaseausschüttung ein. Wie erwartet [17,67,68], ist Subtilisin Carlsberg ein wachstumsunabhängiges Produkt, dessen Biosynthese an eine Nährstofflimitierung in der Idiophase gebunden ist {Abb. 34}:

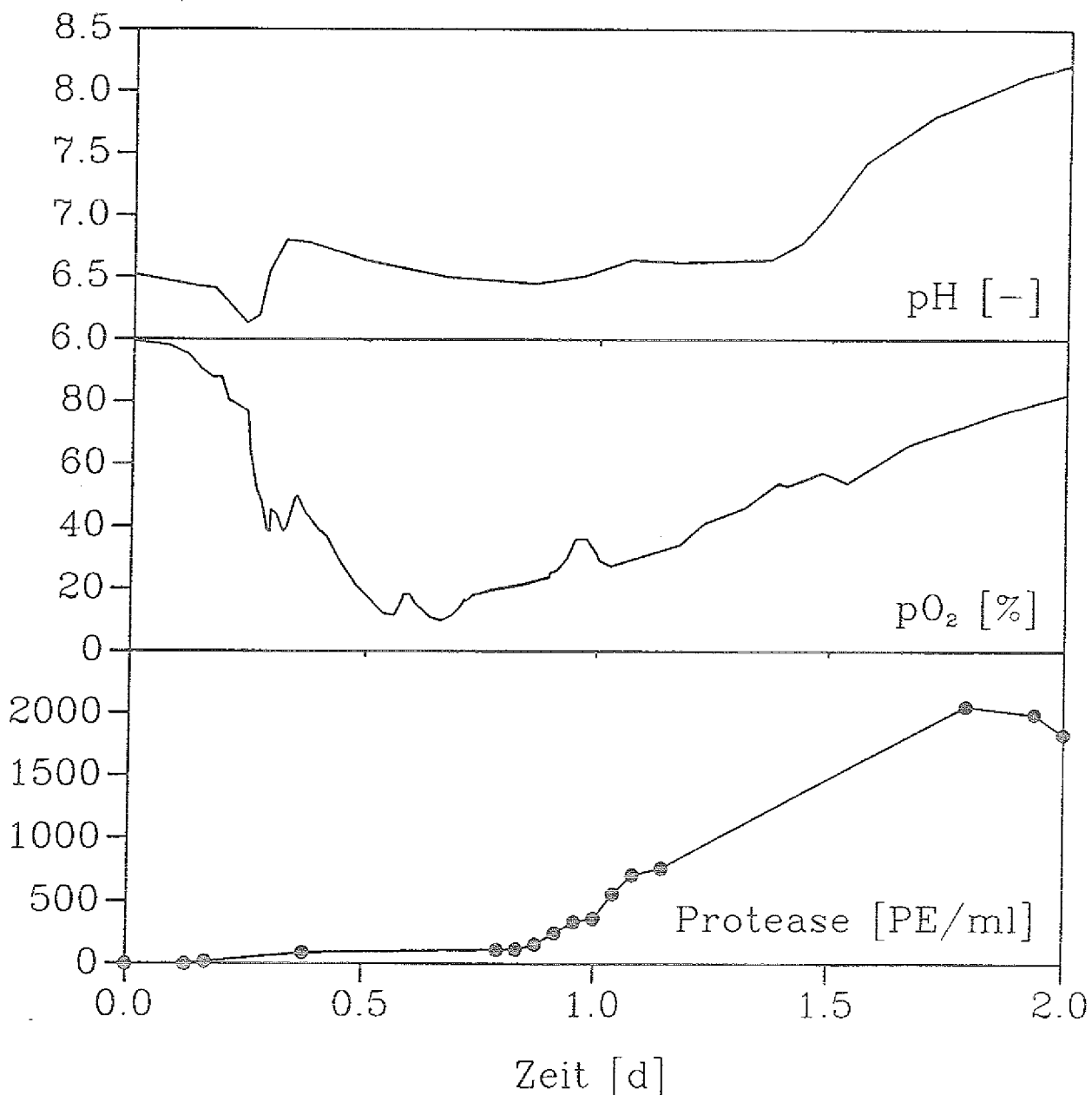


Abb. 34: pH-ungeregelte Batchkultur mit dem originalen, also vierfach konzentrierten Proteinmedium, 39°C, 700 Upm, 1,5 vvm

Während des Wachstums und der Enzymausschüttung lag der pH-Wert nur ganz leicht im sauren Bereich. Die Produktionsphase endete mit dem Verbrauch der primären Nährstoffe. Die Zellen mußten auf Sekundärsubstrate wie z. B. niedermolekulare Fettsäuren zurückgreifen, weshalb der pH-Wert zum Fermentationsende anstieg. Bis dahin wurden etwas mehr als 2000 PE/ml gebildet.

In allen weiteren Fermentationen mit dem Proteinmedium wurde die modifizierte Substratvorschrift verwendet [Kap. 4-1-3]. Der Einsatz des dünneren Mediums gestattete es, die Belüftung auf 1 vvm zu reduzieren und somit auch die Schaumbildung zu senken. Da die Enzymproduktion fast im neutralen Bereich stattfand, wurde zusätzlich pH 7 durch Säure-/Lauge-Titration eingestellt. Dieser pH-Wert scheint optimal für die Produktion alkalischer Serinproteasen zu sein [37]. Das pH-Profil in pH-regulierten Fermentationen konnte anhand des Korrekturmittelverbrauches verfolgt werden. In derartigen Batchversuchen konnte die halbe Proteasekonzentration erzielt werden, obwohl der Substratgehalt auf ein Viertel reduziert wurde {vergleiche Abb. 46}. Die Selektivität verdoppelte sich somit.

4-1-5 Kontinuierliche Fermentationen mit dem Proteinmedium

Die Batchergebnisse sollten auf die Chemostatkultur übertragen werden, da die kontinuierliche Reaktionsführung moderne Prozeßbefragungstechniken mit Pulsen, Sprüngen und Gradienten erlaubt. Voraussetzungen hierfür sind die Stammstabilität und die Erzielung von Steady-State-Bedingungen.

Kontinuierliche Proteasefermentationen mit proteinhaltigen Medien wurden bislang nicht beschrieben. Hier gelang es in mehreren Chemostatkulturen, über mehrere Verweilzeiten eine dauerhafte Proteaseausschüttung mit mehr als 1000 PE/ml zu erzielen {Abb. 35}. Dabei galten folgende Bedingungen {Tab. 6}:

Durchflußrate	0,1 l/h
Kulturvolumen	2,4 l
Temperatur	39°C
pH-Wert	7
pO ₂ -Wert	ungeregelt
Drehzahl	700 Upm
Belüftung	1 vvm
Innendruck	100 mbar Überdruck

Tab. 6: Bedingungen in der Chemostatkultur mit dem Proteinmedium

Aus Fedbatchversuchen mit dem Glycerinmedium ließ sich während der exponentiellen Vermehrung von *Bacillus licheniformis* DSM 641 eine maximale Wachstumsrate von $0,5 \text{ h}^{-1}$ abschätzen. Dieser Wert entspricht nahezu Literaturdaten, die in Chemostatkultur mit einem verwandten Stamm gewonnen wurden [93].

Somit lag die Verweilzeit bei einem Kulturvolumen von 2,4 l und einem Medienzuluß von 0,1 l/h zwölfmal höher die maximale Wachstumsrate. Wurde aber eine Verweilzeit niedriger als 1 d gewählt, so wurde die anfänglich gebildete Protease schnell wieder ausgewaschen. Vermutlich wirkte sich dann das bessere Nährstoffangebot reprimierend auf die Exoenzymbiosynthese aus [24,25].

Der Versuch, in kontinuierlicher Kultur den Einfluß und die optimale Konzentration der organischen Inhaltsstoffe zu ermitteln, scheiterte an schwer erklärbaren Medieneffekten. Hierzu wurde die jeweils zu untersuchende Komponente getrennt vom übrigen Medium autoklaviert und erst im Fermenter zugesetzt. Da jedoch organische Medienbestandteile in Abwesenheit von anorganischen Salzen bei der Hitzesterilisation anders aufgeschlossen wurden, wurde selbst bei identischer Gesamtzusammensetzung fast keine Protease gebildet.

Auch bezüglich verschiedener Spurenelemente konnten durch puls-hafte Zugaben in den Fermenter oder sprunghafte Konzentrations-änderungen im Medienzulauf keine eindeutigen Einflüsse auf die Proteaseausschüttung in der Chemostatkultur ermittelt werden.

Allein durch die Variation des Ammoniumgehaltes im Medienzulauf ließen sich eindeutige Effekte erzielen. Bei den Fermentationen wurde ein inverser Zusammenhang zwischen der Proteasebildung und der Ammoniumkonzentration der Kulturbrühe bemerkt. Da Ammonium die Proteasebiosynthese reprimierte [35,68], wurde einem Anstieg des NH_3 -Gehaltes im Fermenter durch stufenweises Absenken der Zulaufkonzentration begegnet. Auf diese Weise konnte im Fermentationsverlauf der Ammoniumgehalt im Bioreaktor wieder gesenkt werden, worauf die Proteaseaktivität erneut ihre alte Höhe erreichte. Die Ausschüttung von Subtilisin Carlsberg wurde somit über 20 Verweilzeiten auf hohem Niveau gehalten (Abb. 35). Der Versuch wurde abgebrochen, da mit dem Substratwechsel trotz identischer Zubereitung keine Protease mehr gebildet wurde.

Während des Fermentationsverlaufs wurde mit einem Aminosäureanalysator die Konzentrationen der Aminosäuren im Kulturüberstand verfolgt. Dabei fanden sich nur solche Aminosäuren in nennenswerten Mengen, die in Schüttelkulturen die Proteasebiosynthese kaum beeinflussten. Somit kam dem Ammoniumgehalt die Schlüsselrolle bei der Proteasebiosynthese zu.

Als Schlußfolgerung aus dem Versuch wurde in einigen kontinuierlichen Fermentationen der Kultur mit dem Medium kein weiteres Ammonium zugeführt. Es bildete sich jedoch eine sehr strenge NH_3 -Limitierung aus, die nur eine geringe Proteasebiosynthese zuließ.

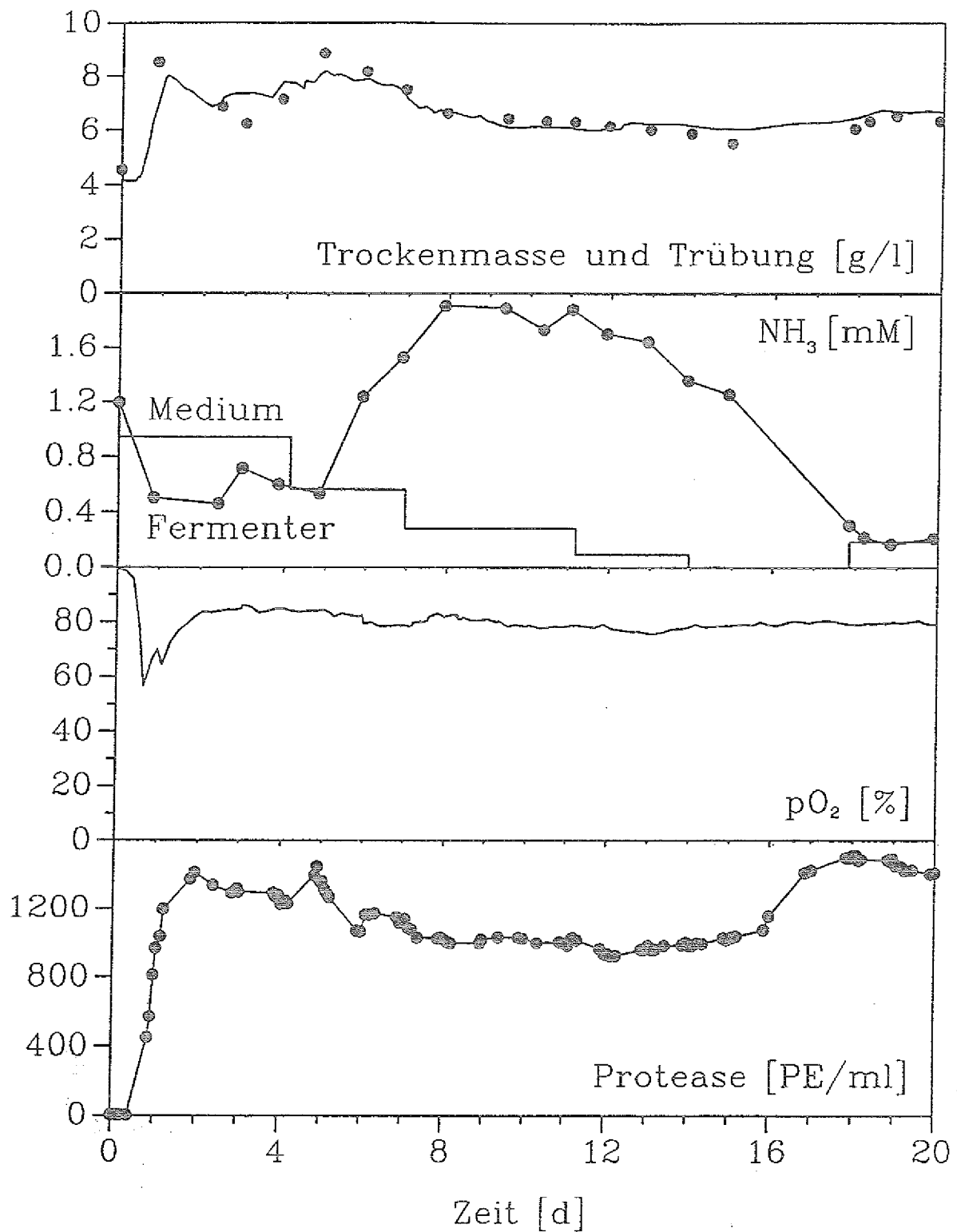


Abb. 35: Chemostatkultur mit dem modifizierten Proteinmedium, 1 d Verweilzeit, 39°C, pH 7, 700 Upm, 1 vvm

Im Diagramm spiegelt die Trockenmasse/Trübungskurve wegen des hohen Feststoffgehaltes des Proteinmediums nur tendenziell die Biomasseentwicklung wieder {Abb. 35}.

Durch den hohen Anteil unlöslicher Substanzen traten häufig Verstopfungen im Medienzulauf oder im Fermenterablauf auf. Auf die daraus resultierenden Verweilzeitschwankungen reagierte *Bacillus licheniformis* mit der Einstellung der Subtilisinbildung.

Problematisch war auch die Verwendung von Sojamehl, da es viele schwerlösliche Partikel enthielt, die durch ihre Härte die Gleitringdichtung des Rührwerks relativ schnell zerstörten.

Zur Überwachung der Zellmorphologie in kontinuierlicher Kultur wurden einige Fermenterproben auf Petrischalen ausgespatelt, die Calcium Caseinat Agar (Merck) enthielten. Anfangs bildeten sich nur große rauhe Kolonien, die dem eingesetzten Stamm entsprachen. Mit zunehmender Prozeßdauer traten vermehrt kleine transparente schleimige Kolonien auf, die teilweise langsamer wuchsen, zum Teil nicht mehr sporulieren konnten und weniger oder keine Protease bildeten [7]. Derartige Phänomene wurden in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen schon mehrfach beobachtet [36,60,95]. Im Fall von *Bacillus licheniformis* S1684 handelte es sich um zwei Stämme mit unterschiedlichem *rel*-Status [24]. Während die rauhe Form bei Aminosäuremangel das Wachstum nicht einstellte und somit *relaxed* (*rel*⁻) reagierte, war die Polyglutaminsäureschleim produzierende Mutante *stringent* (*rel*⁺) und bildete Guanosinpolyphosphate als intrazelluläre Botensubstanzen (*second messenger*). Wie bei *Bacillus licheniformis* DSM 641 produzierten die schleimigen Kolonien kaum mehr extrazelluläre Enzyme, wodurch ihr Substratspektrum stark eingeschränkt wurde. Stattdessen konnten sie seltene Zucker verwerten. Die Unterschiede im Chemo- und Phänotyp wurden durch einen Integrations-/Extrusions-Mechanismus von Plasmiden am Chromosom gedeutet, denn die beiden Stämme unterschieden sich in der Anzahl ihrer extrachromosomalen Elemente (2/4) [13].

In kontinuierlicher Kultur stellte sich nur bei langen Verweilzeiten eine Nährstofflimitierung ein, die die Proteasebiosynthese dereprimierte. Derartige Mangelzustände stimulierten den Originalstamm zur Sporulation. Die Sporen konnten sich nicht vermehren und wurden ausgewaschen. Die unproduktiven Mutanten hatten dagegen die Fähigkeit zur Ausbildung einer Dauerform verloren. Hierdurch gewannen sie einen Selektionsvorteil, da sie sich entsprechend der Zufuhr an limitierendem Substrat weiter vermehren konnten.

Gelingt es nicht, derartige Mutationen dauerhaft zu unterdrücken oder nicht produzierende Mutanten auszuwaschen, so läßt sich Subtilisin Carlsberg nicht in kontinuierlicher Kultur gewinnen.

Wegen der mangelnden Reproduzierbarkeit und der schwer durchschau- baren Zusammenhänge wurden die Arbeiten mit dem komplexen Proteinmedium eingestellt.

4-2 Fermentationen mit dem synthetischen Glycerinmedium

Ein rein mineralisches Medium mit niedermolekularen C- und N-Substraten bedeutet eine deutliche Vereinfachung des Gesamtprozesses. Nur ein wohldefiniertes Medium bietet die Chance, die Vorgänge, die zur Biosynthese von Subtilisin Carlsberg führen, zu deuten und die Erkenntnisse in einem Produktionsprozeß zu nutzen. In einem nahezu feststofffreien Medium läßt sich darüber hinaus das Wachstum der Kultur über die Trockenmasse oder die Trübung der Fermentationsbrühe [Kap. 3-13] verfolgen.

Die Verwendung eines synthetischen Mediums bot darüber hinaus die Möglichkeit, die alkalische Serinprotease durch fraktionierte Acetonfällung aufzureinigen [83]. Dazu wurde ein Teil Kulturüberstand mit je einem Teil 50 mM CaCl_2 -Lösung und Aceton versetzt. Die ausfallenden Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Im Überstand wurde die alkalische Serinprotease mit weiteren drei Teilen Aceton vollständig ausgefällt {Abb. 36}. Dabei fiel das Enzym in einer Reinheit von 83,5 % an, was durch eine Gelfiltration an einer Sephadex G-25 Säule (Pharmacia-LKB, Freiburg) mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 gezeigt wurde [8].

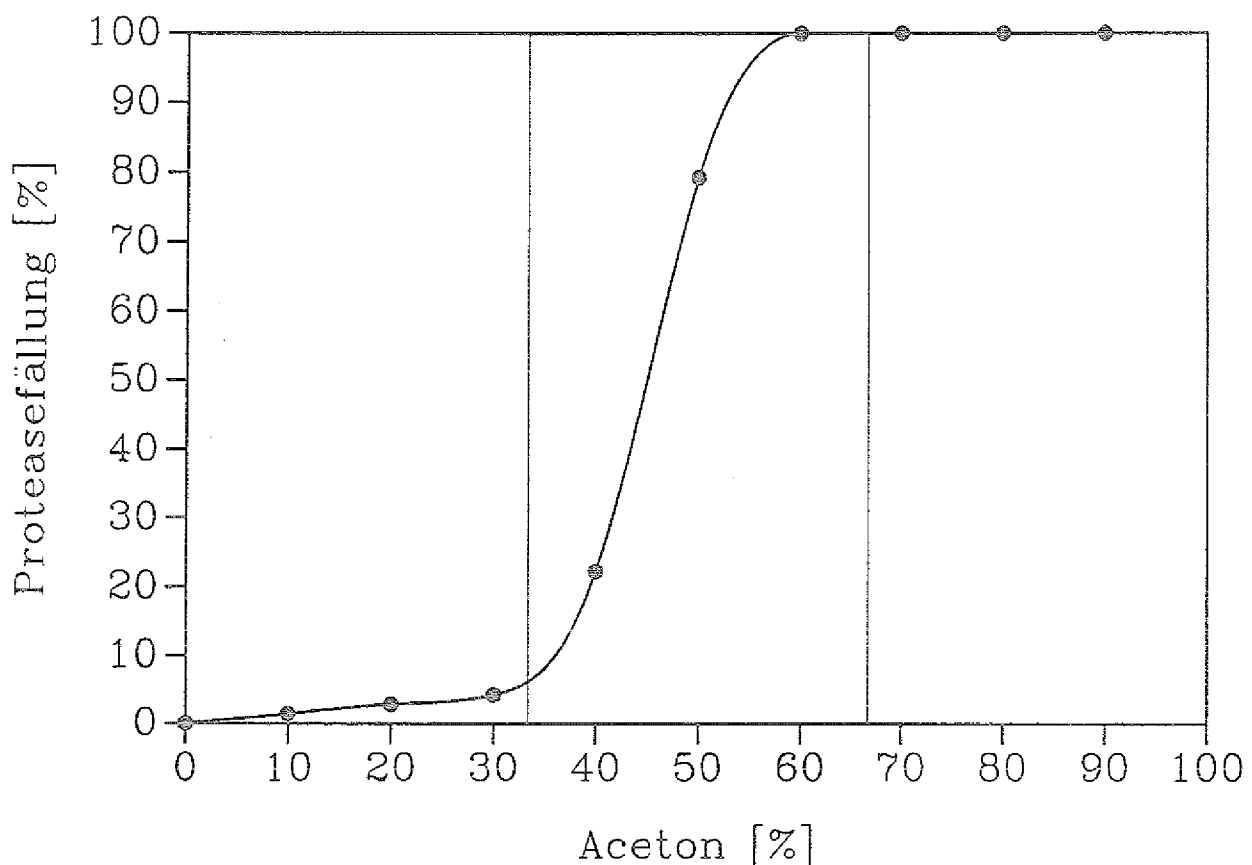


Abb. 36: Enzymaufreinigung durch fraktionierte Acetonfällung von Kulturbrühe aus einer Fermentation mit dem Glycerinmedium

4-2-1 Stammhaltung

Da die Aktivität der auf Schrägagarröhrchen gehaltenen Zellen laufend nachließ, war ein anderes Verfahren zur Stammhaltung notwendig, das eine höhere Stammstabilität garantierte. Es beruhte einerseits auf der Herstellung von lyophilisierten Dauerkulturen andererseits auf einem tiefgefrorenen Master-Feed-Stock [73]:

Lyophilisierte Dauerkulturen:

Ein Schüttelkolben mit 100 ml Standard I-Nährbouillon [Kap. 4-2-2] wurde aus einer frischen Schrägagarkultur angeimpft und ca. 18 h bei 37°C und 100 Upm geschüttelt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 100 ml einer frisch bereiteten Magermilch-Ascorbat-Lösung versetzt, die aus 20 ml einer 3 %igen, sterilfiltrierten Ascorbatlösung und 80 ml steriler Magermilch hergestellt wurde. Die Suspension wurde in Portionen zu 0,1 ml in sterile Röhrchen pipettiert, mit Zellstoff verschlossen und lyophilisiert. Die getrockneten Röhrchen wurden anschließend zugeschmolzen. Die lyophilisierten Kulturen waren dauerhaft haltbar.

Zur Reaktivierung wurde die Dauerkultur mit 1 ml steriler Standard I-Nährbouillon versetzt und 1 d bei 37°C bebrütet.

Master-Feed-Stock:

Ein Schüttelkolben mit 100 ml Standard I-Nährbouillon [Kap. 4-2-2] wurde mit einer reaktivierten Dauerkultur angeimpft und ca. 18 h bei 37°C und 100 Upm geschüttelt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 30 ml sterilem Glycerin versetzt und in Portionen zu 2 ml in sterile Röhrchen abgefüllt. Die Kulturen wurden bei -70°C gelagert und erfuhren dabei keinen merklichen Aktivitätsverlust. Der sogenannte Master-Feed-Stock erlaubte, alle Versuche mit qualitätsmäßig gleichem Impfgut zu bestreiten.

4-2-2 Vorkulturbedingungen

Die Vorkultivierung bestand aus zwei Schritten, die das Aufwachsen in zwei unterschiedlichen Medien beinhalteten:

Nährbouillon-Vorkultur:

25 g/l Standard I-Nährbouillon (Merck)

Die Standard I-Nährbouillon wurde in bidest. H₂O gelöst, zu 200 ml in Schüttelkolben abgefüllt und 30 min im Autoklaven bei 121°C sterilisiert. Die Nährbouillonkolben wurden mit einer frisch aufgetauten Master-Feed-Stock-Kultur angeimpft und 8 h bei 37°C und 100 Upm geschüttelt.

Glycerinmedium, Vor- und Schüttelkultur:

- 200 mM Glycerin (87 %; Merck)
- 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck)
- 50 mM Maleinsäure (Merck)
- 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck)
- 10 mM K_2HPO_4 (Merck)
- 10 mM KH_2PO_4 (Merck)
- 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- 500 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- 100 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)
- 50 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

Alle Inhaltsstoffe wurden in dest. H_2O gelöst. Das Glycerinmedium wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt, zu 200 ml in Schüttelkolben abgefüllt und 30 min im Autoklaven bei 121°C sterilisiert. Die Kulturkolben wurden mit 2 ml der Nährbouillon-Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 100 Upm geschüttelt. Fermentervorkulturen wurden über Nacht bebrütet.

Das synthetische Medium basiert in seinen Grundzügen auf einer Vorschrift zur Kultivierung von *Bacillus stearothermophilus* [91]. In zahlreichen Schüttelkolbenversuchen wurde seine Zusammensetzung überprüft und gegebenenfalls verbessert.

Bei der Wahl der C-Quelle mußte ein Kompromiß zwischen Wachstum und Proteasebildung gefunden werden [34,37]. Energiereiche Substrate wie z. B. Glucose waren günstig für das Wachstum, reprimierten aber die Exoenzymsynthese stark. Energiearme C-Quellen wie z. B. Essigsäure ließen nur geringes Biomassewachstum zu und senkten somit die Proteaseausbeute. Letztendlich wurde Glycerin als Kohlenstoffquelle gewählt, da es einfach zu handhaben war (keine Karamelisierung) und im Vergleich zu anderen preiswerten Substraten die beste Proteaseausschüttung bewirkte.

Bezüglich der N-Quelle wurden analoge Untersuchungen durchgeführt. Dabei erwies sich Ammonium als bestes N-Substrat für das Wachstum. Allerdings inhibierte es auch die Proteasebiosynthese am stärksten [34]. Es wurde dennoch in Form von Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle genutzt, da es preiswert, einfach in der Verwendung und gut zu analysieren war.

Kaliumphosphatpuffer diente sowohl als Nährstoff wie als Puffer. Da dessen Pufferung nicht ausreichte, wurde zusätzlich Tris-Maleat-Puffer eingesetzt. Beide Grundsubstanzen wurden von *Bacillus licheniformis* nicht verwertet.

Außer Magnesium (ATP-Effektor), Mangan, Eisen und Calcium wurden bei der Verwendung von einfach destillierten Wasser keine weiteren Spurenelemente benötigt. Der Calciumanteil ließe sich noch halbieren, ohne allerdings großen Einfluß auf den Prozeß zu besitzen.

4-2-3 Fermenterkulturbedingungen

Im Fermenter ließ sich der pH-Wert durch Korrekturmittelzugabe regulieren. Der Einsatz von Tris-Maleat-Puffer war deshalb nicht mehr notwendig. Das Medium enthielt meist kein Ammonium, da die Online-Analyse eine rechnergesteuerte Nachdosierung [Kap. 3-10] erlaubte. Als Antischaummittel diente wiederum Polypropylenglycol.

Glycerinmedium, Fermenterkulturen:

- 200 mM Glycerin (87 %; Merck)
- 10 mM K_2HPO_4 (Merck)
- 10 mM KH_2PO_4 (Merck)
- 1 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Merck)
- 500 μM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (Merck)
- 100 μM $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Merck)
- 50 μM $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Merck)
- 1 g/l Polypropylenglycol (P 1200; Fluka)

Alle Inhaltsstoffe wurden in dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Der Laborfermenter wurde mit maximal 4 l Medium gefüllt und in situ 50 min bei 121°C autoklaviert. Bei kontinuierlichen Fermentationen wurde weiteres Substrat in 25 l Laborflaschen sterilisiert.

4-2-4 Batchfermentationen mit dem Glycerinmedium

Um die Schüttelkolbenergebnisse auf den Fermenter zu übertragen, wurde anfangs bei 39°C ein pH-ungezogelter Batchversuch mit dem Glycerinmedium für Schüttelkolben durchgeführt {Abb. 37}.

Während im Schüttelkolben fast 1200 PE/ml erzielt wurden, lag hier die Ausbeute nur bei einem Fünftel. Ursache war der wesentlich höhere Sauerstoffeintrag, der zu einem deutlichen Anstieg von Wachstum und Stoffwechselleistungen führte.

Das Glycerin wurde sehr schnell aufgebraucht, wobei als Zwischenprodukte u. a. organische Säuren und dabei insbesondere Essigsäure entstanden. Die Pufferkapazität des Mediums reichte nicht aus, so daß der pH-Wert bis auf pH 5 (Schüttelkolben pH 6,2) abfiel. Daraufhin verringerte sich die Stoffwechselaktivität und ließ den Gelöstsauerstoff, der mit dem Wachstum fast bis auf null zurückgegangen war, wieder ansteigen. Nachdem Glycerin als primäre C-Quelle nach 0,6 d verbraucht war, mußten die Mikroorganismen ihren Stoffwechsel auf die Verwertung von Sekundärsubstraten umstellen. Die Aufnahme von Essigsäure und anderen organischen Säuren ließ den pH-Wert wieder steigen. In diese kohlenstofflimitierte Phase fiel die Proteaseausschüttung. Ammonium lag während der gesamten Fermentation noch in ausreichender Menge vor.

Ein Versuch, die kohlenstofflimitierte Phase durch Verwendung von Essigsäure als Korrekturmittel zu verlängern [37], führte nicht zu einem höheren Proteasegehalt der Kulturbrühe.

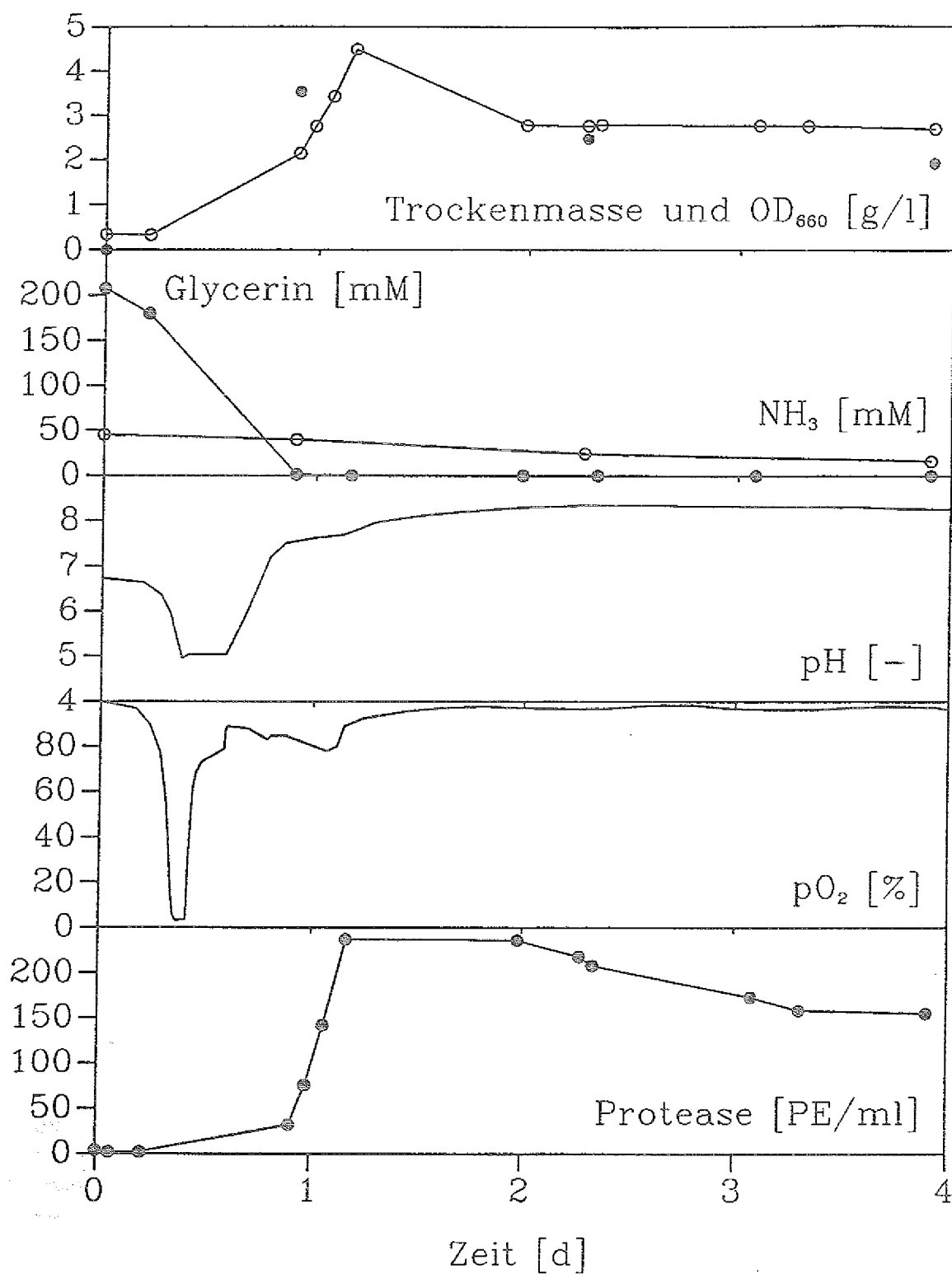


Abb. 37: pH-ungeregelte Batchkultur mit dem Glycerinmedium für Schüttelkolben, 39°C, 700 Upm, 1 vvm

In den Schüttelkulturen ergab sich dagegen ein ganz anderes Bild. Durch den geringeren Sauerstoffeintrag wurde Glycerin nur langsam verwertet. Als erste Medienkomponente wurde das Ammonium verbraucht. Unter Stickstofflimitierung wurde die Proteasebiosynthese wesentlich stärker dereprimiert als unter Kohlenstoffmangel. Diese Erfahrung konnte auch in Batchversuchen [35] und kontinuierlichen Fermentationen [25] gewonnen werden.

Um einen allzu schnellen Verbrauch von Glycerin zu vermeiden, wurde der Sauerstoffeintrag durch Reduzierung der Drehzahl auf 300 Upm verringert. Sekundäre pH-Effekte wurden durch Kontrolle des pH-Wertes verhindert. Auf Tris-Maleat-Puffer konnte daher verzichtet werden. Es wurden mehrere Batchversuche durchgeführt, bei denen das C/N-Verhältnis variiert wurde. Dabei galten folgende Kulturbedingungen {Tab. 7}:

Kulturvolumen	4 l
Temperatur	39°C
pH-Wert	7
pO ₂ -Wert	ungeregelt
Drehzahl	300 Upm
Belüftung	1 vvm
Innendruck	100 mbar Überdruck

Tab. 7: Bedingungen in der Batchkultur mit dem Glycerinmedium

Das beste Ergebnis lieferte ein Batchversuch mit 660 mM Glycerin bei 50 mM Ammonium {Abb. 38}. Wie in der Schüttelkultur ging hier zuerst der Ammoniumgehalt zur Neige. Die daraufhin einsetzende Proteasebiosynthese führte zu einer Aktivität, die um 10 % über der Ausbeute in der Schüttelkultur lag.

Die Prozeßbedingungen erlaubten, daß die Kultur in eine Sauerstofflimitierung geriet. *Bacillus licheniformis* benötigt aber aerobe Verhältnisse, um Subtilisin zu produzieren. Daher wurde die Sauerstoffsättigung in allen weiteren Experimenten durch Drehzahlregulierung kontrolliert [Kap. 3-8]. In mehreren Versuchen erwies sich ein pO₂-Minimum von 5 % als besonders günstig. Bei niedrigerem Sauerstoffangebot waren Wachstum und Subtilisinbiosynthese zu stark limitiert. Ein Überschuß dagegen begünstigte die Zellvermehrung. Gleichzeitig nahm der maintenance-Bedarf zu und senkte somit die Proteaseausbeute.

Auslöser der Proteasebildung war zwar der Mangel an leicht metabolisierbaren Stickstoffquellen. Die Biosynthese des Proteins benötigte aber Stickstoffbausteine. Zur Prozeßverbesserung mußte daher Ammonium zugeführt werden, ohne die N-Limitierung aufzuheben.

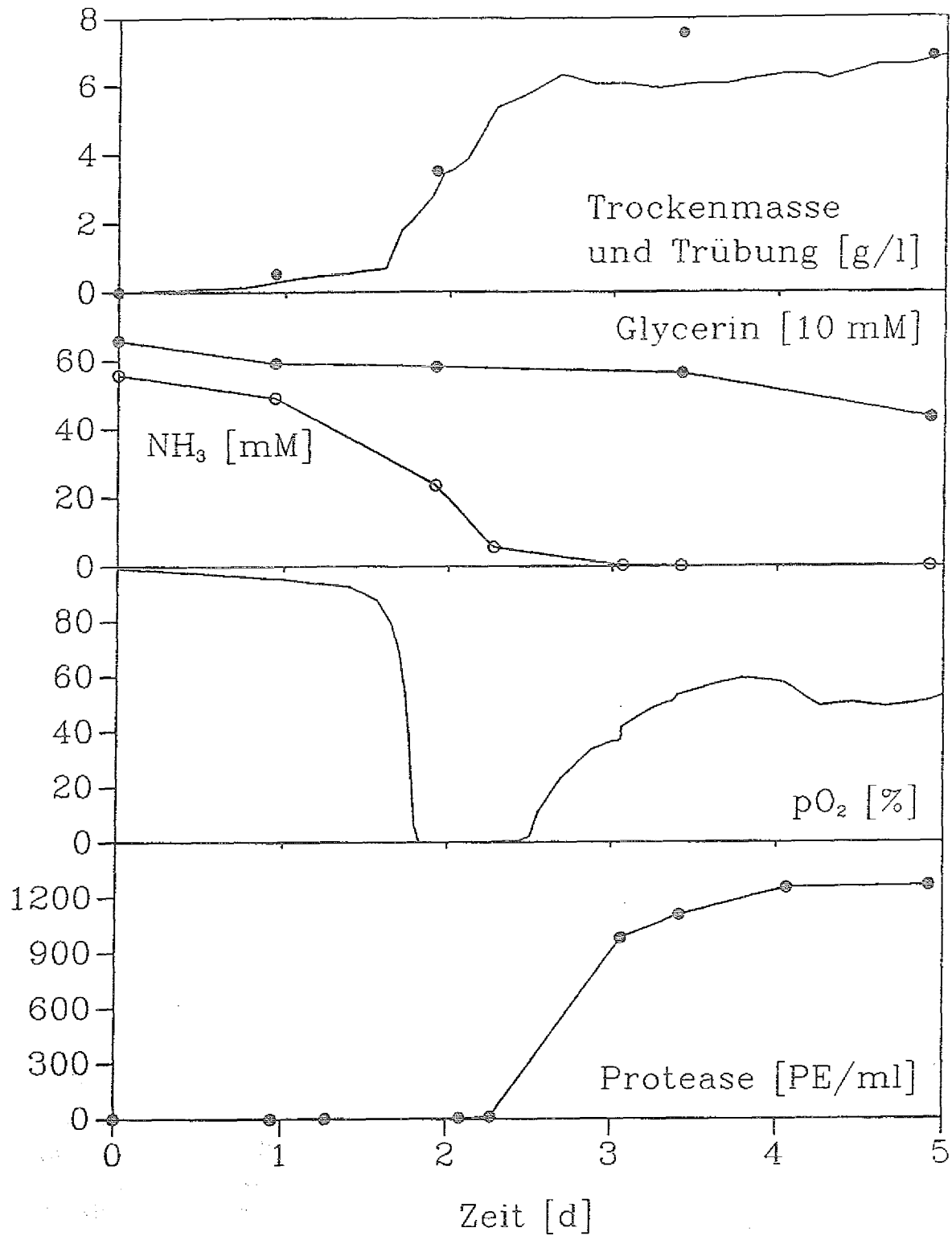


Abb. 38: Batchkultur mit dem Glycerinmedium, 39°C, pH 7, 300 Upm, 1 vvm

4-2-5 Kontinuierliche Fermentationen mit dem Glycerinmedium

Die eleganteste Methode der Nährstoffnachdosierung bietet das Fließgleichgewicht der kontinuierlichen Kultur. Das zufließende Medium läßt sich in seiner Komposition derart zusammensetzen, daß die Konzentrationen aller Komponenten im Steady-State optimal für die Proteaseausschüttung sind.

Schon mehrfach wurde die kontinuierliche Kultivierung von *Bacillus licheniformis* auf mineralischen Medien in ein [17,93] und zwei Stufen [41] beschrieben. Allerdings traten dabei häufig Probleme mit der Stammstabilität auf [24,25,36]. Spontane Veränderungen im Genom hingen aber auch von den Kulturbedingungen ab [60]. Es war also möglich, daß im proteinfreien Glycerinmedium die Mutationsrate verringert sein würde. Daher wurden die Experimente zur kontinuierlichen Reaktionsführung mit dem Glycerinmedium fortgesetzt.

Die kontinuierlichen Versuche hatten das Ziel, die Nährstofflimitierung der Kultur im Sinne maximaler und stabiler Proteasebildung zu optimieren. Dazu wurden in Chemostatkulturen unterschiedliche Glycerin- und Ammoniumkonzentrationen im zulaufenden Medium gewählt. Es galten folgende Bedingungen {Tab. 8}:

Durchflußrate	0,1 l/h oder NH ₃ -Auxostat
Kulturvolumen	2,4 l
Temperatur	39°C
pH-Wert	7
pO ₂ -Wert	minimal 5 %
Drehzahl	300 - 1000 Upm
Belüftung	1 vvm
Innendruck	100 mbar Überdruck

Tab. 8: Bedingungen in der kontinuierlichen Kultur mit dem Glycerinmedium

Infolge mangelnder Stammstabilität gelang es nicht, eine dauerhafte Proteaseausschüttung zu erzielen. Daher ließen sich weitere Schlüsse nur aus der Anfangsphase der Chemostatversuche ziehen.

Die Proteasebiosynthese erfolgte sowohl unter Glycerin- als auch Ammoniummangel. Wie erwartet [25,35], dereprimierte die Stickstofflimitierung die Exoenzymbildung deutlich stärker. Kam zur Begrenzung durch Stickstoff noch ein Mangel an Kohlenstoffquelle, so stellte *Bacillus licheniformis* seine Proteaseproduktion ein {Abb. 39}. Unter doppelter Nährstofflimitierung nahm im mikroskopischen Bild die Anzahl der Sporen deutlich zu. Für *Bacillus licheniformis* S1684 wurde beschrieben [13], daß unter Sporulationsbedingungen vermehrt Mutanten auftraten, die keine Protease produzierten.

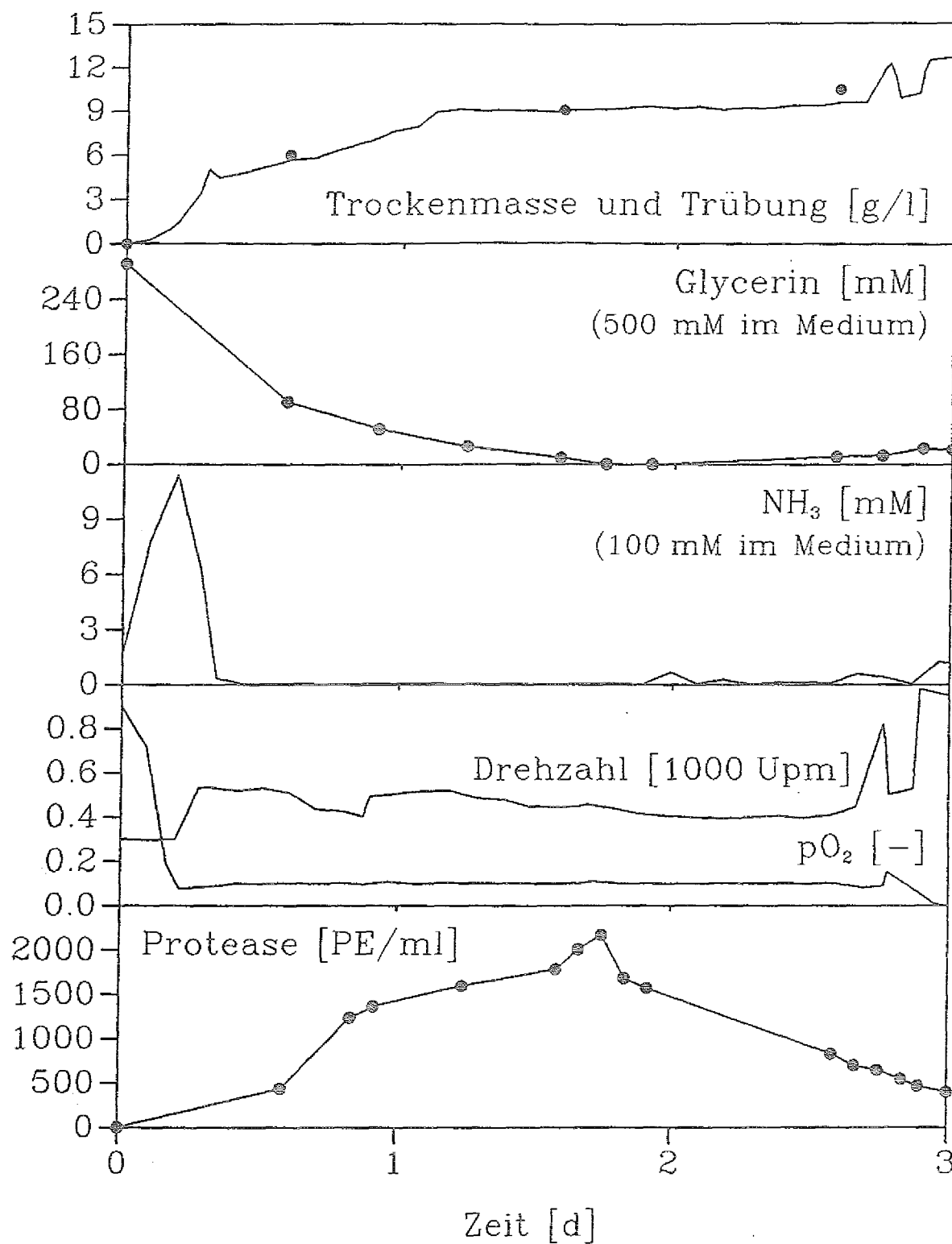


Abb. 39: Chemostatkultur mit dem Glycerinmedium, 1 d Verweilzeit, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO₂, 1 vvm

Auf der anderen Seite führte in stickstofflimitierter Kultur überschüssiges Glycerin zwar nur zu einer leichten Inhibierung des Wachstums, jedoch zu einer starken Hemmung der Subtilisinbildung. Bei Versuchen, in denen der C-Gehalt doppelt so hoch lag, konnte nur halb soviel Protease gemessen werden. Aus den Chemostatkulturen ergab sich ein optimales C/N-Verhältnis von 5 mol Glycerin zu 1 mol Ammonium.

Entsprechende Ergebnisse wurden auch für N-Überschuß in C-limitierter Kultur beschrieben [25].

In der Chemostatkultur herrschte in der Regel eine ziemlich strenge Stickstofflimitierung, die ein Grund für die mangelnde Stammstabilität sein konnte. Um sie zu mildern, wurden andere Formen der kontinuierlichen Reaktionsführung getestet:

Eine Variante war eine Kombination aus Chemostat und Fedbatch. Das stickstofffreie Medium wurde mit konstanter Zuflußrate dem Fermenter zugeführt. Die Zudosierung von Ammonium richtete sich nach dem aus der Online-Messung ermittelten Verbrauch und der Abweichung zum Sollwert [Kap. 3-10]. Diese Methode gestattete es, die Schärfe der Stickstofflimitierung direkt festzulegen. Die Versuche führten letztendlich nicht zum Erfolg, da das leicht erhöhte NH_3 -Niveau einen stärkeren Glycerin-Verbrauch nach sich zog. Die C-Quelle wurde somit im Verlaufe der Fermentation limitierend, worauf die Subtilisinbildung eingestellt wurde.

Erfolgreicher war dagegen das Konzept des NH_3 -Auxostaten, bei dem sich die Zufuhr des ammoniumhaltigen Substrates nach der Online-Messung und der Abweichung vom Sollwert richtete. Damit die Versuche nicht in einen Batchzustand übergehen konnten, wurde eine maximale Verweilzeit von 2 d vorgegeben. In diese Beschränkung geriet der beste Versuch nach 3 d {Abb. 40}. Da sich daraufhin die Medienzufuhr nicht mehr nach dem Bedarf richtete, akkumulierte Ammonium und erlaubte somit einen stärkeren Glycerinverbrauch. Die Kultur ging von einer Stickstoff- in eine immer schärfere Kohlenstofflimitierung über. Der Proteasegehalt nahm entsprechend ab. Immerhin gelang es, gegenüber dem Chemostaten die Ausbeute von 2298 auf 2652 PE/ml zu steigern. Allerdings lag die Verweilzeit deutlich höher. Eine stabile Proteasebildung in kontinuierlicher Kultur ließ sich auf diese Weise ebenfalls nicht erreichen.

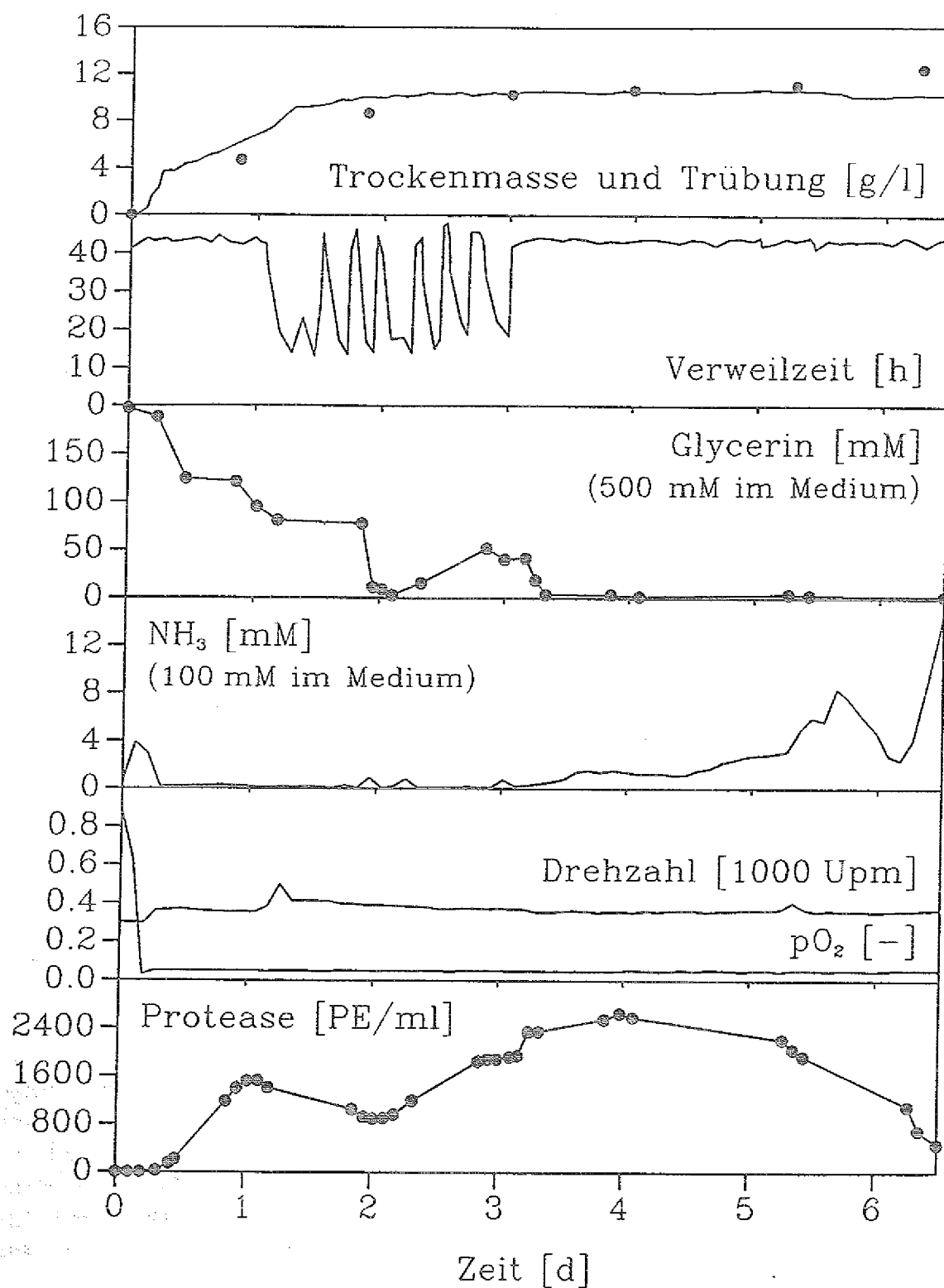


Abb. 40: NH₃-Auxostatkultur mit dem Glycerinmedium, maximal 2 d Verweilzeit, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO₂, 1 vvm

4-2-6 Fedbatchfermentationen mit dem Glycerinmedium

Als Alternative zur Prozeßverbesserung bot sich noch die seltener beschriebene halbkontinuierliche Kultivierung an:

In einem einfachen Verfahren diente Essigsäure als C-Quelle, deren Verbrauch durch Titration ausgeglichen wurde [37].

In einer anderen Fedbatchtechnik wurde der Ammonium-, Sauerstoff- und Glucosegehalt kontrolliert. Dabei wurde Ammonium ebenfalls mit einer gassensitiven NH_3 -Elektrode gemessen und nach diesem Signal im leichten Überschuß gehalten. Die C-Quelle war dagegen nahezu vollständig erschöpft. Ihre Nachdosierung war an die Kontrolle des Sauerstoffpartialdrucks der Kulturbrühe gebunden. Stieg der pO_2 -Wert infolge von C-Mangel auf über 20 % Sauerstoffsättigung an, so wurde Glucose nachgefüttert [44].

Da nicht nur nach eigenen Erfahrungen [25,35] eine N-Limitierung eine höhere Proteaseausschüttung bewirkte als ein C-Mangel, wurden halbkontinuierliche Fermentationen unter Begrenzung der Ammoniumkonzentration durchgeführt. Glycerin als C-Substrat wurde dagegen in einem leichten Überschuß gehalten. Die Fermentationen liefen alle unter folgenden Bedingungen ab {Tab. 9}:

Kulturvolumen	4 l
Temperatur	39°C
pH-Wert	7
pO_2 -Wert	minimal 5 %
Drehzahl	300 - 1000 Upm
Belüftung	1 vvm
Innendruck	100 mbar Überdruck

Tab. 9: Bedingungen in der Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium

Die Entwicklungsmöglichkeiten der Fedbatchtechnik zeigte schon ein erster Vorversuch, bei dem auf Grund von Offline-Messungen in NH_3 -limitierten Phasen Ammoniumsulfatlösung mit einer Spritze zugegeben wurde. Die Kultur wuchs wegen eines Fehlers beim Ansetzen des Vorkulturmediums erst nach einer langen lag-Phase an. Mit dem Einsetzen der pO_2 -Regulierung wurde 18 h 100 ml/h Glycerin zugepumpt. Die diskontinuierliche Ammoniumzugabe bewirkte, daß die Kultur neue Stickstoffquelle erhielt, aber dennoch schnell wieder limitiert wurde. Die Biotrockenmasse stieg dadurch auf 22,34 g/l und lag somit um ein Mehrfaches höher als bei Batch- oder kontinuierlicher Kultivierung. Damit verbunden war ein Anstieg der Proteaseaktivität auf 3733 PE/ml. Um die Produktionsphase zu verlängern, wurde dem Prozeß nach dem 4. Tag ein kontinuierlicher Ammoniumstrom von 4 mM/h zugeführt. Dadurch stieg jedoch der NH_3 -Gehalt über die limitierende Konzentration hinaus an, worauf *Bacillus licheniformis* die Proteasebiosynthese einstellte {Abb. 41}.

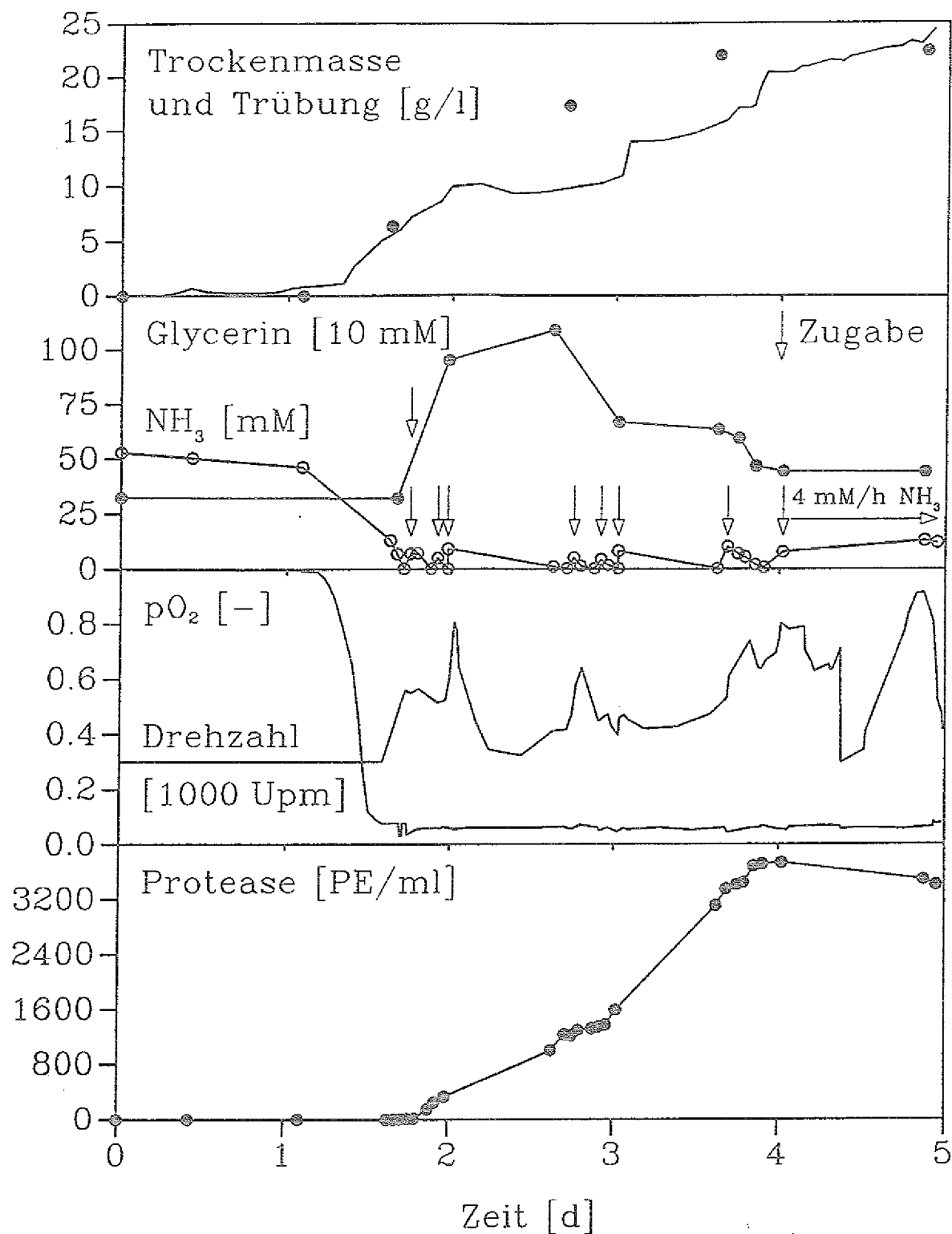


Abb. 41: Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin und Ammonium handreguliert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm

In der Folge wurden Fedbatchfermentationen durchgeführt, bei denen Glycerin und Ammoniumsulfatlösung kontinuierlich zugepumpt wurden. Die Pumprate wurde dabei nach Ergebnissen von Offline-Messungen eingestellt. Dieses Verfahren erwies sich für die C-Quelle als halbwegs brauchbar, da in erster Linie nur dafür gesorgt werden mußte, daß die Glycerinkonzentration nicht auf null absank oder auf zu hohe Werte anstieg. Die N-Quelle mußte dagegen gezielt in einem limitierenden Konzentrationsbereich gehalten werden. Ein Überdosieren von Ammoniumsulfat mußte auf jeden Fall vermieden werden. Die Nachfuhr durfte aber auch nicht zu gering ausfallen, da sonst die Subtilisinausbeute sank. Diese Anforderungen waren nur zu erfüllen, wenn der Ammoniumverbrauch direkt ausgeglichen wurde. Daher wurde eine Methode zur Online-Erfassung von Ammonium mit einer gassensitiven Ammoniak-Elektrode entwickelt [Kap. 3-10].

Wie schon besprochen [Kap. 3-15], trat bei der Online-Messung von Ammonium ein zeitlicher Verzug auf. Der ID-Kompensationsregler reagierte auf die Totzeit mit pulsartigen Schwingungen bei der kontinuierlichen Nachdosierung der Stickstoffquelle {Abb. 42}. Die daraus resultierenden Schwankungen im Ammoniumgehalt störten die Subtilisinbildung jedoch nicht nachhaltig.

Im typischen Verlauf einer derartigen Fermentation benötigte die Kultur mit dem Ende der Wachstumsphase kein weiteres Ammonium. In der anschließenden stationären Phase deckten die Mikroorganismen ihren Stickstoffbedarf vielmehr aus dem Abbau von Speicherstoffen wie z. B. Polyglutaminsäure oder durch Lysis abgestorbener Zellen. Mit zunehmender Fermentationsdauer akkumulierten Produkte, die den Stoffwechsel hemmten und das Absterben der Mikroorganismen begünstigten. Schließlich konnte die Kultur den durch Proteolyse aus lysierten Zellen und Speicherproteinen freigesetzten Stickstoff nicht mehr schnell genug verwerten. Mit dem raschen Anstieg des Ammoniumgehaltes endete dann die Proteasebiosynthese {Abb. 42}.

Während bei den Batchversuchen die Proteasebildung erst mit dem Ende der Wachstumsphase eintrat, setzte in Fedbatchfermentationen die Subtilisinproduktion schon während der Biomassevermehrung ein. Dies war eine Folge der von Beginn an eingehaltenen Ammonium-limitierung, die das exponentielle Wachstum verhinderte und den Eintritt in die stationäre Idiophase vortäuschte.

Die Fermentation {Abb. 42} lief nahezu während der gesamten Kultivierungsdauer nach dem angestrebten Konzept:

- Durch eine Regulierung der Rührerdrehzahl wurde der pO_2 -Wert bei minimal 5 % gehalten, wodurch eine Sauerstofflimitierung verhindert werden konnte.
- Ammonium wurde durch Online-Analyse kontrolliert nachdosiert, ohne die gewünschte N-Limitierung aufzuheben.
- Die Glycerinkonzentration wirkte niemals begrenzend, ohne auf allzu hohe Werte anzusteigen.

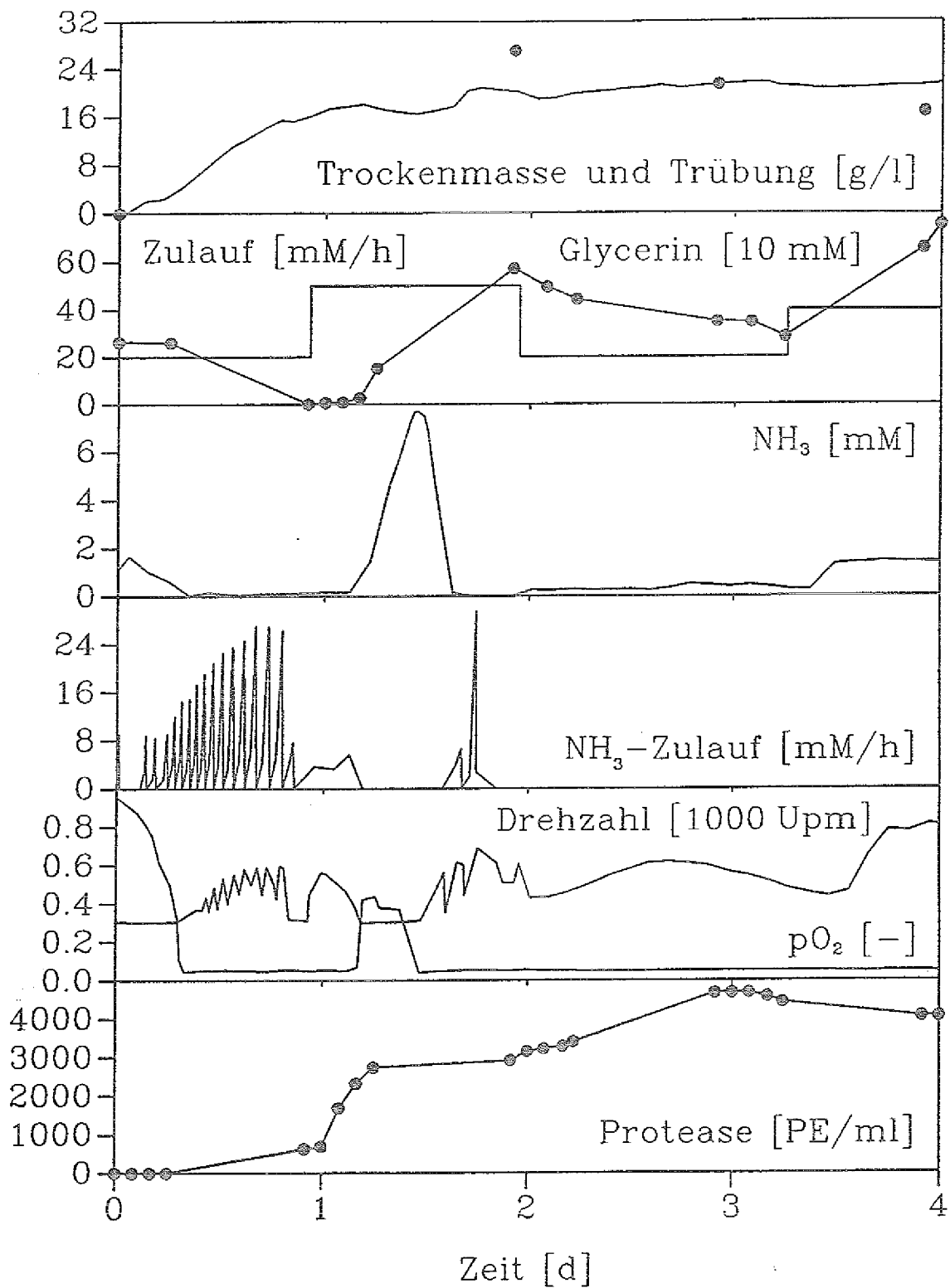


Abb. 42: Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin handreguliert, Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm

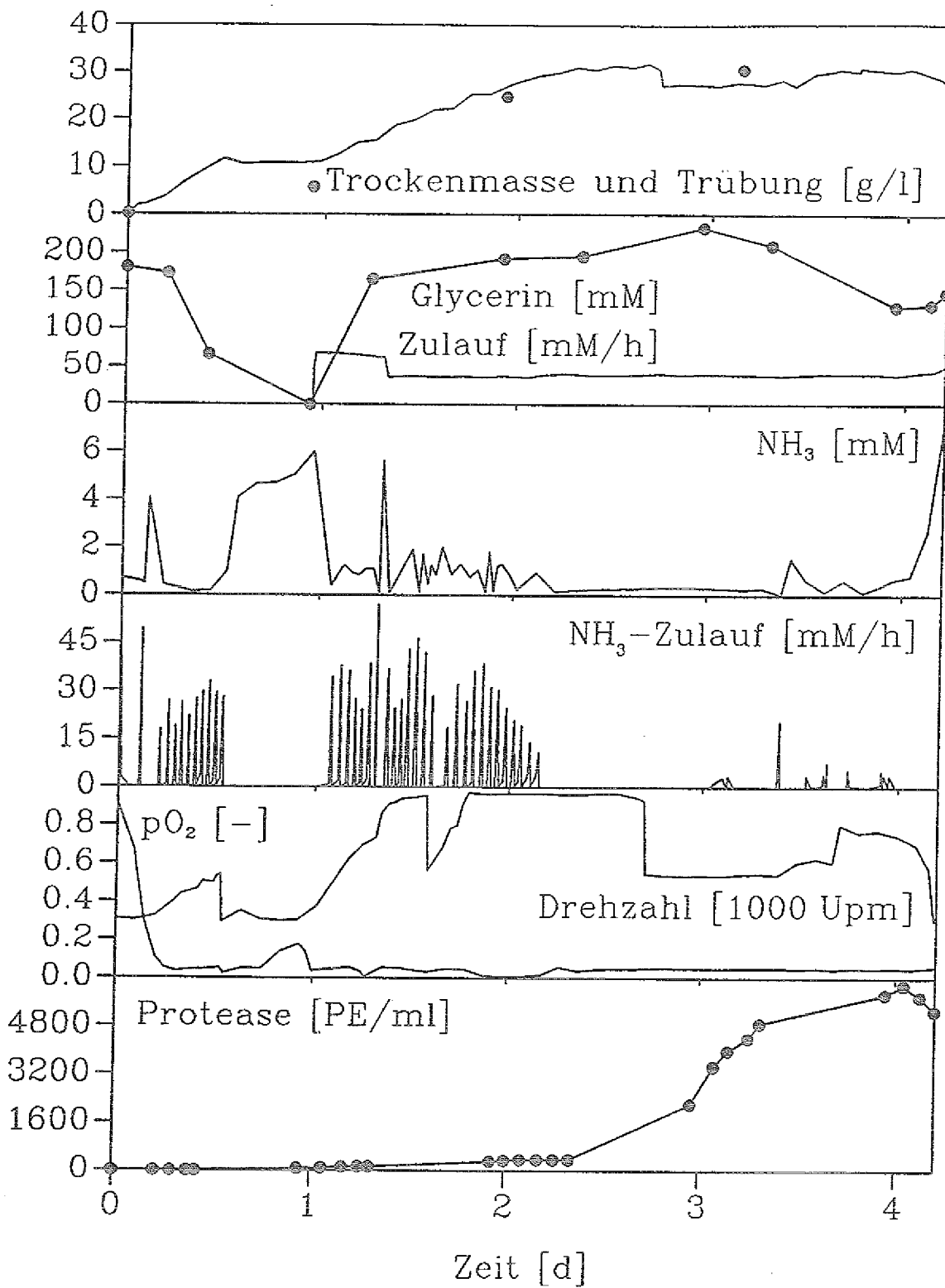


Abb. 43: Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin handreguliert, Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO_2 , 1 vvm

Aus den bisherigen Ergebnissen war bekannt, daß ein Überschuß an Glycerin das Wachstum und besonders die Enzymbiosynthese hemmte. Daher wurden in weiteren Fermentationen angestrebt, den Gehalt der C-Quelle niedrig, aber nicht begrenzend zu halten. Meist führte die Handregulierung der Versuche jedoch zu Limitationen, die bei längerer Dauer den Prozeß nachhaltig störten.

In einem Fedbatch konnte der Glyceringehalt auf einem relativ niedrigen Niveau gehalten werden. Dabei war nur in einer kurzen Phase die C-Quelle erschöpft {Abb. 43}. Unter diesen Bedingungen war die Substratüberschußinhibierung durch Glycerin kaum mehr wirksam. Im Vergleich zum gehemmten Prozeß {Abb. 42} war die Kultur wesentlich aktiver und verbrauchte deutlich mehr Sauerstoff, Ammonium und Glycerin. *Bacillus licheniformis* bildete unter diesen Voraussetzungen nahezu doppelt soviel Biomasse und produzierte mit 6161 PE/ml 30 % mehr Protease.

Der zwischenzeitliche Mangel wirkte sich trotz seiner Kürze störend auf den Prozeß aus. Im Gegensatz zum sonst üblichen Verlauf wurde Protease erst mit dem Eintritt in die stationäre Phase gebildet. Die produktive Periode war daher deutlich kürzer. Auch hier stieg mit dem Beginn der Sterbephase der Ammoniumgehalt rasch an, da der durch Zellysis und Abbau von Speicherproteinen freigesetzte Stickstoff nicht mehr verwertet werden konnte. Dieser Anstieg wurde zudem verstärkt, weil am Fermentationsende die Viskosität der Kulturbrühe so hoch war, daß kein kontinuierlicher Probefiltratstrom mehr gewonnen werden konnte. Stattdessen wurde der NH_3 -Analyse Luft zugeführt, wodurch ein zu niedriger Meßwert vorgetäuscht wurde {in Abb. 43 wurden in diesem Bereich Offline-Werte verwendet}, der zur Nachdosierung von Ammoniumsulfat führte. Durch das reichliche Angebot an leicht metabolisierbaren Stickstoffquellen wurde die Proteasebiosynthese eingestellt.

Die hohe Viskosität der Kulturbrühe war höchstwahrscheinlich auf die Bildung von Polyglutaminsäure zurückzuführen [13]. Dieses Produkt diente *Bacillus licheniformis* als Speicherstoff. Die Syntheserate war besonders hoch, wenn Glycerin und Ammonium im Überschuß vorlagen.

Die handregulierte Glycerinzufuhr besaß mehrere Nachteile:

- Je niedriger das angestrebte Niveau der C-Quelle lag, umso weniger konnte gewährleistet werden, daß die Glycerinkonzentration zu tief absank.
- Um Glycerinmangel zu vermeiden, mußte ein relativ hohes Konzentrationsniveau angestrebt werden.
- Die Schleimentwicklung war infolge des Glycerinüberangebotes relativ stark. Dadurch wurde die NH_3 -Analyse gestört.
- Der Glyceringehalt ließ sich nicht in einem definierten Bereich halten. Die Proteaseproduktion wurde davon stark beeinflusst.

Diese Probleme ließen sich nur durch Online-Analyse und -Regelung des Glyceringehaltes lösen. Die quasikontinuierliche Bestimmung wurde mittels Fließinjektionsanalyse durchgeführt [Kap. 3-11]. Der Flow-Injection-Analyzer bot zudem die Möglichkeit, gleichzeitig auch die Proteaseaktivität der Fermentationsbrühe zu verfolgen [Kap. 3-12].

Das Gesamtkonzept zur Proteaseproduktion durch Kultivierung von *Bacillus licheniformis* im Fedbatch umfaßte somit die Kontrolle aller wichtigen Edukte, also von Glycerin, von Ammonium und des Sauerstoffpartialdruckes der Fermentationsbrühe. Zugleich konnten mit der Biomasse und der Protease die bedeutendsten Produkte online erfaßt werden.

Bei der ersten derartigen Fermentation wurde die Online-Analyse von Glycerin am zweiten Versuchstag zugeschaltet {Abb. 44}. Die Fließinjektionsanalyse von Glycerin lieferte Ergebnisse, die geringfügig über den Offline-Werten lagen. Dies war vermutlich eine Folge mangelnder Spezifität der Glycerindehydrogenase, die demnach auch andere alkoholische Gruppen erfaßte. Die Tendenzen gab die kontinuierliche Glycerinanalyse jedoch richtig wieder {Abb. 44}.

Die Mikroorganismen waren so aktiv, daß nicht genügend Glycerin und Sauerstoff eingetragen werden konnten. Trotz maximaler Glycerinzufuhr blieb der Gehalt der C-Quelle lange Zeit sehr niedrig, ohne limitierend zu wirken. Einen Mangel an C-Substrat hätte einen Anstieg in der Ammoniumkonzentration nach sich gezogen, der jedoch nicht beobachtet werden konnte {Abb. 44}.

Da keinerlei Inhibierung durch Glycerin mehr vorlag, stieg die Biomasse auf fast 38 g/l. Die Proteaseausschüttung konnte noch einmal leicht auf 6273 PE/ml gesteigert werden. Der Gehalt an Subtilisin Carlsberg wurde durch Fließinjektionsanalyse online erfaßt und auf die Offline-Messungen eingeeicht. Die Werte korrelierten jedoch nicht all zu gut, da sich zumindest in diesem Versuch die Fördercharakteristiken der Pumpschläuche und damit die Eichfaktoren stark änderten. Dieses Problem ließe sich nur durch die Verwendung acetonbeständiger Pumpen wie z. B. Kolbenpumpen lösen.

Auch in diesem Versuch traten infolge des Meßverzugs bei der NH_3 -Analyse Pulse bei der Nachdosierung von Ammonium auf. Dadurch entstanden Spitzen im Ammoniumgehalt, die die Stoffwechselaktivität und somit den Sauerstoffbedarf bzw. die daraus folgende Rührerdrehzahl modulierten {Abb. 44}.

Das Ende von Wachstum und Proteasebiosynthese wurde durch den nachlassenden Bedarf an C- und N-Quelle angezeigt:

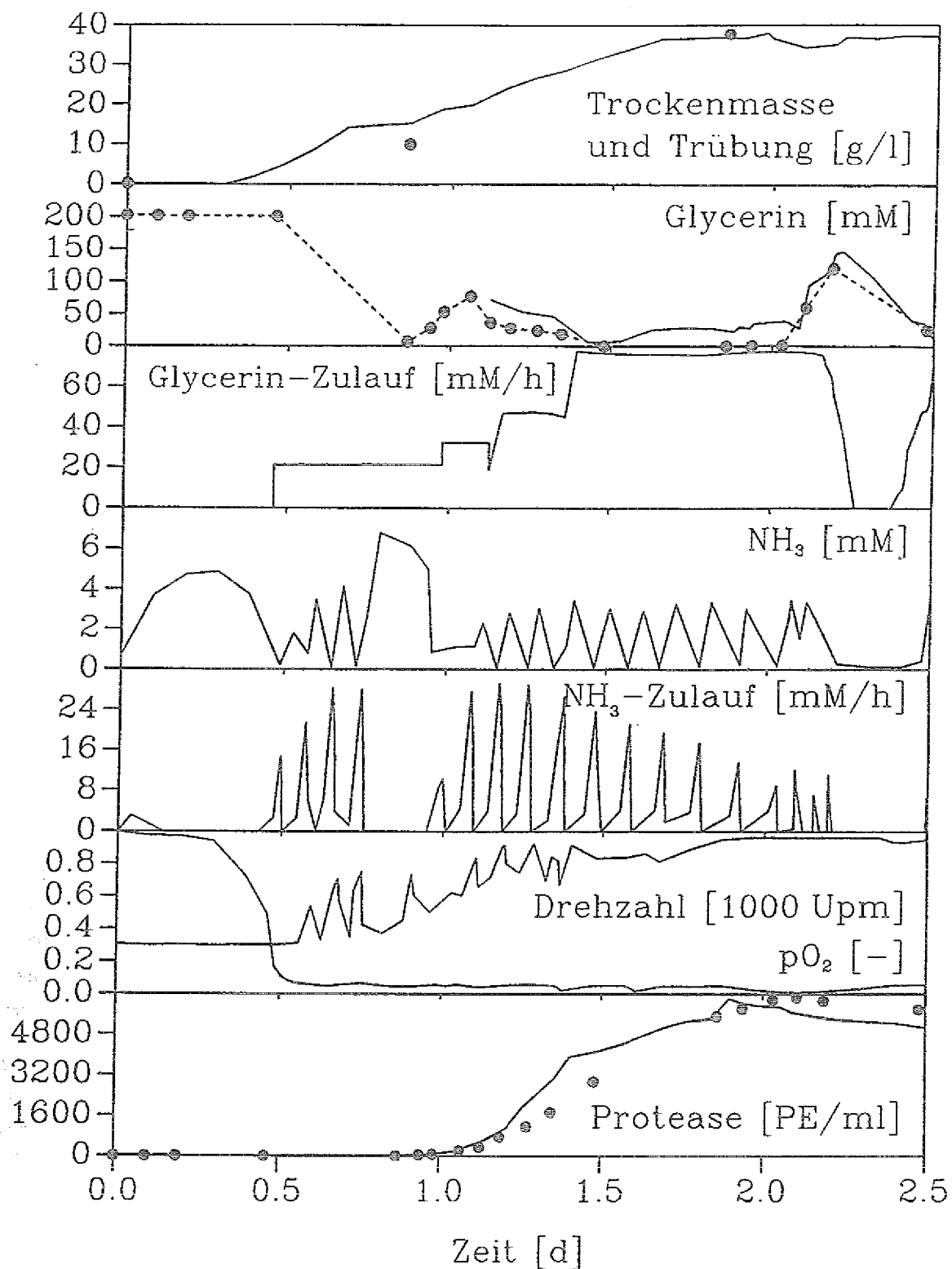


Abb. 44: Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin und Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO₂, 1 vvm

In einem abschließenden Experiment wurde das Gesamtkonzept über den ganzen Fermentationsverlauf noch einmal verwirklicht.

Die Fließinjektionsanalyse von Glycerin gab die Offline-Analyse nur tendenziell wieder. Bis auf zwei kurze Phasen ohne C-Quelle reichte das Signal aber aus, um den Glyceringehalt um das mit 50 mM sehr niedrig angesetzte Soll schwingen zu lassen.

Die kontinuierliche Erfassung der Ammoniumkonzentration konnte mit der modifizierten gassensitiven Ammoniak elektrode reproduzierbar durchgeführt werden. Wegen der Empfindlichkeit der Teflonmembran empfahl es sich jedoch, mit einer Referenzelektrode den Prozeß sicherer zu gestalten. Der große Zeitverzug bewirkte eine pulsartige Nachdosierung von Ammonium, ohne jedoch merkliche Nachwirkungen auf die Proteasebiosynthese zu haben.

Der Sauerstoffpartialdruck der Fermentationsbrühe ließ sich mit einer pO_2 -Elektrode verzögerungsfrei messen. Es bereitete daher auch keine Schwierigkeiten durch Drehzahlregulierung den pO_2 -Wert bei minimal 5 % zu halten.

Somit ließen sich alle wichtigen Substrate online erfassen und regeln. Der Prozeß wurde durch die kontinuierliche Bestimmung der Biomasse/Trübung und des Proteasegehaltes abgerundet. Insbesondere die Online-Analyse der Protease zeigte gute Deckung mit den Offline-Werten. Aber auch in diesem Versuch entstanden viskose Stoffwechselprodukte, die es mit zunehmender Dauer erschwerten, laufend Probefiltrat für die externen Online-Analysen zu ziehen. Somit traten nach zwei Tagen größere Abweichungen zu den Offline-Daten auf.

Während der Fermentation setzte die Kultur bis zum Prozeßoptimum bei 46,2 Stunden 79,85 g/l Glycerin und 10,30 g/l Ammoniumsulfat zu 1,21 g/l Subtilisin Carlsberg, 17,2 g/l Biotrockenmasse und anderen Produkten um. Es entstand somit deutlich weniger Zellmasse als in den vorangegangenen Fedbatchversuchen. Die Bedingungen waren jedoch für die Exoenzymbiosynthese so günstig, daß mit 5368 PE/ml nur unbedeutend weniger Protease gebildet wurde. Aus den Versuchsergebnissen lassen sich die wichtigsten Daten der Fedbatchkultur ableiten. Die Stickstoffbilanz wird durch Protease und Biomasse gedeckt. In der Kohlenstoffbilanz fehlen dagegen 71 %, da mit Kohlendioxid ein Hauptprodukt nicht erfaßt wurde {Tab. 10}:

Größe	Protease	Biomasse
Ausbeute	1,21 g/l	17,2 g/l
Raumzeitausbeute	0,63 g/(l·d)	8,94 g/(l·d)
Kohlenstoffselektivität	2,0 %	26,9 %
Stickstoffselektivität	9,4 %	89,8 %

Tab. 10: Daten einer Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium

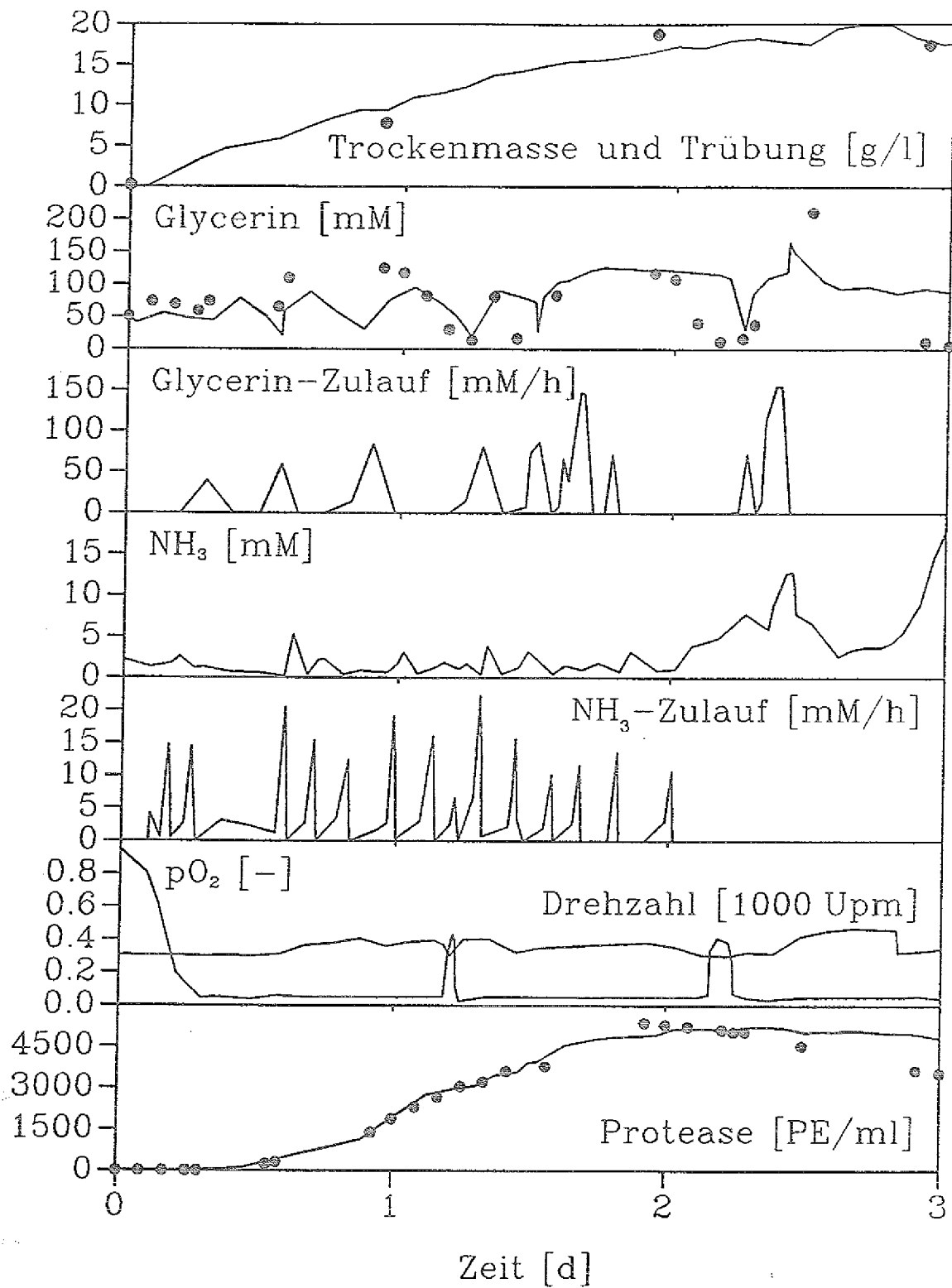


Abb. 45: Fedbatchkultur mit dem Glycerinmedium, Glycerin und Ammonium rechnergesteuert, 39°C, pH 7, minimal 5 % pO₂, 1 vvm

5-0 Zusammenfassung

Als Hochleistungsproduzent der alkalischen Serinprotease Subtilisin Carlsberg diente *Bacillus licheniformis* DSM 641. Die Untersuchungen fanden in einem proteinhaltigen Komplexmedium und einem neu entwickelten Mineralmedium statt.

In einer theoretischen Abhandlung wurden unterschiedliche Kultivierungsformen formal behandelt.

Mit dem Komplexmedium konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Das ursprüngliche Proteinmedium wurde 1:4 verdünnt, da es sonst zu zähflüssig war. Seine Zusammensetzung war in allen Komponenten optimal. Das Stärkehydrolysat diente als C-Quelle und das Ammonium als primäre N-Quelle. Den proteingebundenen Stickstoff aus Casein, Sojamehl und Maisquellwasser konnte *Bacillus licheniformis* nur durch die Ausschüttung von Protease verwerten.
- Es bereitete Schwierigkeiten, das Medium in reproduzierbarer Qualität herzustellen, obwohl alle Zubereitungsschritte möglichst identisch durchgeführt wurden.
- In der Chemostatkultur konnte bei 1 d Verweilzeit bis zu 20 Tage lang eine Proteaseausschüttung auf einem Niveau von 1000 - 1500 PE/ml erzielt werden. Höhere Durchflußraten dagegen reprimierten die Exoenzymsynthese.
- Problematisch für die kontinuierliche Reaktionsführung erwies sich die mangelnde Stammstabilität. Der die Protease bildende Originalstamm wurde von einer Mutante verdrängt, die keine extrazellulären Enzyme bildete.

Wegen der Schwierigkeiten mit dem Komplexmedium wurde ein mineralisches Medium entwickelt, das Glycerin als Kohlenstoff- und Ammonium als Stickstoffquelle enthielt. Die einfache Zusammensetzung erlaubte es, die wichtigsten Einflußgrößen der Proteasebiosynthese zu erkennen und in einem Produktionsprozeß zu nutzen:

■ Glycerin als primäre C-Quelle:

- Mangel limitierte das Wachstum. Der Organismus stellte seinen Stoffwechsel auf Sekundärsubstrate um. Die Proteaseproduktion kam zum Erliegen.
- Überschuß inhibierte das Wachstum leicht und die Proteasebiosynthese stark und führte zur Bildung von Speicherstoffen, die als Schleim die Prozeßüberwachung störten.
- » Die Glycerinkonzentration von Kulturfiltrat wurde durch Fließinjektionsanalyse bestimmt. Durch geregelte Nachdosierung wurde im Fermenter ein Gehalt von 20 - 100 mM angestrebt.

■ Ammoniumsulfat als primäre N-Quelle:

- Mangel begrenzte zwar das Wachstum. Die Abwesenheit leicht metabolisierbarer N-Substrate war aber zugleich Voraussetzung für die Dereprimierung der Proteasebiosynthese.
- Überschuß führte zur Repression der Proteasebildung, inhibierte leicht das Wachstum und bewirkte die Produktion von schleimigen Speicherstoffen.
- » Die Ammoniumkonzentration von Kulturfiltrat wurde mit einer modifizierten gassensitiven Ammoniak elektrode erfaßt. Durch gezielte Zufuhr wurde in der Fermentationsbrühe ein Gehalt unter 2 mM Ammonium eingestellt.

■ Sauerstoffzufuhr:

- Mangel limitierte das Wachstum und unterdrückte die Proteasebiosynthese.
- Überschuß förderte die Wachstumsrate, steigerte jedoch den maintenance-Bedarf und senkte somit die Proteaseausbeute.
- » Der mit einer pO_2 -Elektrode inline erfaßte Sauerstoffpartialdruck der Fermentationslösung wurde durch Rührerdrehzahlregulierung beim Optimum von 5 % gehalten.

■ Online-Produktanalysen:

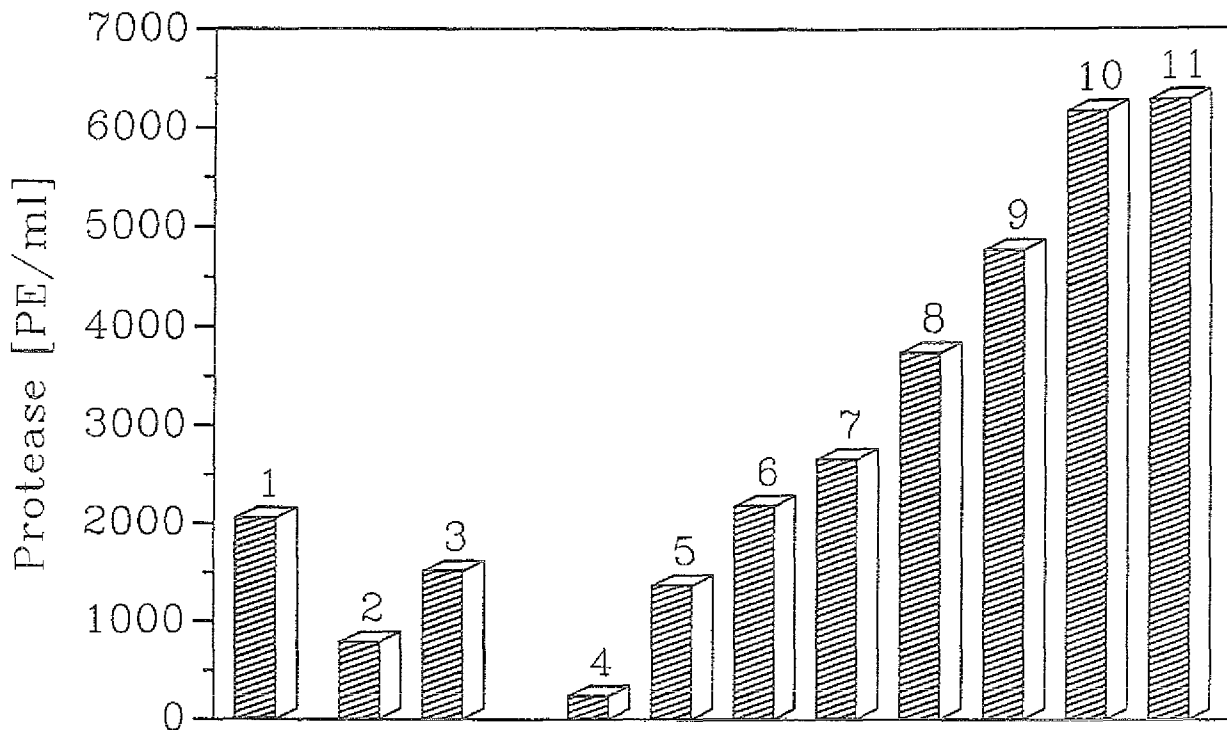
- Die Biomasse wurde inline durch eine Trübungssonde erfaßt.
- Die alkalische Serinprotease im Kulturfiltrat wurde als Zielprodukt durch Fließinjektionsanalyse bestimmt.

■ Regelkonzept:

- Für die rechnergesteuerte Nachdosierung von Edukten wurde ein integraler differentialer Kompensationsregler entwickelt.
- Bei verzögerungsfreien Analysen wie z. B. dem pO_2 -Wert arbeitete der Regler stabil.
- Bei totzeitbehafteten Prozessen wie z. B. Glycerin- und Ammoniumanalyse traten Regelschwingungen auf.
- In einer Fedbatchsimulation konnte gezeigt werden, daß derartige Regelschwingungen vermieden werden können, wenn die Intervalldauer eines Anpassungszyklus dreimal länger als die Meßzeitverzögerung ist.

Im Fedbatch konnte durch die kontrollierte Nachdosierung aller wichtigen Substrate gegenüber der Batchkultur eine fünffache Ausbeutesteigerung erzielt werden. Im Vergleich zum proteinhaltigen Komplexmedium ließ sich im mineralischen Glycerinmedium der Gehalt von Subtilisin Carlsberg um das Dreifache steigern.

Eine abschließende Übersicht {Abb. 46} faßt den Fortschritt in der Proteasegewinnung noch einmal zusammen:



- 1) Batchkultur, originales, also vierfach konzentriertes Proteinmedium, pH-ungeregelt, 39°C, 700 Upm, 1,5 vvm
- 2) Batchkultur, modifiziertes Proteinmedium, pH 7, 39°C, 700 Upm, 1 vvm
- 3) Chemostatkultur, Proteinmedium, 1 d Verweilzeit, pH 7, 39°C, 700 Upm, 1 vvm
- 4) Batchkultur, 0,2 M Glycerin, 0,05 M NH₃, pH-ungeregelt, 39°C, 700 Upm, 1 vvm
- 5) Batchkultur, 0,65 M Glycerin, 0,05 M NH₃, pH 7, 39°C, 300 Upm, 1 vvm
- 6) Chemostatkultur, 1 d Verweilzeit, 0,5 M Glycerin, 0,15 M NH₃, pH 7, 39°C, minimal 5 % pO₂, minimal 300 Upm, 1 vvm
- 7) NH₃-Auxostatkultur, 0,5 M Glycerin, 0,15 M NH₃, pH 7, 39°C, minimal 5 % pO₂, minimal 300 Upm, 1 vvm
- 8) Fedbatchkultur, Glycerin und NH₃ manuell, pH 7, 39°C, minimal 5 % pO₂, minimal 300 Upm, 1 vvm
- 9) Fedbatchkultur, Glycerin manuell, NH₃ Rechner, pH 7, 39°C, minimal 5 % pO₂, minimal 300 Upm, 1 vvm
- 10) Fedbatchkultur, Glycerin manuell, NH₃ Rechner, pH 7, 39°C, minimal 5 % pO₂, minimal 300 Upm, 1 vvm
- 11) Fedbatchkultur, Glycerin und NH₃ Rechner, pH 7, 39°C, minimal 5 % pO₂, minimal 300 Upm, 1 vvm

Abb. 46: Stadien der Proteaseproduktion mit *Bacillus licheniformis*

6-0 Literatur

- [1] Anson M. L.;
The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain, and Cathepsin
with Hemoglobin;
J. Gen. Physiol. 22; 79 - 89; 1938
- [2] Aunstrup K., Andresen O., Falch E. A., Nielsen T. K.;
Production of Microbial Enzymes;
Microbial Technology 1; Academic Press; 281 - 309; 1979
- [3] Bender M. L., Begue-Canton M. L., Blakeley R. L., Bru-
bacher L. J., Feder H., Gunter C. R., Kezdy F. J., Kill-
heffer J. V., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W.,
Stoops J. K.;
The Determination of the Concentration of Hydrolytic
Enzyme Solutions: α -Chymotrypsin, Trypsin, Papain, Elas-
tase, Subtilisin, and Acetylcholineesterase;
J. Am. Chem. Soc. 88; 5890 - 5913; 1966
- [4] Berger H., Goebel W., Kreft J., Bartnik F.;
Alkalische Protease,
Verfahren zur Herstellung von Hybridvektoren und gene-
tisch transformierte Mikroorganismen;
Deutsche Offenlegungsschrift DE 3527913 A1; 1985
- [5] Bergter F.;
Wachstum von Mikroorganismen
Experimente und Modelle;
2. Auflage; Verlag Chemie; 1983
- [6] Bernlohr R.W., Saha A. L., Young C. C., Toth B. R., Gol-
den K. J.;
Nutrient-Stimulated Methylation of a Membrane Protein in
Bacillus licheniformis;
J. Bacteriol. 170 (9); 4113 - 4118; 1988
- [7] Bierbaum G.;
interner Jahresbericht;
IBT 2, KFA Jülich; 1988
- [8] Bierbaum G.;
interner Jahresbericht;
IBT 2, KFA Jülich; 1989

- [9] Bobel G., Dobberstein B.;
Transfer of Proteins Across Membranes
I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed
Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound
Ribosomes of Murine Myeloma;
J. Cell Biol. 67; 835 - 851; 1975
- [10] Bobel G., Walter P., Chang C. N., Goldman B. M., Erickson
A. H., Lingappa V. R.;
Translocation of proteins across membranes:
the signal hypothesis and beyond;
Symposia of the Society for Experimental Biology 33,
Secretory Mechanisms; 9 -36 ; 1979
- [11] Bosmann H. B.;
Elevated Glycosidases and Proteolytic Enzymes in Cells
Transformed by RNA Tumor Virus;
Biochim. Biophys. Acta 264; 339 - 343; 1972
- [12] Braun Diessel AG;
Betriebsanleitung Biostat E Fermenter; 1983
- [13] Bulthuis B. A., Frankena J., Koningstein G. M., van Ver-
seveld H. W., Stouthamer A. H.;
Instability of protease production in a rel^+/rel^- -pair of
Bacillus licheniformis and associated morphological and
physiological characteristics;
Antonie van Leeuwenhoek 54; 95 - 111; 1988
- [14] Chaloupka J., Severin A. I., Sastry K. J., Kucerová H.,
Strnadová M.;
Differences in the regulation of exocellular proteinase
synthesis during growth and sporogenesis of *Bacillus*
megaterium;
Can. J. Microbiol. 28; 1214 - 1218; 1982
- [15] Chaloupka J.;
Regulation of the Synthesis of Extracellular Proteinases
in *Bacilli*;
FEMS Symp. 23; 287 - 293; 1985
- [16] Cherdyntseva T. A., Razin'kov V. K., Egorov N. S.;
Biosynthesis by *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*
of an Extracellular Protease Exhibiting Coagulase Acti-
vity and Formed under Conditions of Limitation of the
Medium by Nitrogen Sources;
Microbiology 51; 356 - 360; 1982

- [17] Dawson P. S. S.;
Continuous Synchronous Culture - The Production of Extra-cellular Enzymes by Continuous Phased Culture of *Bacillus subtilis*;
Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today; 121 - 128; 1972
- [18] Dellweg H.;
Biotechnologie
Grundlagen und Verfahren;
VCH; 1987
- [19] Egorov N. S., Vybornykh S. N., Loriya Z. K., Fishinger Z.;
Repression of Exoprotease Synthesis;
Microbiology 52 (6); 743 - 746; 1984
- [20] Eggstein M., Kuhlmann E.;
Triglyceride und Glycerin;
Herausgeber: Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Graßl M.;
Methods of Enzymatic Analysis 2;
Samples, Reagents, Assessment of Results;
3. Auflage; Verlag Chemie; 1871 - 1877; 1983
- [21] Einsele A., Finn R. K., Samhaber W.;
Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik
Eine Einführung;
VCH; 1985
- [22] Fink A. L.;
Acyl Group Transfer - The Serine Proteinases;
Herausgeber: Page M. I., Williams A.;
Enzyme Mechanisms;
Royal Society of Chemistry; 159 - 177; 1987
- [23] Folin O., Ciocalteau V.;
On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins;
J. Biol. Chem. 73; 627 - 650; 1927
- [24] Frankena J., van Verseveld H. W., Stouthamer A. H.;
A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*;
Appl. Microbiol. Biotechnol. 22; 169 - 176; 1985
- [25] Frankena J., Koningstein G. M., van Verseveld H. W., Stouthamer A. H.;
Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*;
Appl. Microbiol. Biotechnol. 24; 106 - 112; 1986

- [26] Gisslow M. T., McBride B. C.;
A Rapid Sensitive Collagenase Assay;
Anal. Biochem. 68; 70 - 78; 1975
- [27] Gist-Brocades;
Maxatase Prills für die Waschmittelindustrie
- [28] Gross R., Aricò B., Rappuoli R.;
Families of bacterial signal-transducing proteins;
Molecular Microbiol. 3 (11); 1661 - 1667; 1989
- [29] Grunow R.;
Synthese von extrazellulären Enzymen durch *Bacillus*-Zellen - genetische Grundlagen und Möglichkeiten über Beeinflussung;
Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR, Abt. Math. Naturwiss./Technik (3N, Mikrob. Enzymprod.); 77 - 122; 1981
- [30] Güntelberg A. V., Ottesen M.;
Preparation of Crystals containing the Plakalbumin-forming Enzyme from *Bacillus subtilis*;
Nature 170; 802; 1952
- [31] Hagihara B.;
Annual Reports of Scientific Works of the Faculty of science of Osaka University 2; 35 - 38; 1954
- [32] Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K.;
Crystalline Bacterial Proteinase
I. Preparation of Crystalline Proteinase of *Bac. subtilis*;
J. Biochem. 45 (3); 185 - 194; 1958
- [33] Hanlon G. W., Hodges N. A.;
Requirement for glucose during production of extracellular serine protease by cultures of *Bacillus licheniformis*;
FEMS Microbiol. Letters 11; 51 - 54; 1981
- [34] Hanlon G. W., Hodges N. A.;
Bacitracin and Protease Production in Relation to Sporulation During Exponential Growth of *Bacillus licheniformis* on Poorly Utilized Carbon and Nitrogen Sources;
J. Bacteriol. 147 (2); 427 - 431; 1981
- [35] Hanlon G. W., Hodges N. A., Russel A. D.;
The Influence of Glucose, Ammonium and Magnesium Availability on the Production of Protease and Bacitracin by *Bacillus licheniformis*;
J. Gen. Microbiol. 128; 845 - 851; 1982

- [36] Heineken F. G., O'Connor R. J.;
Continuous Culture Studies on the Biosynthesis of
Alkaline Protease, Neutral Protease and α -Amylase by
Bacillus subtilis NRRL-B3411;
J. Gen. Microbiol. 73; 35 - 44; 1972
- [37] Ikeda S., Tobe S., Niwa K., Ishizaki A., Hirose Y.;
Production of Alkaline Protease from Acetic Acid;
Agr. Biol. Chem. 38 (12); 2317 - 2322; 1974
- [38] Ikemura H., Takagi H., Inouye M.;
Requirement of Pro-sequence for the Production of Active
Subtilisin E in *Escherichia coli*;
J. Biol. Chem. 262 (16); 7859 - 7864; 1987
- [39] Isermann R.;
Digitale Regelsysteme, Band I und II;
2. Auflage; Springer Verlag; 1988
- [40] Jacobs M, Eliasson M., Uhlén M., Flock J.-I.;
Cloning sequencing and expression of subtilisin Carlsberg
from *Bacillus licheniformis*;
Nucleic Acids Research 13; 8913 - 8927; 1985
- [41] Jensen D. E.;
Continuous Production of Extracellular Protease by *Bacil-
lus subtilis* in a Two-Stage Fermentor;
Biotechnol. Bioeng. 14; 647 - 662; 1972
- [42] Karlson P.;
Kurzes Lehrbuch der Biochemie;
13. Auflage; Georg Thieme Verlag; 1988
- [43] Knippers R.;
Molekulare Kinetik;
4. Auflage; Georg Thieme Verlag; 1985
- [44] Kole M. M., Draper I., Gerson D. F.;
Production of Protease by *Bacillus subtilis* Using Simul-
taneous Control of Glucose and Ammonium Concentrations;
J. Chem. Tech. Biotechnol. 41; 197 - 206; 1988
- [45] Kroner K. H., Kula M.-R.;
On-Line Measurement of Extracellular Enzymes During Fer-
mentation by Using Membrane Techniques;
Anal. Chim. Acta 163; 3 - 15; 1984
- [46] Kroner K. H., Stach W., Kuhlmann W.;
Kontinuierliches Probenahmeverfahren für die Bioprozeß-
analytik;
Chem. Tech. 15 (9); 74 - 77; 1986

- [47] Kula, M.-R.;
Enzyme;
Herausgeber: Präve P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D.
A.;
Handbuch der Biotechnologie;
3. Auflage; Oldenbourg Verlag; 395 - 428; 1987
- [48] Kunitz M.;
Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor;
J. Gen. Physiol. 30; 291 - 310; 1947
- [49] Lambert R., Edwards J., Anstee D. J.;
A Simple Method for the Standardization of Proteolytic
Enzymes Used in Blood Group Serology;
Med. Lab. Sci. 35; 233 - 238; 1978
- [50] Lehninger A. L.;
Biochemie;
2. Auflage, VCH; 1985
- [51] Leisola M., Ojamo H., Kauppinen V.;
Automatic monitoring of protease activity during fermentation;
Enzyme Microb. Technol. 1; 51 - 52; 1979
- [52] Lin E. C. C., Magasanik B.;
The Activation of Glycerol Dehydrogenases from *Aerobacter aerogenes* by Monovalent Cations;
J. Biol. Chem. 235; 1820 - 1823
- [53] Luedeking S., Piret E. L.;
A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH;
J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 1; 393 - 412; 1959
- [54] Memmert K.;
Kontinuierliche Xylanaseproduktion mit *Bacillus amyloliquefaciens*;
Dissertation Technische Universität Berlin;
Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Jül-2132; 1987
- [55] Monod J.;
Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes;
Hermann & Cie.; 1942
- [56] Monod J.;
La technique de culture continue. Théorie et Application;
Ann. Inst. Pasteur 79; 390 - 410; 1950

-
- [57] Moore G. L.;
Use of Azo-Dye-Bound Collagen to Measure Reaction Velocities of Proteolytic Enzymes;
Anal. Biochem. 32; 122 - 127; 1969
- [58] Moser A.;
Bioprozeßtechnik
Berechnungsgrundlagen der Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse;
Springer-Verlag; 1981
- [59] Nakane A.;
Proteases Produced by a Proteolytic Mutant of *Clostridium botulinum* type E;
J. Gen. Microbiol. 107; 85 - 91; 1978
- [60] Nehete P. N., Shah V. D., Kothari R. M.;
Profiles of Alkaline Protease Production as a Function of Composition of the Slant, Age, Transfer and Isolate Number and Physiological State of Culture;
Biotech. Letters 7 (6); 413 - 418; 1985
- [61] Nelson W. L., Ciaccio E. I., Hess G. P.;
A Rapid Method for the Quantitative Assay of Proteolytic Enzymes;
Anal. Biochem. 2; 39 - 44; 1961
- [62] Ottesen M., Spector A.;
A Comparison of Two Proteinases from *Bacillus subtilis*;
Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 32; 63 - 74; 1960
- [63] Ottesen M., Svendsen I.;
The Subtilisins;
Herausgeber: Perlmann G. E.;
Methods in Enzymology XIX;
Proteolytic Enzymes;
Academic Press; 199 - 215; 1970
- [64] Ottesen M., Svendsen I.;
Subtilisin;
Herausgeber: Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Graßl M.;
Methods of Enzymatic Analysis 5, Enzymes 3;
Peptidases, Proteinases and Their Inhibitors;
3. Auflage; Verlag Chemie; 159 - 163; 1984

- [65] Perego M., Spiegelman G. B., Hoch J. A.;
Structure of the gene for the transition state regulator,
abrB: regulator synthesis is controlled by the *spo0A*
sporulation gene in *Bacillus subtilis*;
Mol. Microbiol. 2 (6); 689 - 699; 1988
- [66] Prestidge L., Gage V., Spizizen J.;
Proteases Activities during the Course of Sporulation in
Bacillus subtilis;
J. Bacteriol. 107; 815 - 823; 1971
- [67] Priest F. G.;
Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*;
Bacteriological Reviews 41 (3); 711 - 753; 1977
- [68] Priest F. G.;
Enzyme Synthesis:
Regulation and Process of Secretion by Microorganisms;
Herausgeber: Fogarty W. M.;
Microbial Enzymes and Biotechnology;
Applied Science Publishers; 319 - 366; 1983
- [69] Riedel K.;
Nucleosidpolyphosphate:
Vorkommen, Metabolismus und Funktion;
Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie 23 (2); 103 -
141; 1983
- [70] Rinderknecht H., Geokas M. L., Silverman P., Haverback B.
J.;
A New Ultrasensitive Method for the Determination of
Proteolytic Activity;
Clin. Chim. Acta 21; 197 - 203; 1968
- [71] Rudde H.;
Enzymatische On-line Bestimmung von Glycerin mittels
Fließinjektionsanalyse;
Diplomarbeit Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich;
1990
- [72] Ruzicka J., Hansen E. H.;
Flow-Injection-Analysis;
2. Auflage; John Wiley & Sons, New York; 1988
- [73] Schindler;
Persönliche Mitteilung;
Henkel KGaA; 1988
- [74] Schlegel H. G.;
Allgemeine Mikrobiologie;
6. Auflage; Georg Thieme Verlag; 1985

- [75] Schubert Wright C., Alden R. A., Kraut J.;
Structure of Subtilisin BPN' at 2.5 Å Resolution;
Nature 221; 235 - 242; 1969
- [76] Schügerl, K.;
Bioreaktionstechnik Band 1
Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozeßführung;
1. Auflage; Salle und Sauerländer; 1985
- [77] Schürbüscher D.;
Rechnergestützte Optimierung und Prozeßführung kontinuierlicher biotechnologischer Prozesse untersucht am Beispiel der anaeroben Abwasserreinigung;
Dissertation Technische Hochschule Aachen;
Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Jül-2325; 1989
- [78] Smith E. L., DeLange R. J., Evans W. H., Landon M., Markland F. S.;
Subtilisin Carlsberg
V. The Complete Sequence;
Comparison with Subtilisin BPN';
Evolutionary Relationships;
J. Biol. Chem. 243 (9); 2184 - 2191; 1968
- [79] Spohn U.;
Persönliche Mitteilungen;
Biotechnikum, WB Bioprozeßtechnik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 1989
- [80] Stent G. S., Brenner S.;
A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 17; 2005 - 2014; 1961
- [81] Strauch M. A., Perego M., Burbulys D., Hoch J. A.;
The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth;
Mol. Microbiol. 3 (9); 1203 - 1209; 1989
- [82] Todd E. W.;
Quantitative Studies on the Total Plasmin and the Trypsin Inhibitor of Human Blood Serum;
J. Exptl. Med. 89; 295 - 308; 1949
- [83] Viccaro J. P.;
Alkalische Protease und diese enthaltende Wasch- und Reinigungsmittel;
Deutsche Offenlegungsschrift 2044161; 1971

- [84] Viehweg;
Persönliche Mitteilung;
Henkel KGaA; 1986
- [85] Walter H. E.;
Method with Haemoglobin, Casein and Azocoll as Substrate;
Herausgeber: Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Graßl M.;
Methods of Enzymatic Analysis 5, Enzymes 3;
Peptidases, Proteinases and Their Inhibitors;
3. Auflage; Verlag Chemie; 270 - 277; 1984
- [86] Ward P. O.;
Proteinases;
Herausgeber: Fogarty W. M.;
Microbial Enzymes and Biotechnology;
Applied Science Publishers; 251 - 317; 1983
- [87] Webb E. C., International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee;
Enzyme Nomenclature 1984;
Academic Press; 1984
- [88] Weis;
Persönliche Mitteilung;
Henkel KGaA; 1981
- [89] Welker N. E., Campbell L. L.;
Induction of α -Amylase of *Bacillus stearothermophilus* by Maltodextrines;
J. Bacteriol. 86; 687 - 691; 1963
- [90] Wells J. A., Ferrari E., Henner D. J., Estell D. A., Chen E. Y.;
Cloning, sequencing, and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*;
Nucleic Acids Research 11 (22); 7911 - 7924; 1983
- [91] Wicker U.;
Isolierung und Charakterisierung einer thermostabilen Xylanase von *Bacillus stearothermophilus*;
Dissertation Universität Düsseldorf; 1984
- [92] Wong S.-L., Doi R. H.;
Determination of the Signal Peptidase Cleavage Site in the Preprosubtilisin of *Bacillus subtilis*;
J. Biol. Chem. 261 (22); 10176 - 10181; 1986

-
- [93] Wouters J. T. M., Buysman P. J.;
Production of some exocellular enzymes by *Bacillus licheniformis* 749/C in chemostat cultures;
FEMS Letters 1; 109 - 112; 1977
- [94] Wunderwald P.;
Proteinases (Proteins as Substrates);
Herausgeber: Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., Graßl M.;
Methods of Enzymatic Analysis 5, Enzymes 3;
Peptidases, Proteinases and Their Inhibitors;
3. Auflage; Verlag Chemie; 258 - 270; 1984
- [95] Zucca J., Balassa G., Sousa J. C. F., Silva M. T.;
Genetic Instability of Sporulation-associated Characters
in a *Bacillus subtilis* Mutant: Relationship between Sporulation, Segregation and the Synthesis of Extracellular Enzymes (Kinetic Studies);
J. Gen. Microbiol. 112; 283 - 296; 1979
- [96] Zurmühl R.;
Praktische Mathematik für Ingenieure und Physiker;
417 - 425; 5. Auflage; Springer-Verlag; 1965

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums KFA Jülich erstellt. Sie wurde im Rahmen des BMFT/DECHEMA-Stipendiums »Angewandte Biologie und Biotechnologie« gefördert.

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. C. Wandrey, Direktor am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums KFA Jülich, für die Übernahme des Hauptreferates, die Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetes Interesse,
- Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier, Institut für organische Chemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für die Übernahme des Korreferates,
- Frau Dr. G. Bierbaum für die gute Zusammenarbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht der Arbeit,
- Herrn M. Karutz für seine Hilfe bei den Fermentations- und Laborarbeiten und seine kritische Durchsicht der Arbeit,
- Herrn H. Rudde und Herrn Dr. U. Spohn für ihre Arbeiten bei der Fließinjektionsanalyse von Glycerin,
- Herrn H. Mentzel für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Betreuung der Fermenter,
- Herrn M. Dautzenberg, Frau H. Krahpohl, Frau S. Müschen, Herrn Dr. B. Mütze, Frau L. Oberemm und Herrn W. Schmidt für ihren Beitrag bei der Betreuung der Fermenter und bei den Laborarbeiten,
- den Mitarbeitern von Werkstätten und Photolabor für ihre bereitwillige Unterstützung und kompetente Durchführung aller Arbeiten,
- allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie und Enzymtechnologie, die mir durch Rat und Tat zur Seite standen

Frau Dr. G. Bierbaum und Herrn M. Karutz wünsche ich viel Erfolg bei der Fortsetzung der Arbeiten.

