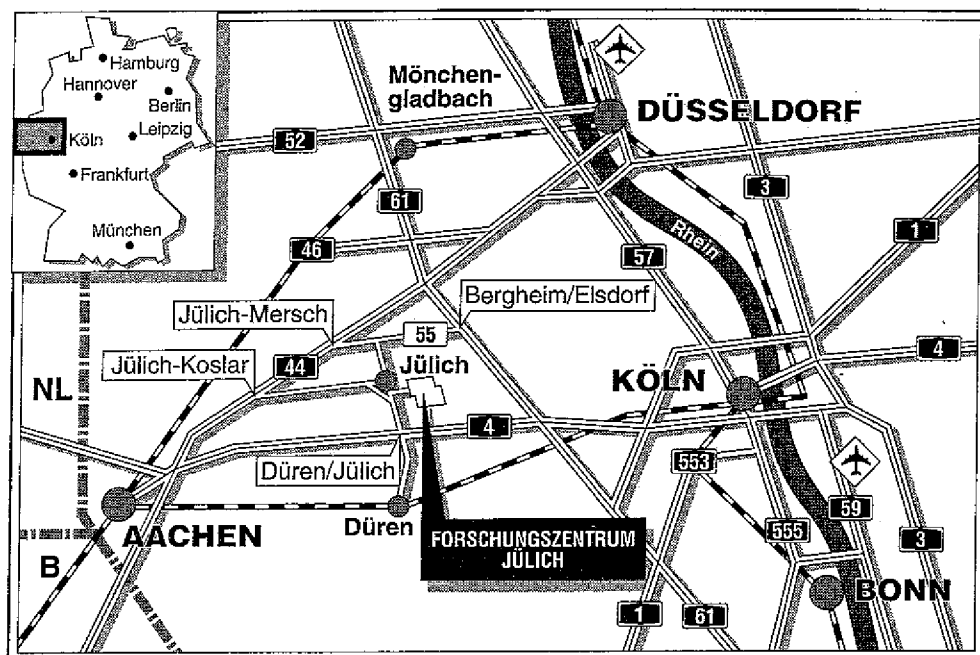


Institut für Biotechnologie

**Optimierung einer fermentativen
Enzymproduktion am Beispiel der
L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydroge-
nase von *Lactobacillus confusus***

Ulrike Monter



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2549

ISSN 0366-0885

Institut für Biotechnologie Jül-2549

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

**Optimierung einer fermentativen
Enzymproduktion am Beispiel der
L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydroge-
nase von *Lactobacillus confusus***

Ulrike Monter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theorie und Grundlagen	5
2.1 Biologie der Milchsäurebakterien	5
2.2 Versuchsorganismus	8
2.3 Hydroxysäure-Dehydrogenasen und L-Hic-DH	9
2.4 Beschreibung des bakteriellen Wachstums	12
2.4.1 Wachstum in einer Batch-Kultur	12
2.4.2 Wachstum in kontinuierlicher Kultur	14
2.5 Optimiervverfahren	18
3. Material und Methoden	27
3.1 Anzucht von <u>Lactobacillus confusus</u>	27
3.2 Untersuchungen zu Wachstumsbedingungen und Enzymaktivität	27
3.2.1 Sukzessive Faktorenvariation	27
3.2.1.1 Verfahren	27
3.2.1.2 Kulturmedien	28
3.2.1.3 Kulturbedingungen	29
3.2.2 Simultane Faktorenvariation (Simplex-Verfahren)	30
3.2.2.1 Verfahren	30
3.2.2.2 Kulturmedien und -bedingungen	37
3.3 Apparativer Aufbau	42
3.3.1 Batch-Fermentationen	42
3.3.2 Batch-Fermentationen mit Mikrofiltration	42
3.3.3 Kontinuierliche Kultur	43
3.4. Zellernte	48
3.5 Zellaufbruch	48
3.6 Analysenmethoden	50
3.6.1 Bestimmung der L-Hic-DH-Aktivität	50
3.6.2 Bestimmung der Bakterienzellmasse	51
3.6.2.1 Bestimmung der optischen Dichte	51
3.6.2.2 Bestimmung des Trocken- und des Feuchtgewichts	52
3.6.2.3 Bestimmung des Gesamtzellproteins	52
3.6.3 Bestimmung von Produkt und Substrat im Zellüberstand	52
3.6.3.1 Bestimmung organischer Säuren	52
3.6.3.2 Aminosäure-Bestimmung	53
3.6.3.3 Ethanol-Bestimmung	53
3.6.3.4 Zuckerbestimmung	54
3.6.4 Proteinbestimmung	55

4. Ergebnisse	57
4.1 Optimierung der Methoden	58
4.1.1 Haltbarkeit von Zellmaterial und Rohextrakten	58
4.1.2 Einflüsse auf die Proteinbestimmung	60
4.1.3 HPLC-Trennung von organischen Säuren	61
4.2 Optimieren durch sukzessive Faktorenvariation und nach einem mathematischen Modell	63
4.2.1 Variation des Kulturmediums	63
4.2.1.1 Aminosäure-Aufnahmespektrum im Laufe des Wachstums	63
4.2.1.2. Einfluß des C/N-Verhältnisses auf Wachstum und Enzymaktivität	65
4.2.1.3 Einfluß verschiedener C-Quellen auf das Wachstum	76
4.2.1.4 Einfluß organischer Säuren auf das Wachstum	79
4.2.2 Variation der Kulturbedingungen	82
4.2.2.1 Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum	82
4.2.2.2 Einfluß der Temperatur auf das Wachstum	84
4.2.2.3 Einfluß der Verdünnungsrate D auf Wachstum und Enzymaktivität	85
4.2.2.4 Einfluß der Verdünnungsrate D auf Zuckeraufnahme und Produktbil- dung	89
4.2.2.5 Wachstumskinetik von <u>Lactobacillus confusus</u> (Optimieren nach einem mathematischen Modell)	90
4.2.2.6 Einfluß der Verdünnungsrate D auf die Aminosäureaufnahme	99
4.3 Optimieren durch simultane Faktorenvariation (Simplex-Verfahren)	103
4.3.1 Faktorenwahl	103
4.3.2 Ergebnisse der Anfangssimplex	105
4.3.3 Enzymaktivitäten im Laufe der Simplex-Optimierung	107
4.3.4 Veränderungen von Kulturbedingungen und Mediumskomponenten wäh- rend der Optimierung	111
4.3.4.1 Änderung komplexer C- und N-Komponenten und Zucker	111
4.3.4.2 Veränderung von Amino- und Ketosäuren	113
4.3.5 Korrelation von Faktoren mit Enzymaktivitäten	113
4.3.6 Korrelation verschiedener Zielgrößen	117
4.4 Anwendung der Erkenntnisse aus 3.2 und 3.3, Kostenminimierungsansätze	119
4.4.1 Mikrofiltration	119
4.4.2 Kostenminimierung in Batch-Kulturen und kontinuierlichen Kulturen	121
5. Diskussion	125
6. Zusammenfassung	149
Anhang A. Verschiedenes	153

Anhang B. Simplex-Programm	155
Anhang C. Liste der Chemikalien und Geräte	157
Anhang D. Liste der Abkürzungen und Nomenklaturliste	159
Anhang E. Literaturverzeichnis	163

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1. Hexoseabbauwege bei Milchsäurebakterien	7
Abb. 2. Herstellung von 2-Hydroxysäure-Derivaten im EMR	12
Abb. 3. Theoretische steady-state-Beziehungen im Chemostaten	17
Abb. 4. Dreidimensionales Optimierproblem	22
Abb. 5. Fließschema der Simplex-Optimierung	37
Abb. 6. Meßwerterfassung durch MEAS	46
Abb. 7. Photographische Ansicht der Biostat M Anlage	47
Abb. 8. Schematische Ansicht der Biostat M Anlage	48
Abb. 9. Schema der Probenahme	49
Abb. 10. Lagerstabilität der L-Hic-DH im Rohextrakt bei - 20 °C	59
Abb. 11. Änderung von Aminosäuren im Kulturmedium bei Batch-Kultivierung ..	64
Abb. 12. Fed batch mit Glucose bei <u>Lactobacillus confusus</u>	66
Abb. 13. Wachstum von <u>Lactobacillus confusus</u> bei unterschiedlichen Glucose- Anfangskonzentrationen	69
Abb. 14. Vergleich verschiedener Wachstumsparameter im Batch	70
Abb. 15. L-Hic-DH-Volumenaktivität bei verschiedenen Glucose- Anfangskonzentrationen	72
Abb. 16. Wachstums- und Enzyymbildungsrate bei verschiedenen Glucose- Anfangskonzentrationen	73
Abb. 17. Beziehung zwischen L-Hic-DH-Volumenaktivität und Trockengewicht bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen	74
Abb. 18. Maximale L-Hic-DH-Aktivität und maximales Trockengewicht bei ver- schiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen	75
Abb. 19. Ertrag bei Wachstum auf verschiedenen Zuckern im Kolben	78
Abb. 20. L-Hic-DH-Aktivität und Wachstum auf Xylose	79
Abb. 21. Zellmasse und pH-Wert bei verschiedenen Pufferungsarten im Kolben ..	83
Abb. 22. pH-Optimum für das Wachstum im Kolben	84
Abb. 23. Temperatur-Optimum für das Wachstum im Kolben	85
Abb. 24. Einfluß der Verdünnungsrate D auf die steady-state Biomasse und den output	87
Abb. 25. Einfluß der Verdünnungsrate D auf die L-Hic-DH-Aktivität	88
Abb. 26. Korrelation von L-Hic-DH-Aktivität und Trockengewicht in kontinuier- licher Kultur	89
Abb. 27. Einfluß der Verdünnungsrate D auf steady-state- Konzentrationen von Glucose, Lactat und den Lactat-Output	90
Abb. 28. Korrelation der Lactat-Bildung mit der Glucose-Aufnahme	94
Abb. 29. Wachstumsrate in Abhängigkeit vom Restsubstrat (a)	95
Abb. 30. Wachstumsrate in Abhängigkeit vom Restsubstrat (b)	96
Abb. 31. Zusammensetzung des MRS-Mediums	99

Abb. 32. Veränderung freier Aminosäuren in kontinuierlicher Kultur bei niedriger Glucose-Konzentration	100
Abb. 33. Vergleich der Aufnahme freier Aminosäuren in kontinuierlicher Kultur bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen	101
Abb. 34. Aufnahme von Aminosäuren bei verschiedenen Verdünnungsraten ..	102
Abb. 35. L-Hic-DH-Volumenaktivität im Laufe der Simplex-Optimierung	108
Abb. 36. Vergleich von Enzymaktivitäten und Wachstum während der Simplex-Optimierung	109
Abb. 37. Komplexe Extrakte im Laufe der Simplex-Optimierung	112
Abb. 38. Amino- und Ketosäure-Zugabe während der Simplex-Optimierung ...	114
Abb. 39. Verlauf von Faktoren im Vergleich zur Volumenaktivität	117
Abb. 40. L-Hic-DH-Volumenaktivität als Funktion der Folsäure-Konzentration ..	118
Abb. 41. Repeated Batch mit Mikrofiltration	120
Abb. 42. Einfluß von Vitaminen auf die L-Hic-DH-Volumenaktivität in kontinuierlicher Kultur	123
Abb. 43. Vergleich der Aminosäure-Aufnahme im Voll- und minimierten Medium	124
Abb. 44. Aufsicht auf den Deckel des Fermentergefäßes	153

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1. Taxonomie der Familie Lactobacillaceae (Milchsäurebakterien)	6
Tab. 2. Standard-Kulturmedien	29
Tab. 3. Allgemeine Matrix einer Simplex	31
Tab. 4. Berechnung der Anfangssimplex aus der Startvertex	33
Tab. 5. Faktoren in der Anfangssimplex	39
Tab. 6. Erhöhung von Faktoren in der Anfangs-Simplex	40
Tab. 7. Vitamine und Spurenelemente für die Anfangssimplex	41
Tab. 8. Hutner-Spurenelemente-Lösung ohne Eisen und Mangan	41
Tab. 9. Metalllösung ohne Eisen und Mangan	41
Tab. 10. HPLC-Trennung organischer Säuren (Retentionszeiten)	61
Tab. 11. HPLC-Trennung organischer Säuren (Nachweisgrenzen)	62
Tab. 12. Fed-Batch mit Glucose (Enzymaktivitäten)	67
Tab. 13. Fed-Batch mit Glucose (Wachstum)	67
Tab. 14. Wachstum bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen	70
Tab. 15. Produktbildung und Ertragskoeffizient	71
Tab. 16. L-Hic-DH-Aktivität bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen	73
Tab. 17. Wachstum mit verschiedenen Zuckern und Zuckerderivaten im Kolben	77
Tab. 18. Einfluß zusätzlicher organischer Säuren auf das Wachstum	81
Tab. 19. Enzymaktivitäten und Zellmasse in der Anfangssimplex	106
Tab. 20. L-Hic-DH-Aktivität und Zellmasse im Vergleich zur Anfangssimplex	110
Tab. 21. Spitzenreiter der Simplex-Optimierung	114
Tab. 22. Vergleich von Wachstum und Enzymaktivität im Voll- und minimierten Medium	121
Tab. 23. Vergleich von Enzymaktivitäten bei verschiedenen Optimierverfahren	145

1. Einleitung

Die Konservierung von Lebensmitteln durch die in Spontangärungen von Milchsäurebakterien gebildete Säuren hat eine jahrtausendealte Tradition. Erst im letzten Jahrhundert begann man damit, Milchsäurebakterien durch gezielte Gärungen zur Produktion von Milchsäure zu veranlassen, welche als Konservierungszusatz zu Lebensmitteln oder Ausgangsstoff zu Polymersynthesen, Zusatz zu Lacken oder Kunststoffen Verwendung fand (Schwall, 1981). Die Bedeutung dieser Bakteriengruppe wird durch die Tatsache unterstrichen, daß ihr Einsatz in der heutigen Käseerei- und Molkereiindustrie in Form von Starterkulturen und deren Nachfolgekulturen unabdingbar geworden ist. Auch bei der Verarbeitung von Obst und Gemüse ist mit einer zunehmenden Verwendung von Starterkulturen zu rechnen (Buckenhüskes, 1990). Bei der Herstellung von Dauerwaren aus Frischfleisch tragen Milchsäurebakterien in bedeutendem Maße zu einer hohen Produktqualität bei (Reuter, 1975). Hierbei interessieren nicht mehr nur die allgemeinen konservierenden Eigenschaften der Milchsäurebakterien sondern spezielle Stoffwechseleigenschaften, die eine gleichmäßige, verbesserte Produktqualität, z.B. in Bezug auf Geruch und Geschmack, garantieren und zu einer Nahrungsmittelveredelung führen.

Neben diesem Einsatz als Starterkulturen und Produzenten von Milchsäure und von geschmacksveredelnden Stoffen in der Lebensmittelindustrie wurde in den letzten zehn Jahren in zunehmendem Maße ihr Potential als Enzymproduzenten erkannt. Solche zumeist intrazellulären Enzyme eröffnen einen eleganten Syntheseweg für die Herstellung chiraler Substanzen.

Die Chiralität, das Vorhandensein zweier Spiegelbildisomere von Stoffen, die sich nur in ihrem Drehsinn unterscheiden, stellt ein Grundprinzip für Aktivität, Erkennung und Antwort in der Biologie dar. Deutlich wird dies am Beispiel von Aminosäuren, bei denen nur die im Körper natürlich vorkommenden L-Isomere in der ribosomalen Proteinbiosynthese erkannt und verwertet werden. Daher finden chirale Substanzen als Ausgangsstoffe für weitere chemische Synthesen ein breites Anwendungsspektrum immer dort, wo biologische Wirksamkeit gefordert wird, wie bei Pharmaka, Insektiziden, Pestiziden, Herbiziden usw. Im Gegensatz zur **chemischen** Synthese entfällt die nachfolgende aufwendige Trennung der entstandenen Enantiomergemische bei der **enzymkatalysierten** Synthese: Sind doch Enzyme aufgrund ihrer Stereospezifität in der Lage, die Umsetzung von Vorstufen zu nur **einem** Spiegelbildisomer zu katalysieren.

Wichtige intrazelluläre chirale Syntheseeenzyme aus Milchsäurebakterien, wie Diketon-Reduktasen oder Hydroxysäure-Dehydrogenasen, gehören zu der Klasse der Oxidoreduktasen, die zusammen mit Cosubstraten NADPH oder NADH gezielt Ketogruppen reduzieren oder umgekehrt Hydroxylgruppen oxidieren können. Nach Isolierung aus den entsprechenden Mikroorganismen macht man sich die zumeist breite Substratspezifität und die enge Stereospezifität der Dehydrogenasen bei der

Synthese von zum Teil nicht natürlichen α -Hydroxysäuren und α -Hydroxysäurederivaten zunutze. Diese Substanzen dienen als Vorstufen für die Synthese von Feinchemikalien und Pharmaka. Die physiologische Rolle vieler α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen im Organismus ist abgesehen von einigen Ausnahmen, wie z.B. der Lactat-Dehydrogenase (LDH), unbekannt (Hummel und Kula, 1989a). Die LDH dient der Regeneration der im Gärungsstoffwechsel anfallenden Reduktionsäquivalente. Jedoch kommt gerade die Lactat-Dehydrogenase zur Synthese von α -Hydroxysäuren wegen ihrer sehr begrenzten Substratspezifität kaum in Frage. Andere α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen mit einem breiterem Substratspektrum eignen sich besser zur Herstellung von α -Hydroxysäuren. α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen der D-Spezifität sind aus Lactobacillus casei (Hummel et al., 1985), Streptococcus faecalis (Yamazaki et al., 1986) und Lactobacillus curvatus (Hummel et al., 1988) bekannt. Die beiden letztgenannten Enzyme katalysieren die Umsetzung zur D-Mandelsäure, die als Vorstufe für Antifettleibigkeitsagentien, semisynthetische Penicilline und Cephalosporine von Interesse ist.

Lactobacillus confusus (Schütte et al., 1984) ist derzeit als einziger α -Hydroxysäure-Dehydrogenase-Produzent der L-Spezifität beschrieben. Die L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-Hic-DH) von L. confusus wurde zur Synthese von L-2-Hydroxy-Leucin (L-2-Hydroxy-4-methyl-pentanoat), L-Tertiär-Butyllactat (L-2-Hydroxy-3,3-dimethyl-butanoat) und von L-Hydroxy-Dopa eingesetzt.

Eine Übertragung der enzymkatalysierten Synthese chiraler Substanzen in den technischen Maßstab ist durch zwei Entwicklungen möglich geworden: Der Enzym-Membran-Reaktor (Kula und Wandrey, 1987) gestattet die zur enzymatischen Umsetzung simultane Regenerierung der verbrauchten teuren Cosubstrate NADH oder NADPH. Verbesserte Aufarbeitungsmethoden (Kula, 1985; Hustedt et al., 1985) tragen zur Kostenverringerung bei der Enzymproduktion bei.

Bei Lactobacillus confusus sind günstige Bedingungen für die L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase-Produktion gegeben: Erstens kennt man Fermentationsbedingungen im Rahmen einer Lactat-Dehydrogenase-Produktion (Hummel et al., 1983) aus demselben Organismus, und zweitens entwickelten Schütte et al. (1984) sehr effiziente Aufreinigungsmethoden für die L-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase. Dennoch stehen der Übertragung der L-Hic-DH-katalysierten Synthesen in den größeren Maßstab Schwierigkeiten bei der Fermentation des Enzymproduzenten im Wege:

- Das Enzym wird bei niedrigen Zelldichten produziert, woraus ein niedriger Enzymgehalt pro Kulturvolumen resultiert.
- Die Notwendigkeit, L. confusus als Milchsäurebakterium in einem komplexen Nährmedium mit einer Vielzahl teurer Extrakte zur hinreichenden Vitamin-,

Purin-, Pyrimidin- und Peptidversorgung anzuziehen, führt zu hohen Fermentationskosten.

- Die Regulation des Organismus ist aufgrund der komplexen Nährstoffansprüche, einer Vielzahl an Stoffwechselendprodukten (CO_2 , Lactat, Acetat, Ethanol als Endprodukte der heterofermentativen Milchsäuregärung) und einer teilweisen Inhibierung durch diese Endprodukte von einer Fülle von Faktoren abhängig.

Steigerungen der Enzymproduktion können dabei prinzipiell durch genetische Verfahren erreicht werden. Im Falle von Starterkulturen, bei denen ein starkes Interesse an der Optimierung bestimmter Enzyme neben der Zellmasse besteht, sind diese Methoden wegen des zur Zeit gültigen Gentechnikgesetzes nicht erlaubt, wenn die Organismen z.B. später in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden sollen.

Gerade in diesem Fall ist die Optimierung des Nährmediums und der Kulturbedingungen der obligate Weg zu einer verbesserten Produktion. In diesem Sinne soll die vorliegende Optimierung eines Enzyms im komplexen Zusammenhang als Modellfall für die Optimierung von Starterkulturen gesehen werden.

Wegen der Vielzahl an Einflußfaktoren auf die Biomasse- und Enzymproduktion sind einfache Optimierungsmethoden nicht mehr hinreichend, sondern umfassende Optimierungsstrategien werden benötigt.

Variiert man bei der Suche nach optimalen Fermentationsparametern diese **sukzessiv**, d.h. durch Änderung nur eines Faktors unter Konstanthaltung aller übrigen, so ist eine mit der Zahl der freien Parameter stark zunehmende Zahl von Experimenten zur Optimierung der Enzymproduktion erforderlich. Eine deutlich geringere Versuchszahl benötigt dagegen die **simultane** Variation der Versuchsparameter gemäß mathematischer Optimierungsstrategien. Dabei kann ohne Kenntnis eines mathematischen Zusammenhangs zwischen Einflußfaktoren und Enzymproduktion mittels Suchstrategien ein Optimum gefunden werden.

Vor dem Hintergrund des steigenden Interesses am Einsatz von Starterkulturen - und der damit verbundenen Notwendigkeit ihrer Optimierung - einerseits und der Einsatzmöglichkeit der L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase als Syntheseezym andererseits stellt sich das Ziel dieser Arbeit wie folgt dar:

- Steigerung des Wachstums von Lactobacillus confusus und der Produktion eines intrazellulären Enzyms, der L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase, durch Suche nach geeigneten Fermentationsparametern und Nährmedienkompositionen
- Wahl eines geeigneten Optimierverfahrens, welches dem komplexen Optimierungsproblem gerecht wird und die Steigerung der Enzymproduktion schnell erreicht
- Übertragung der bisherigen Batch-Produktionsweise in die kontinuierliche Fermentationsweise

- Übertragung der für die Lactat-Dehydrogenase durchgeführten Kostenreduktionsansätze (Hummel et al., 1983) auf die L-Hic-DH
- Nebenziel: Erkennen der Einflüsse von Einzelfaktoren auf die Enzymproduktion, besseres Verständnis der Physiologie des Organismus

Als Beurteilungskriterium für die Optimierung sollte die Höhe der Volumenaktivität (Enzymaktivität pro Kulturvolumen) dienen.

Dabei geht der erste Teil der Untersuchungen (Kap. 4.2) der Frage nach, ob sich und wovon sich die Bildung des Enzyms beeinflussen läßt. Einflußfaktoren auf die Enzymproduktion und das Wachstum werden durch deren sukzessive Variation für den zweiten Teil der Arbeit eingegrenzt. Außerdem wird die Optimierung von Parametern durch Anpassung an ein mathematisches Modell beschrieben. Der zweite Teil (Kap.4.3) geht auf den Einsatz einer Suchstrategie bei der simultanen Variation von Fermentationsparametern ein. Im dritten Teil (Kap. 4.4) wird die Anwendung der zuvor gewonnenen Erkenntnisse und auf Kostenminimierungsansätze beschrieben.

2. Theorie und Grundlagen

2.1 Biologie der Milchsäurebakterien

Die Familie der Milchsäurebakterien (Lactobacillaceae) gehört zu den Gram-positiven nicht-sporenbildenden Bakterien. Sie erzeugen beim Abbau von Kohlehydraten neben einigen anderen Produkten hauptsächlich Milchsäure und sind hinsichtlich ihrer ATP-Gewinnung obligate Gärer. Hierbei wird Gärung als ATP-generierender Prozess verstanden, in dessen Verlauf organisches Substrat unter Energiegewinn zu Spaltprodukten oxidiert wird. Die hierbei entstehenden Reduktionsäquivalente werden durch Übertragung auf diese zuvor erzeugten Bruchstücke - nicht jedoch durch Übertragung auf Sauerstoff wie bei der Atmung - regeneriert. Sauerstoff kann trotz des Fehlens von Katalase und Cytochromsystemen von den meisten Milchsäurebakterien toleriert werden. Diese mikroaerophile Lebensweise wird durch flavinhaltige Oxidasen und durch Peroxidasen und/oder die bei manchen Vertretern vorkommende Superoxiddismutase (Hanson und Haggström, 1984; Higuchi, 1984) ermöglicht, welche für einen begrenzten Sauerstoffumsatz sorgen.

Da viele anabolische Stoffwechselwege fehlen (Morishita et al., 1981), sind Milchsäurebakterien durch komplexe Nährstoffansprüche gekennzeichnet. Sie müssen mit Peptiden, Amino-, Fettsäuren, Purinen, Pyrimidinen, Salzen und vor allem Vitaminen versorgt werden (Sharpe, 1981). Eine solche Nährstoffzufuhr ist durch Spezialisierung auf ganz bestimmte Standorte, wie Pflanzenmaterial, Milch, Fleisch und deren Verarbeitungsstätten sowie Darmtrakte von Tier und Mensch gewährleistet. Bei der Besiedlung solch verschiedener Standorte kommt dieser Bakteriengruppe die Fähigkeit zur starken Ansäuerung ihrer Umgebung durch die von ihnen erzeugte Milchsäure und damit zur Unterdrückung vieler nicht-säuretoleranter Mikroorganismen entgegen.

Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für die Lebensmittelindustrie gehören die Lactobacillaceae zu den biochemisch am besten untersuchten Mikroorganismen. Abbauwege und deren Endprodukte wurden daher schon früh als taxonomisches Merkmal gewertet. Bereits 1919 ordnete Orla-Jensen die Milchsäurebakterien nach der Konfiguration der gebildeten Milchsäure, und Kluyver (1935) nahm eine Unterteilung nach dem Gärungstyp vor: Als **homofermentativ** werden die Bakterien bezeichnet, die aus Hexosen fast ausschließlich **ein** Gärprodukt (Lactat) bilden, als **heterofermentativ** die Bakterien, die **mehrere** Gärprodukte (Lactat und Acetat oder Lactat, Acetat und CO₂) in stöchiometrischen Mengen erzeugen.

Die Konfiguration der produzierten Milchsäure (D od. L od. DL) als auch die Zahl und Art der Gärungsendprodukte können sich unterscheiden, wenn sich die Umweltbedingungen ändern. Daher wurden herkömmliche biochemische Taxonomiekriterien und auch morphologische Gesichtspunkte ab den 60er Jahren durch modernere

Taxonomiekriterien ergänzt (Kandler und Stetter, 1973). Hierzu zählen immunologische Eigenschaften, der GC-Gehalt der DNA, 16s rRNA-Homologien, der Zellwandaufbau (Primärstruktur, Aminosäure-, Teichonsäurevorkommen) sowie Besitz und Eigenschaften bestimmter Enzyme (Lactat-Dehydrogenase, Milchsäure-racemase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase). Solche Kriterien führten zur Einteilung der Familie der Milchsäurebakterien in vier Gattungen, die von Kandler (1982) beschrieben wurde und in Tab. 1 wiedergegeben ist.

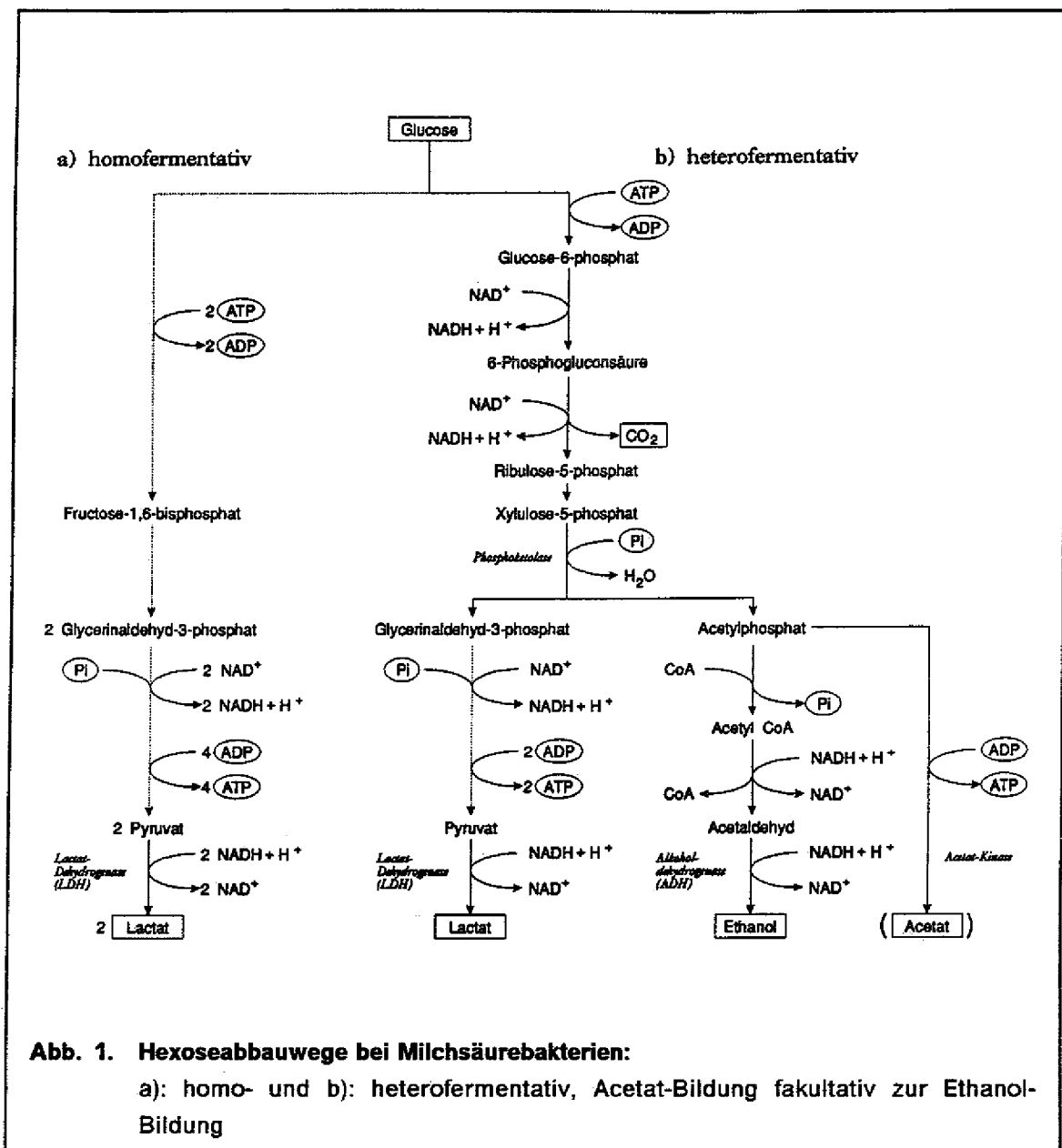
Gattung	Gärungstyp	Gärungshauptprodukte
<i>Streptococcus</i>	homofermentativ	Lactat
<i>Pediococcus</i>	homofermentativ	Lactat
<i>Lactobacillus</i> <i>Thermobacterium</i> <i>Streptobacterium</i>	homofermentativ homo-, auch fakultativ heterofermentativ	Lactat Lactat auch Lactat/Ethanol/CO ₂ /Acetat
<i>Betabacterium</i>	heterofermentativ	Lactat/Ethanol/CO ₂ /Acetat
<i>Leuconostoc</i>	heterofermentativ	Lactat/Ethanol/CO ₂ /Acetat

Tab. 1. Taxonomie der Familie Lactobacillaceae (Milchsäurebakterien): Gattungen, Gärungstyp und Gärungshauptprodukte aus Hexosen (nach Kandler, 1982)

Bei den obligat homofermentativen Bakterien wird Glucose über den Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) zu zwei Mol Pyruvat abgebaut. Dabei werden pro Mol Glucose circa 1.8 Mol ATP gewonnen. Die nachfolgende Reduktion des Pyruvats zur Milchsäure dient der Regeneration der Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$. Als Neben-Endprodukte können geringe Mengen Essigsäure, CO₂ und eventuell Ethanol auftreten (Abb. 1a).

Den heterofermentativen Bakterien fehlt sowohl das Schlüsselenzym des homofermentativen Abbaufweges, die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, als auch die Triosephosphat-Isomerase. Sie müssen daher Glucose statt zu Fructose-1,6-bisphosphat zu 6-Phosphogluconat und weiter unter CO₂-Freisetzung zu Xylulose-5-phosphat (C₅) umbauen (Abb. 1b). Dieser C₅-Körper wird vom Schlüsselenzym des heterofermentativen Abbaufweges, der von Thiaminpyrophosphat-abhängigen Phosphoketolase, zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (C₃) und Acetylphosphat (C₂) umgesetzt. Energie wird nur durch das Einschleusen des C₃-Körpers in den Embden-Meyerhof-Weg wie beim homofermentativen Abbau von Hexosen gewonnen. Reduktionsäquivalente dagegen werden beim Umbau des C₂-Körpers zu Ethanol und von Pyruvat zu Milchsäure regeneriert. Damit ergibt sich eine im Vergleich zu dem homofermentativen Weg wesentlich niedrigere ATP-Bilanz von nur einem Mol ATP pro Mol Glucose.

Ein dritter Hexoseabbauweg (nicht abgebildet) obligater Milchsäuregärer führt über Fructose-6-phosphat mittels Phosphoketolase-, Transaldolase- und Transketolase-Reaktionen zu Acetat, Lactat und dem Gewinn von 2.5 Mol ATP pro Mol Glucose. Dieser Weg wird von den heute aufgrund ihrer 16s rRNA-Struktur (Fox et al., 1980) nicht mehr zu den Lactobacillaceae gerechneten Bifidobakterien beschriftet.



Die in Abb. 1 beschriebenen Gärungsbilanzen können möglicherweise durch folgende Umsetzungen verändert sein:

- Heterofermentative Bakterien vermögen die Energiebilanz unter aeroben Bedingungen um ein ATP durch Reoxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ mittels Flavinenzymen unter Essigsäurebildung aus Acetyl-Phosphat aufzubessern (Winter, 1974; Abb. 1, rechter Ast).
- Homo- und heterofermentative Bakterien können weiterhin Lactat zu Acetat und CO_2 mit FAD-abhängigen Lactatoxidasen oder mit NAD-unabhängigen D-Lactat-Dehydrogenasen oxidieren.

- Sie können Pyruvat zu Acetat und CO₂ durch oxidative Decarboxylierung oder Pyruvat zu Acetat, Ethanol und Formiat unter zusätzlicher Energiegewinnung umsetzen.
- Beim Umsatz von Pentosen statt Hexosen entstehen nur Acetat und Lactat. Zu dieser Umsetzung sind nur hetero- und fakultativ heterofermentative Bakterien befähigt, da nur sie die Enzyme Phosphoketolase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aufweisen. Je nach Bakterienstamm werden dabei D- oder L-Arabinose, D-Xylose und D-Ribose in Xylulose-5-phosphat überführt. Die sog. fakultativ heterofermentativen Bakterien vergären Glucose normalerweise homofermentativ, bei pH-Shift (Rhee und Pack, 1980) oder bei Glucose-Limitierung (Thomas et al., 1979) mittels einer induzierbaren Enzymausstattung heterofermentativ.

Für die Konfiguration der gebildeten Milchsäure ist die Stereospezifität NAD- abhängiger Lactat-Dehydrogenasen und bei einigen wenigen Fällen auch der Einfluß von Lactat-Racemasen verantwortlich. Die physiologische Rolle dieser NAD-abhängigen Dehydrogenasen besteht in der Regeneration der im Gärungsstoffwechsel anfallenden Reduktionsäquivalente.

Nachfolgend entspricht "D(-)" linksdrehend und "L(+)" rechtsdrehend. Als reine D(-)-Lactat-Bildner sind aufgrund einer D-Lactat-Dehydrogenase die Gattung *Leuconostoc* und einige Arten der Thermo- und Streptobakterien bekannt. L(+)-Lactat-Bildner produzieren neben viel L-(+)-Lactat immer auch etwas D(-)-Lactat mittels einer sehr schwachen D-LDH. Betabakterien, zu denen auch der Versuchsorganismus gehört, formen immer D,L-Lactat mittels D- und L-Lactat-Dehydrogenasen. Nur wenige *Lactobacillus*-Stämme bilden D,L-Lactat durch Zusammenwirken einer L-LDH mit einer induzierbaren Racemase, die L-Lactat zu D-Lactat umwandelt (Stetter und Kandler, 1973). Dabei wird D,L-Lactat stammspezifisch und wachstumsabhängig in verschiedenen Isomerenverhältnissen gebildet. Die Zellen werden durch die Produkte ihres Zuckerstoffwechsels inhibiert (Luedeking und Piret, 1959; Pirt, 1975).

2.2 Versuchsorganismus

Holzappel und Kandler beschreiben *Lactobacillus confusus* 1969 als Gram-positives Kurzstäbchen von 0.8 - 1.0 µm Breite und 1.5 - 3.0 µm Länge mit einseitiger Verdickung und mikroaerophiler Lebensweise ohne Katalaseaktivität. Sie stellen den Organismus als eine neue Unterart der Untergattung *Betabacterium* (vergl. Tab. 2.1) vor: *Lactobacillus coprophilus* subsp. *confusus* nov. subsp.

Sharpe, Garvie und Tilbury (1972) erheben *Lactobacillus confusus* zur eigenen Art. Mit heterofermentativen *Leuconostoc*-Arten hat *Lactobacillus confusus* die unregelmäßige Form, die Fähigkeit zur Dextranbildung und Heterofermentation gemeinsam. Die Eigenschaft der D,L-Lactat-Bildung mittels zweier Lactat-Dehydrogenasen sowie

die Fähigkeit zur Argininspaltung belegen jedoch die Zugehörigkeit zu den heterofermentativen Betabakterien. Gegenüber dem nahe verwandten Lactobacillus coprophilus grenzt sich Lactobacillus confusus durch mangelnde L-Arabinose-Verwertung, durch Dextranbildung, Peroxidbildung und durch eine andere Zusammensetzung der Peptidbrücken im Murein ab (Holzapfel und Kandler, 1969). Dieselben Autoren ermittelten ein Wachstumsoptimum von 30 °C - 35 °C.

Lactobacillus confusus kommt in Zuckerrohrsäften vor (Sharpe, Garvie und Tilbury, 1972) und toleriert dort bis zu 15 % Zucker. Stetter und Kandler (1971) fanden ihn auch in gärenden Karottensäften. Ein qualitatives, aber kein quantitatives Zuckerspektrum wurde von Holzapfel und Kandler (1969) und Sharpe et al. (1972) veröffentlicht.

Lactobacillus confusus benötigt, wie alle heterofermentativen Bakterien Thiamin (im Coenzym der Phosphoketolase), außerdem Folsäure; das Riboflavin-Bedürfnis variiert je nach Bedingungen. Buchanan und Ribbons (1974) und Sharpe (1981) beschreiben diese Vitaminbedürfnisse, quantitative Aussagen hierüber liegen jedoch nur allgemein für andere Milchsäurebakterien vor (Rogosa et al., 1961; Ledesma et al., 1977). Lactobacillus confusus setzt Pyruvat mit Hilfe von D-LDH und L-LDH zu D,L-Lactat um (Garvie, 1975; Sharpe, Garvie und Tilbury, 1972). Die D-LDH wird von dem Organismus in großen Mengen während des Wachstums gebildet und erreicht mit dem Einsetzen der stationären Phase ein Maximum von 500 U/l Kultur, gemessen mit Pyruvat als Substrat (Hummel et al., 1983). Auf die Fermentation des Organismus wird in Kap. 2.3 eingegangen.

2.3 Hydroxysäure-Dehydrogenasen und L-Hic-DH

NADH-abhängige 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen katalysieren die stereospezifische Reduktion von 2-Ketosäuren zu den entsprechenden Hydroxysäuren sowie die Umkehrreaktion. Entgegen ihrer engen Stereospezifität können die meisten Enzyme dieser Klasse mehrere Substrate, allerdings dann mit unterschiedlichen K_M - und V_{max} -Werten, umsetzen. Da die enzymkatalysierte Synthese wie eingangs erwähnt der chemischen Synthese überlegen ist und auf fermentativem Wege nur die Hydroxysäure Lactat gewinnbar ist, bieten sich die 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen zur stereospezifischen Synthese auch von nicht in der Natur vorkommenden 2-Hydroxysäuren als Vorstufen von Feinchemikalien und Pharmaka an.

Die am meisten bekannte NADH-abhängige Dehydrogenase ist die Lactat-Dehydrogenase (LDH), die im Säugermuskel nur in der L-Spezifität, in Mikroorganismen in beiden Spezifitäten vorkommt (siehe Kap. 2.2). Alle Milchsäurebakterien, aber auch Enterobakterien, Propionibakterien und Clostridien besitzen NADH-abhängige Lactat-Dehydrogenasen (Garvie, 1980). L-LDH kommt zum Beispiel in Clostridien (Elsden et al., 1976; Simon et al., 1979) und L- und D-LDH in Lactobacillus confusus (Hummel et al., 1983) vor. Lactat-Dehydrogenasen sind jedoch für die präparative Anwendung

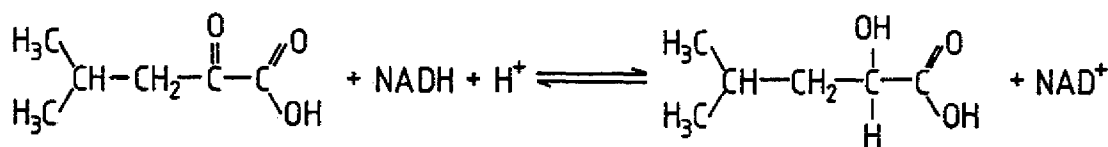
ungeeignet. So scheiterte der Einsatz der D-LDH bei der Synthese von Hydroxysäuren an der sehr begrenzten Substratspezifität: Neben Pyruvat ($K_M = 6.8 \times 10^{-4}$ M) setzt die D-LDH aus Lactobacillus confusus nur noch Phenylpyruvat bzw. Ketobutyrat mit einem 4- bzw. 10-fach höheren K_M -Wert um.

Beim Screening nach NADH-abhängigen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen mit einem breiteren Substratspektrum als dem der LDH stieß man auf sogenannte 2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenasen (2-Hydroxy-4-methyl-pentanoat-Dehydrogenasen) und sog. Mandelat-Dehydrogenasen (2-Hydroxy-phenyllactat-Dehydrogenasen). Ihre Benennung erfolgt nach dem Hydroxysäure-Analogon der von ihnen am besten umgesetzten Ketosäure.

Die bisher einzige L-spezifische NADH-abhängige L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (abgekürzt L-Hic-DH) wurde zufällig beim Screening nach einer D-LDH (Hummel et al., 1983) entdeckt, da der Rohextrakt von Lactobacillus confusus außer der Reaktivität gegenüber Pyruvat auch eine für die LDH untypische Reaktivität gegenüber 2-Ketoisocaproat zeigte. Diese Reaktivität wurde durch die Aufarbeitung von der LDH abgetrennt. Von der anfänglich im halotechnischen Maßstab hergestellten D-LDH aus demselben Organismus unterscheidet sich die L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase deutlich durch ihre L-Spezifität, ihre höhere Hydrophobizität, ihr größeres Substratspektrum, ihren gegenüber der D-LDH circa 6.7 fach geringeren K_M -Wert für Pyruvat, ihren Umsatz von 2-Ketoisocaproat und ein anderes pH- und Temperatur-Optimum für die Aktivität. Endständig verzweigte C₆- und C₅-Ketosäuren wie Ketoisocaproat od. Ketoisovalerat ($K_M = 6.0 \times 10^{-5}$ M bzw. 6.5×10^{-5} M) werden am besten umgesetzt. Daneben zeigt die L-Hic-DH auch noch beim Umsatz von 2-Ketovalerat und Phenylpyruvat verhältnismäßig niedrige K_M -Werte: 1.0×10^{-4} M bzw. 1.2×10^{-4} M. K_M -Werte für den Umsatz von Ketosäuren liegen im allgemeinen niedriger als beim Umsatz der entsprechenden Hydroxysäuren (Schütte et al., 1984). Den Umsatz des von der L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase bevorzugten Substrates zeigt die folgende Reaktionsgleichung:

L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase
(L-Hic-DH)

Hydrogenierung



Dehydrogenierung

2-Ketoisocaproat

L-2-Hydroxyisocaproat

Obwohl die physiologische Funktion der L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase bis zur Gegenwart unklar ist (Hummel und Kula, 1989a), wird wegen der Strukturanalogie der am besten umgesetzten Ketosäure (2-Ketoisocaproat) zur Aminosäure Leucin ein Zusammenhang mit dem Aminosäurestoffwechsel vermutet (Kula, 1986).

Mit Hilfe der L-Hic-DH lassen sich zum einen Hydroxysäure-Derivate herstellen. Hierzu zählen L-2-Hydroxyleucin (L-2-Hydroxy-4-methyl-pentanoat, sog. L-2-Hydroxyisocaproat), Tertiärbutyllactat (L-2-Hydroxy-3,3-dimethyl-butanoat, sog. Tertiärhydroxyleucin) und Hydroxydopa als Vorstufen für Pharmaka und Feinchemikalien. Abb. 2 zeigt den stereospezifischen Umsatz von Ketosäuren zu L- α -Hydroxysäuren unter gleichzeitiger Regenerierung von NADH mittels der Formiat-Dehydrogenase, wie er im Enzym-Membran-Reaktor (EMR) durchgeführt wurde (Kula und Wandrey, 1987; Wichmann et al., 1981, 1982, 1984). In diesem EMR sind kontinuierliche enzymatische Umsetzungen in einem Reaktor mit einer semipermeablen Membran möglich, durch die Substrat- und Produktlösung diffundieren, Enzym und molekulargewichtsvergrößertes Coenzym jedoch zurückgehalten werden.

Zum andern kann man die L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase im Zusammenwirken mit der D-L-Hic-DH aus Lactobacillus casei (Hummel et al., 1985) und mit Aminosäure-Dehydrogenasen sowie Polyethylenglycol-gebundenen Cofaktoren zur Herstellung von L-Aminosäuren aus Hydroxysäure-Racematen heranziehen (Wandrey et al., 1984). So gelingt beispielsweise in einem kontinuierlich betriebenen Membranreaktor die Synthese von L-Methionin aus D,L-2-Hydroxymethionin über die Keto-Zwischenstufe. Die bei der Umsetzung von 2-Ketomethionin mit NH_4^+ zu L-Methionin von der Leucin-Dehydrogenase (Schütte et al., 1985) verbrauchten teuren Cosubstrate werden beim Umsatz des Hydroxysäure-Racemats zu Ketomethionin durch die beiden L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenasen simultan regeneriert (Tichy et al., 1987).

Die Fermentation von Lactobacillus confusus im 5 m³-Maßstab wurde von Schütte et al. (1984) realisiert. Sie liefert jedoch wegen des Wachstums zu niedrigen Zelldichten nur geringe Enzymausbeuten. Hohe Fermentationskosten waren dabei durch die für das Wachstum der Milchsäurebakterien nötigen teuren Nährmediumsbestandteile bedingt. Hummel et al. (1984) führten Ansätze zur Kostenverringerung durch. Jedoch testeten die Autoren die Minimierungsansätze bisher nur im Hinblick auf gleichbleibende D-LDH-Produktion, nicht dagegen in Bezug auf die L-Hic-DH.

Eine Fermentation des Organismus im 10 l Maßstab (Schütte et al., 1984) verdeutlicht die Ausgangssituation der vorliegenden Arbeit: In dieser batchweisen Fermentation wurden eine Volumenaktivität von 200 U/l, eine spezifische Aktivität von 1 U/mg Protein und 7.5 g Feuchtgewicht/l Kultur (entsprechend einer optischen Dichte von circa 4.5 bei 578 nm) in einem nicht pH-statisierten Ansatz erreicht. Im Gegensatz zu den relativ ungünstigen Fermentationsbedingungen sind bereits sehr effiziente

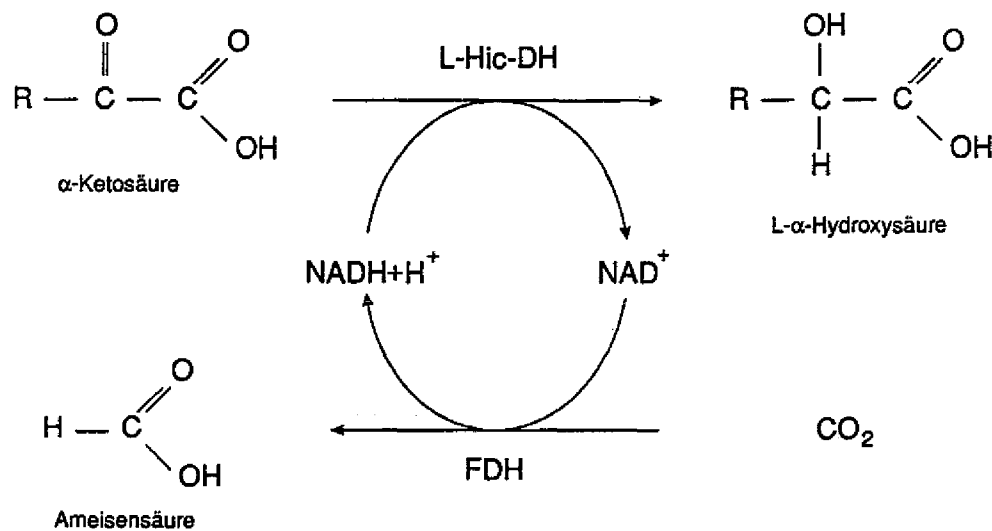


Abb. 2. Herstellung von 2-Hydroxysäure-Derivaten im EMR:

mittels der L- α -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase und unter Coenzymregenerierung durch die Formiat-Dehydrogenase (FDH) im Enzym-Membran-Reaktor

Aufarbeitungsmethoden entwickelt (Hummel et al., 1983; Schütte et al., 1984, 1985) worden. Die halbtechnische Aufarbeitung, die von 24 kg Zellen (Naßgewicht aus einer 5000 l-Fermentation) ausgeht, befreit die L-Hic-DH durch Extraktion in einem ersten wässrigen 2-Phasensystem von Fremdprotein und den Zelltrümmern des Zellaufbruches mit einem hohen Ausbeutegrad von 98.4 %. Weitere Extraktionschritte trennen v.a. die Lactat-Dehydrogenase neben anderem Fremdprotein ab. Durch nachfolgende Diafiltration und Ionenaustauschchromatographie wird die L-Hic-DH 177-fach zu einem technischen Katalysator mit einer spezifischen Aktivität von 30 U/mg Protein aufgereinigt.

2.4 Beschreibung des bakteriellen Wachstums

Unter Wachstum versteht man die irreversible Zunahme an Zellmaterial, die sich in der Zunahme der Zellzahl und/oder der Zellmasse ausdrückt.

2.4.1 Wachstum in einer Batch-Kultur

Einer Batch-Kultur werden nach dem Beimpfen der Nährlösung mit Bakterien keinerlei Nährstoffe zugeführt oder Produkte entnommen.

Betrachtet man das Wachstum anhand der Vermehrung der Zellmasse x in einer solchen Kultur, so kann man typische "Wachstumsphasen" erkennen. Buchanan

(1918) beschreibt diese Phasen für C-limitierte, heterotrophe Bakterien erstmals: Nach einer anfänglichen Anlauf- und Übergangsphase, in denen der Stoffwechsel auf die neuen Bedingungen umgestellt wird, wachsen die Bakterien mit maximaler Geschwindigkeit. Sie stellen das Wachstum in einer erneuten Übergangsphase allmählich und in der stationären Phase wegen Verknappung von Nährstoffen und Anhäufung von toxischen Produkten ganz ein. In der Absterbephase lysieren sie.

Für die Zunahme der Bakterienmasse mit der Zeit - die Wachstumsgeschwindigkeit einer Bakterienkultur - gilt die folgende Gleichung:

$$\frac{dx}{dt} = \mu t \quad (\text{g/(l} \times \text{h)}) \quad (2.1)$$

Hierbei bedeuteten x die Zellmasse, z.B. das Trockengewicht (g/l) und μ die spezifische Wachstumsrate (1/h).

Unter Bedingungen des unlimitierten Wachstums, wie in der exponentiellen Phase, in der alle Nährstoffe im Überschuß vorhanden sind, nimmt diese Wachstumsrate μ ihren maximalen Wert $\mu_{\max}$ an:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} t \quad (\text{g/(l} \times \text{h)}) \quad (2.2)$$

und ist dann eine nur von der Bakterienart, den Kulturbedingungen und der Medienzusammensetzung abhängige Konstante.

Die zur Zeit t in der exponentiellen Phase vorhandene Biomasse $x(t)$ läßt sich nach Integration der Gleichung 2.2 wie folgt bestimmen:

$$x(t) = x_0 e^{\mu_{\max} t} \quad (\text{g/l}) \quad (2.3)$$

wobei $x(t)$ die Bakterienmasse zur Zeit t , und $\mu_{\max}$ die maximale spezifische Wachstumsrate darstellt.

Die spezifische Wachstumsrate berechnet sich wie folgt:

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t - t_0} \quad (1/\text{h}) \quad (2.4)$$

Für $x(t) = 2x_0$ ergibt sich aus Gl. 2.3 die Verdopplungszeit t_d der Bakterienmasse:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (\text{h}) \quad (2.5)$$

In der exponentiellen Phase ist die Wachstumsrate μ unabhängig von der Konzentration des limitierenden Substrates, d.h. dem Substrat, dessen Konzentrationsabfall als erstes eine Wachstumsverlangsamung bewirkt. Gerät die Kultur dagegen unter Bedingungen des limitierten Wachstums (wie beim Übergang zur stationären Phase),

so ist die spezifische Wachstumsrate von der Konzentration des jeweils vorhandenen limitierenden Nährstoffes abhängig.

Im Falle einer durch **einen** Nährstoff C-limitierten, aeroben Kultur beschrieb Monod (1942) den Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und limitierendem Substrat:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \quad (1/h) \quad (2.6)$$

wobei $\mu_{\max}$ die maximale spezifische Wachstumsrate, eine Konstante in 1/h, s die aktuelle Konzentration des limitierenden Substrates in g/l und K_s die Substratsättigungskonstante in g/l oder mol/l ist. K_s entspricht der Konzentration des Substrates, bei der die halbmaximale Wachstumsrate erreicht wird.

Der Zusammenhang zwischen limitierendem Substrat und Wachstumsgeschwindigkeit nimmt die Form einer Sättigungskurve an. Die Abhängigkeit nach Monod wird wegen ihrer Einfachheit und Analogie zur Michaelis-Menten-Gleichung in der Enzymkinetik heute auf die meisten mikrobiologischen Systeme angewendet. Sie beschreibt aber nur ganz einfache biologische Systeme ohne Inhibitionen und ohne Berücksichtigung des Substratverbrauches durch den internen Erhaltungsstoffwechsel.

Zum Vergleich des Wachstums einer Bakterienart unter verschiedenen Kulturbedingungen und in verschiedenen Nährmedien oder verschiedener Bakterienarten miteinander werden folgende **Parameter einer Batch-Kultur** herangezogen:

- die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ bzw. die Verdopplungszeit t_d , als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit in 1/h bzw. h
- der Ertrag X , als Differenz der maximalen und der anfänglichen Bakterienmasse ($X = x_{\max} - x_0$) in g/l
- der Ertragskoeffizient Y , als Quotient des pro gebildeter Zellmasse verbrauchten Substrates in g/g ($Y_s = X/S$) oder der molare Ertragskoeffizient, der die gebildete Zellmasse auf die Mol verbrauchten Substrates bezieht
- die Dauer der Anlaufphase

2.4.2 Wachstum in kontinuierlicher Kultur

In einer Batch-Kultur ändern sich die Kulturbedingungen zu jedem Zeitpunkt. In einer kontinuierlichen Kultur dagegen können die Bakterien unter konstanten Bedingungen exponentiell wachsen.

Einer wachsenden Bakterienkultur wird in diesem Kultursystem frische Nährlösung zudosiert und in gleichem Maße nachwachsende Bakterienkultur entzogen.

Fließt die Nährlösung mit einer Zuflußrate f (l/h) dem Kulturvolumen V (l) zu, so wird die Bakterienkultur mit der Verdünnungsrate D (1/h) verdünnt:

$$D = \frac{f}{V} \quad (1/h) \quad (2.7)$$

D drückt also die Anzahl der Volumenwechsel pro Stunde aus. Der Kehrwert der Verdünnungsrate wird als Verweilzeit τ (h) bezeichnet.

Wüchsen die Bakterien nicht nach, würden sie gemäß Gl. 2.8 ausgewaschen:

$$Dx = - \frac{dx}{dt} \quad (g/(l \times h)) \quad (2.8)$$

Sie wachsen aber gegen den Auswaschverlust an, mit:

$$\mu x = \frac{dx}{dt} \quad (g/l \times h) \quad (2.9)$$

In Gleichung 2.9 wird der Erhaltungsstoffwechsel, den die Zelle auch im "nicht-wachsenden" Zustand aufweist und der den Biomassezuwachs eigentlich mindert, außer acht gelassen. Somit ergibt sich die Gesamtänderung der Biomasse im Kulturgefäß:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx \quad (g/(l \times h)) \quad (2.10)$$

Erreicht die Wachstumsrate μ die Höhe der Verdünnungsrate D , ist ein Fließgleichgewicht (steady state) entstanden, in dem die Bakteriendichte x konstant bleibt und die Bakterien exponentiell wachsen:

$$\text{bei } \mu = D \Rightarrow \frac{dx}{dt} = 0 \quad (2.11)$$

Unter steady state Bedingungen ergibt sich mit $\mu = D$ aus der Monod-Beziehung (Gl. 2.6)) für die **Substratkonzentration** im Kulturüberstand $\bar{s}$:

$$\bar{s} = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D} \quad (g/l) \quad (2.12)$$

Da das aufgenommene Substrat im Fermenter der Differenz zwischen der Konzentration im Kulturreservoir S_R und der Konzentration im Kulturüberstand entspricht:

$$s = S_R - \bar{s} \quad (g/l) \quad (2.13)$$

und der Ertragskoeffizient in kontinuierlicher Kultur als Biomassebildung pro g aufgenommenen Substrats definiert ist:

$$Y = \frac{x}{S_R - \bar{s}} \quad (g/g) \quad (2.14)$$

ergibt sich unter Einsetzen von 2.13 und 2.14 in Gl. 2.12 und Umformen für die **Biomassekonzentration** im steady state:

$$x = Y(S_R - K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}) \quad (\text{g/l}) \quad (2.15)$$

Dies bedeutet, daß die Biomasse im steady state mit steigender Substratkonzentration im Reservoir ansteigt, solange dieses Substrat limitierend ist.

Für den **Bakterienausstoß** (output) in $\text{g/(l} \times \text{h)}$ des Systems im steady state, die pro Zeiteinheit gebildete Bakterienmasse Dx ergibt sich:

$$Dx = DY(S_R - K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}) \quad (\text{g/l} \times \text{h}) \quad (2.16)$$

Die Verdünnungsrate, bei der der höchste Bakterienausstoß erzielt wird, heißt D_M . Wird die Verdünnungsrate stark erhöht, steigt die Substratkonzentration im Kulturüberstand an, bis bei $D = \mu_{\max}$ die Substratkonzentration im Fermenter der Konzentration im Reservoir entspricht und die Bakterien ausgewaschen werden.

Diese **kritische Verdünnungsrate** D_c ist definiert durch:

$$D_c = \mu_{\max} \left(\frac{S_R}{K_s + S_R} \right) \quad (1/\text{h}) \quad \text{mit } \bar{s} = S_R \quad (2.17)$$

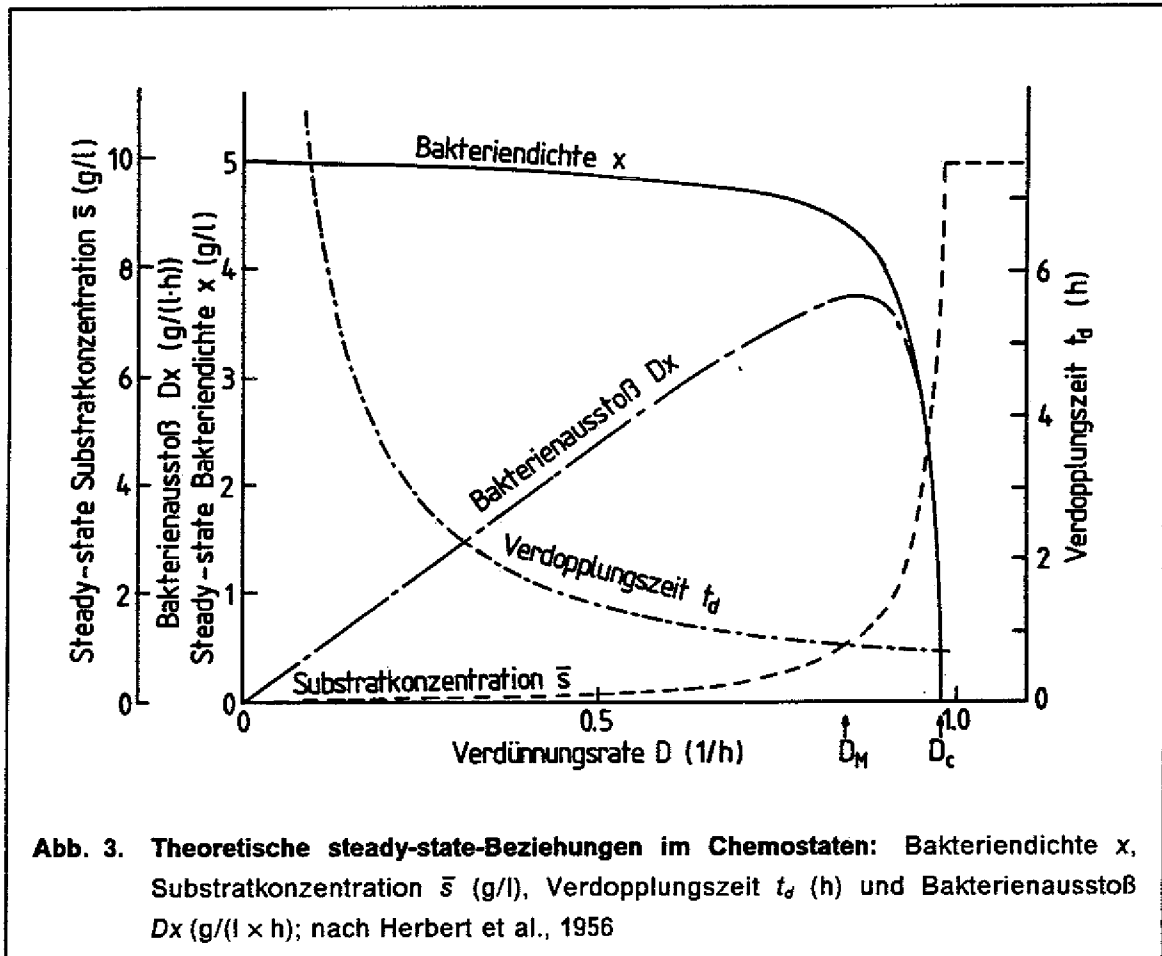
Fundamentale **Wachstumsparameter der kontinuierlichen Kultur** sind also

- die Sättigungskonstante K_s (g/l oder mol/l)
- der Ertragskoeffizient Y_{sub} , die pro aufgenommenem Substrat gebildete Biomasse (g/g)
- und die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ ($1/\text{h}$).

Diese lassen sich durch Aufnahme eines "X/D"-Diagrammes (siehe Abb. 3) unter Messung der Bakterienmasse und Substratkonzentration im steady state direkt bestimmen, wenn die Voraussetzungen einer Monod-Kinetik gegeben sind.

Zur vergleichenden Betrachtung des Wachstums in verschiedenen Medien oder verschiedener Bakterienarten miteinander interessieren außerdem der maximale Bakterien- und Produktausstoß und wie gut ein Substrat bei einer bestimmten Verdünnungsrate ausgenutzt wird.

Aus den Gleichungen 2.6, 2.12 und 2.15 berechneten Herbert et al. (1956) das Wachstumsverhalten eines hypothetischen Organismus in kontinuierlicher Kultur unter Annahme von $\mu_{\max} = 1.0 \text{ h}^{-1}$, $Y = 0.5$, $K_s = 0.2 \text{ g/l}$ und $S_R = 10 \text{ g/l}$ bei verschiedenen Verdünnungsraten (Abb. 3).



Prinzipiell kann ein steady state über zwei verschiedene Betriebsführungen aufrecht erhalten werden: durch die chemostatische und die turbidostatische Betriebsweise.

- **Chemostat** (Novick and Szilard, 1950):
Die *Durchflußrate* D wird konstant gehalten und das Wachstum der Bakterien somit von der Konzentration des limitierenden Substrates im Zulauf bestimmt.
- **Turbidostat** (Bryson, 1952):
Über eine Trübungsmessung wird die *Bakteriendichte* X im Fermenter gemessen und durch Nährlösungszufuhr bei Absinken konstant gehalten. Die Bakterien wachsen bei maximaler Wachstumsrate $\mu_{\max}$. Daher ist diese Betriebsweise gegenüber Auswaschen bei kleinen Änderungen der Verdünnungsrate stärker als die chemostatische Betriebsweise gefährdet. Limitierungen werden direkt er-

kannt, wenn bei Zusatz bestimmter Nährstoffe im zufließenden Medium die Bakteriendichte ansteigt (Büchs, 1989).

2.5 Optimierungsverfahren

Optimierungsprobleme sind aus so unterschiedlichen Bereichen wie der Wirtschaft, der Chemieverfahrenstechnik oder der Fermentationstechnik bekannt.

Beim Optimieren von Prozessen wird es immer darum gehen, frei wählbare Prozeßparameter $a_1 \dots a_n$ so einzustellen, daß eine Zielgröße des Prozesses $y = f(a_1 \dots a_n)$ einen minimalen oder maximalen Wert annimmt:

$$y = f(a_1 \dots a_n) \stackrel{!}{=} \max (\text{od. min}) \quad (2.18)$$

Zur Beurteilung der Optimierung können dabei ökonomische Kriterien wie minimale Kosten und maximaler Gewinn oder technische Kriterien wie maximaler Durchsatz und maximale Ausbeute herangezogen werden.

Im Falle einer enzymatischen Umsetzung kann man sich unter den Prozeßparametern Bedingungen wie den pH-Wert oder die Temperatur und unter der Zielgröße den Substratumsatz vorstellen. Im Falle einer kontinuierlichen Fermentation könnten die Verdünnungsrate den zu variierenden Prozeßparameter und die Bakterien-, Produktausbeute oder Enzymproduktion mögliche Zielgrößen darstellen. In der Praxis gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze zum Finden des Extremwertes der Zielgröße:

- die Optimierung mittels eines mathematischen Prozeßmodells
- die Optimierung mittels eines Suchverfahrens

Ist der **mathematische Zusammenhang** zwischen Prozeßparametern und der Zielgröße eines biologischen Systems **bekannt**, so können experimentelle Daten an ein **mathematisches Modell** angepaßt werden. Hierbei werden die Modellparameter in der theoretischen Gleichung solange verändert, bis die laut Modell errechneten Zielgrößenwerte in naher Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Werten stehen.

Gilt zum Beispiel die Monod-Kinetik (Gl. 2.6) für das Wachstum (μ) in Abhängigkeit vom Substrat ($\bar{s}$) im Überstand der kontinuierlichen Kultur, so gilt auch Gleichung 2.15 für den Zusammenhang zwischen der Zielgröße "Bakteriendichte x " und dem Prozeßparameter "Verdünnungsrate D " bzw. der "Substratkonzentration im Reservoir S_R ". "Maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ " und "Sättigungskonstante K_s " sind in diesem Beispiel Modellparameter, die experimentell nur schwer zugänglich sind. Messungen ergeben die experimentellen Daten für die Zielgröße Bakteriendichte x und die Restsubstratkonzentration $\bar{s}$ (zur Ermittlung des Ertragskoeffizienten Y) in Abhän-

gigkeit vom Prozeßparameter D bei zunächst konstanter Substratkonzentration S_R im Reservoir. Mit Hilfe dieser Daten für $\bar{s}$ werden in Gleichung 2.12 die Modellparameter K_s und $\mu_{\max}$ mathematisch solange variiert, bis die theoretisch errechneten Werte für das Restsubstrat die gemessenen Substrat-Werte möglichst genau treffen. Mit den so angepaßten Modellparametern können unter anderem in Gleichung 2.15 die maximal erhältliche Biomasse und die hierzu erforderliche Verdünnungsrate auch bei einer anderen Substratkonzentration im Reservoir vorausgesagt werden.

Die Veränderung der Modellparameter folgt dabei meist Optimierungsalgorithmen, also Rechenvorschriften, die sich in einer fest vorgegebenen Weise wiederholen, bis ein Optimum erreicht ist. Als Optimum gilt beim Optimieren nach mathematischen Prozeßmodellen nicht eine maximale oder minimale Antwort des Systems sondern eine möglichst minimale Abweichung der errechneten von den gemessenen Werten. Sind die Modellparameter einmal bekannt, können sie Grundlage einer Maßstabsvergrößerung von Prozessen sein oder im Falle von Fermentationen zur Abschätzung der für eine maximale Biomasse oder Produktausbeute bei einer bestimmten Substratkonzentration im Reservoir erforderlichen Verdünnungsrate verwendet werden. Ebenso läßt sich auch die zum Erhalt einer bestimmten Biomassekonzentration erforderliche Substratkonzentration im Reservoir bei einer gewählten Verdünnungsrate voraussagen.

In begrenztem Maße kann man die Optimierung durch **faktorielle Experimente** auch zur Optimierung nach mathematischen Modellen rechnen. Die faktoriellen Verfahren orientieren sich an einem allerdings lokal begrenzten mathematischen Modell. In der Mehrzahl der Fälle wird dabei für die Prozeßparameter und die Zielgröße ein einfacher polynomialer Zusammenhang gefordert.

Nach einem fest vorgegebenen Versuchsplan (faktorieller Plan) werden bestimmte Kombinationen von Prozeßparametern sowie deren im Versuch einzustellenden Niveaus vorgegeben. Aus den Versuchsergebnissen werden die Koeffizienten des Polynoms - und damit die Prozeßparameter zum Erreichen der maximalen Zielgröße - über least square fitting-Methoden bestimmt. Statistische Analysen lassen sogar eine Abschätzung des Einflusses der Prozeßparameter auf die Zielgröße zu. Mit einfachen faktoriellen Plänen, wie der Methode nach Plackett und Burman (1943), können im Vorfeld einer Optimierung einflußreiche von weniger einflußreichen Prozeßparameter unterschieden werden. Mehrere Parameter können mit faktoriellen Methoden zwar gleichzeitig variiert werden (Box und Wilson, 1951), jedoch bleibt deren Zahl auf 2 - 3 beschränkt. Weiter ist zu beachten, daß die Unterschiede in den resultierenden Zielgrößenwerten meist klein sind, sodaß eine hohe Experimentezahl zur statistischen Absicherung des Einflusses von Prozeßparametern auf die Zielgröße nötig ist. Eine feste Abfolge von faktoriellen Plänen, die sich mit einem Schritt in die Richtung der stärksten Veränderung einer Zielgröße abwechseln, um ein Optimum

zu erreichen, entwarf Box (1955): das sogenannte EVOP-Verfahren (evolutionary operation).

Wegen der Komplexität biologischer Strukturen stehen mathematische Modelle jedoch für die wenigsten biologischen Systeme zur Verfügung. So bleibt die Monod-Kinetik auch nur auf Bakterienkulturen ohne Inhibitionen und Erhaltungsstoffwechsel begrenzt, auf einen seltenen Anwendungsfall also.

Ist der **mathematische Zusammenhang** zwischen Einflußgrößen und biologischer Antwort **nicht bekannt**, so kann man ohne Modellkenntnis mittels eines **Suchverfahrens** das Maximum oder Minimum einer Zielgröße finden.

Im Gegensatz zur beschriebenen Optimierung mit Hilfe von Modellen werden Optimierungsalgorithmen nicht mehr zur Minimierung der Abweichung des errechneten Zusammenhangs von den ermittelten Versuchswerten sondern zur direkten Maximierung (od. Minimierung) der biologischen Antwort selbst herangezogen. Zielgröße in einer Fermentation wäre dann z.B. die Biomasse oder Enzymproduktion selbst und nicht mehr die minimale Abweichung einer theoretisch berechneten Biomasse von der gemessenen.

Für die Optimierung mittels eines Suchverfahrens sind die folgenden Schritte nötig:

- Wahl des Suchverfahrens nach den Gesichtspunkten: Schnelligkeit des Verfahrens, maximal mögliche Zahl der parallel untersuchbaren Parameter, Notwendigkeit von Vorversuchen
- Wahl der Zielgröße (Definition des Bewertungskriteriums)
- Auswahl der Einflußparameter
- Abstecken der Grenzen für Einflußparameter und Zielgrößen
- Wahl eines Ausgangspunktes für die Optimierung
- Wahl eines Abbruchkriteriums
- Ausführung einer Folge von vorgeschriebenen Suchschritten mit Ermittlung der Zielgrößenwerte als Tastzyklus; Orientierung, ob eine Verbesserung stattgefunden hat; Wahl eines neuen Ausgangspunktes, Schritt in die vermutete bessere Richtung; erneuter Tastzyklus
- Abbruch der Suche, wenn das Abbruchkriterium erfüllt ist.

Zur Verdeutlichung des Optimierproblems stelle man sich einen dreidimensionalen Fall vor, bei dem die Zielgröße, zum Beispiel eine Enzymaktivität pro l Kulturvolumen von zwei Fermentationsparametern, der Temperatur und dem pH-Wert, abhängt (Abb. 4). Man kann dann die Suche geeigneter Parameter zum Erzielen einer maximalen Enzymaktivität als das Besteigen eines unbekannten Berges im Nebel beschreiben: In diesem Bild entspricht das Ziel, den nicht sichtbaren Gipfel des Berges zu finden, der Suche nach der maximalen Enzymaktivität. Die geographischen Koordinaten der Bergspitze zeigen die Werte der optimalen Prozeßparameter a_1 (Temperatur) und a_2

(pH-Wert) an. Die Form des Berges entspricht der unbekannten mathematischen Funktion $f(a_1, a_2)$.

Zum Beschreiten des Berges gibt es nun verschiedene Möglichkeiten. Eine Strategie für die Suche der Parameter-Koordinaten, bei der die maximale Enzymaktivität auftritt, ist die **sukzessive** Änderung der einzelnen Prozeßparameter unter Konstanthaltung aller übrigen auf einem zunächst willkürlich gewählten Parametersatz. Diese Strategie erlaubt eine einfache Optimierung der Zielgröße, wenn die Parameter voneinander unabhängig sind, d.h. sich in ihrer Wirkung auf die Enzymaktivität nicht gegenseitig beeinflussen. Mit m Prozeßparametern und k_1 Versuchen zur Ermittlung des Optimums der Zielgröße bezüglich eines jeden Parameters benötigt man somit $N = k_1 \times m$ Versuche für die gesamte Optimierung. Den im Bild beschriebenen Berg würde man in diesem Fall zunächst in Nord/Süd- und dann in Ost/West-Richtung ablaufen, und aus den jeweils höchsten erreichten Standorten den Gipfelpunkt ermitteln.

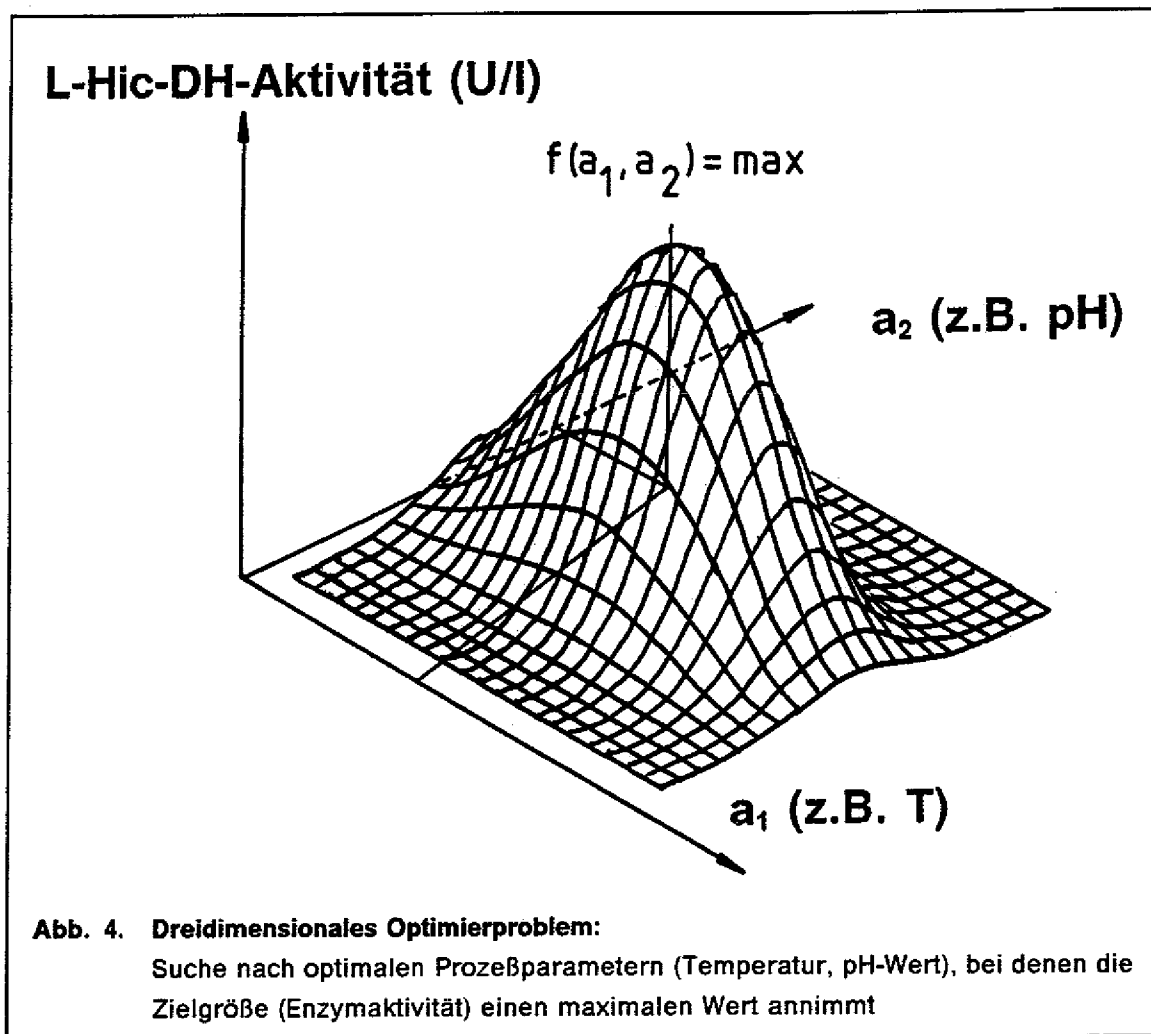
In der Regel sind jedoch Prozeßparameter nicht voneinander unabhängig, sondern beeinflussen sich gegenseitig, indem sie sich in ihrer Wirkung auf die Enzymaktivität verstärken oder schwächen. Dies führt dazu, daß sich nach Variation des einen Parameters Temperatur der optimale Wert des anderen Parameters pH ändert und eine "Nachjustierung" erforderlich macht. Der gesamte Variationsprozeß muß nun solange wiederholt (iteriert) werden, bis schließlich die Parameter-Optima stationäre Werte angenommen haben. Im ungünstigsten Fall benötigt man dann statt $N = k_1 \times m$ eine viel höhere Anzahl von Versuchen:

$$N = (k_1)^m \quad (2.18)$$

Dieser Fall tritt ein, wenn man, um die Bergspitze nicht zu verpassen, alle möglichen Kombinationen von Temperatur und pH-Wert einstellt und die entsprechende Enzymaktivität mißt. Hierzu muß man im beschriebenen Bild (Abb. 4) sukzessive alle Gitterpunkte des Gebirges ablaufen. Aus dem folgenden Zahlenbeispiel wird besonders deutlich, daß die steigende Zahl der freien (nicht unabhängigen) Parameter eine stark zunehmende Experimentezahl zur Optimierung der Zielgröße zur Folge hat: Im Falle von zwei Parametern und 5 Versuchen pro Parameter sind 25 Versuche erforderlich; bei der Erhöhung der Parameterzahl auf 5 und 5 Versuchen pro Parameter benötigt man dagegen schon **3125** Versuche.

Aus diesem Grunde müssen, besonders in biologischen Systemen, die einer Vielzahl von sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren unterliegen, Suchverfahren, die die erforderliche Experimentezahl durch **simultane** Parametervariation herabsetzen, zur Optimierung herangezogen werden.

Zu den sicherlich intelligentesten Suchstrategien zählen die **Evolutionsstrategien** (Ablay, 1987), die sich die Prinzipien der Evolution zunutze machen. Mutation und Selektion werden als Regeln zur Parametervariation herangezogen. Absolute Maxima (der höchste Berggipfel unter vielen anderen) können erkannt werden.



Andere Suchstrategien, wie die Methode nach **Hooke-Jeeves** (1961) oder nach **Rosenbrock** (1970), als verbesserte Variante der Hooke-Jeeves-Suche, erfordern immer noch eine vergleichsweise hohe Experimentezahl. Denn sie schreiben bei jedem Tastzyklus, der einem Schritt in die Erfolgsrichtung vorausgeht, bei m zu untersuchenden Parametern mindestens m Versuche vor.

Im Gegensatz hierzu kommt die **Simplex-Strategie** mit maximal zwei bis drei Versuchen pro Tastzyklus aus; nur zu Beginn der Optimierung müssen $m + 1$ Versuche durchgeführt werden.

Diese Strategie wurde erstmals in einer heute veralteten Form von Dantzig (1947) vorgestellt, in einer verbesserten Form 1962 aus dem EVOP-Verfahren von Spendley et al. (1962) hergeleitet und in der analytischen Chemie von Long (1969) angewendet. Auf Nelder und Mead (1965) geht die heute verbreitete, an Optimierprobleme besser als ihre Vorgängerversionen angepaßte Form, der Simplex-Strategie zurück. Diese Autoren benutzten die Simplex-Methode zur Minimierung von mathematischen Funktionen. Caceci und Cacheris (1984) setzten die Methode ebenfalls zur Funk-

tionsminimierung ein. Sie geben ein Beispiel für die Anpassung der Michaelis-Menten-Kinetik an experimentelle Daten aus enzymatischen Reaktionen. Und auch für die Anwendung als Suchstrategie existieren mittlerweile viele Beispiele vor allem aus dem Bereich der analytischen Chemie (z.B. Deming und Morgan, 1973) und der Verfahrenstechnik (z.B. Fülle und Diekmann, 1989). Selbst im Bereich der Wirtschaft benutzte man die Simplex-Strategie, wenn meist auch in einer veralteten Form (Bland, 1981).

Im Bereich der Biologie hingegen hat die Simplex-Methode als Suchstrategie kaum Eingang gefunden. Einzig Dumenil et al. und Combet (1975) beschreiben die Optimierung einer mikrobiellen Stoffumwandlung von Homoserin zu Threonin durch ruhende Zellen von Enterobacter cloacae.

Zur Optimierung biologischer Systeme wurden bisher statt Suchstrategien meist faktorielle Verfahren herangezogen, obwohl die Simplex-Suchstrategie gegenüber anderen Optimierungsverfahren viele Vorteile aufweist.

Vorteile der Simplex-Methode gegenüber anderen Optimierungsverfahren:

- Die Simplex-Strategie kommt im Gegensatz zu faktoriellen Verfahren zwar ohne Vorversuche aus. Jedoch sollen die vorgeschlagenen Anfangswerte mit dem biologischen System vereinbar sein. Vorversuche können hier zur Beurteilung helfen. Eine Wichtung in einflußreiche und weniger einflußreiche Parameter vor Beginn der Optimierung ist nicht nötig (Yarbro und Deming, 1974).
- Die Methode setzt die zum Erreichen des Optimums nötige Experimentezahl stark herab: Gegenüber Hooke-Jeeves- oder Rosenbrock-Strategien werden pro Tastszyklus nur wenige Tastschritte unternommen, nicht mehr mindestens soviele Tastschritte wie die Anzahl der in die Optimierung miteinbezogenen Parameter. Wenn bei faktoriellen Verfahren k_2 volle faktorielle Pläne bei einer Untersuchung von m Parametern mit jeweils k_1 Versuchen zum Erreichen eines Optimums hintereinandergeschaltet werden müssen, sind N Versuche erforderlich (Yarbro et al. 1974):

$$N = k_2(k_1^m) \quad (2.20)$$

Und auch bei reduzierten faktoriellen Plänen geht die Zahl der Parameter immer mehr als quadratisch in die Zahl der Versuche ein.

Bei der Simplex-Strategie dagegen geht die Zahl der Parameter noch nicht einmal mehr quadratisch in die Zahl der zum Erreichen des Optimums nötigen Suchschritte ein (Fülle und Diekmann, 1989):

$$N = 3 \times m^{1.6} \quad (2.21)$$

- Meßfehler werden "selbsttätig" korrigiert, Wiederholungsmessungen sind nicht nötig (Long, 1969; Spendley et al., 1962).
- Gegenüber faktoriellen Methoden können mehr als 3 Parameter **gleichzeitig** untersucht werden (Nelder and Mead, 1965).
- Es werden keine statistischen Analysen während und nach der Optimierung benötigt. Faktorielle Verfahren dagegen sind auf Signifikanztests zur Bestimmung der Richtung für die Optimierung angewiesen.
- Die mathematischen Grundlagen der Simplex-Vorschrift bestehen aus einfachen geometrischen Operationen (siehe Material und Methoden, Kap. 3.2.2.1). Komplizierte Verschiebungen von Koordinatensystemen wie etwa bei der Rosenbrock-Methode entfallen.
- Jedes beliebige Beurteilungskriterium ist möglich (Long, 1969).

Zur **Erläuterung der prinzipiellen Funktionsweise der Simplex-Strategie** sei an das Bild der Bergbesteigung für die Optimierung erinnert (Abb. 4) und durch die Vorstellung eines mehrbeinigen Tieres, welches den Berg hochläuft, ergänzt. Das in diesem Fall dreibeinige Tier muß durch Testen verschiedener Parameter-Kombinationen für pH-Wert und Temperatur die Kombination finden, bei der die Zielgröße Enzymaktivität ihren maximalen Wert annimmt. Die Positionen seiner Füße entsprechen den zu den jeweiligen Parameterkombinationen gemessenen Enzymaktivitäten. Hierbei steht die Simplex-Strategie für die Art und Weise, wie das Tier mit einer möglichst geringen Zahl von Schritten den Berg hinaufläuft.

Die Strategie besteht aus zwei Hauptteilen: Der erste Teil legt die Anfangsposition am Berg fest, der zweite Teil beinhaltet das Aufwärtsschreiten, die eigentliche **Optimierung**. Für jeden Teil bestehen eigene Vorschriften, mathematisch gesprochen **Algorithmen**.

Nach einer solchen Vorschrift testet der Dreifüßler eine geringe Anzahl von Grundkombinationen, um seine Anfangsposition zu finden. Im Falle der Optimierung zweier Prozeßparameter z.B. pH-Wert und Temperatur, sind dies genau drei Kombinationen (Standortkombinationen der Füße des Tieres). Der Raum, den die Anfangskombinationen mit den jeweils gemessenen Zielgrößenwerten aufspannen, bezeichnet man als **Anfangssimplex**.

Nun beginnt die eigentliche Optimierung: Da der Dreifüßler die Form des Gebirges nicht kennt, wird er intelligenterweise von den drei Füßen den am Berg tiefstliegenden tastend versetzen und zwar unter den beiden anderen Füßen hindurch. Mathematisch kann dieser Tastschritt als **Reflexion** der Parameterkoordinaten des unteren Fußes am Mittelpunkt der anderen verstanden werden.

Trifft er beim Versetzen seines niedrigsten Fußes einen höheren Standort, als dieser bisher innehielt, was einer höheren Enzymaktivität gleichkäme, stellt er ihn dort ab. Und falls der neue Standort nicht nur höher als der des niedrigsten Fußes sondern auch der übrigen Füße liegt, expandiert er den Standort sogar noch weiter in diese günstige Richtung - mathematisch als **Expansion** der reflektierten Position am Mittelpunkt der übrigen verstanden.

Fällt dagegen sein Fuß beim Versetzen (bei der Reflexion) auf eine tiefere Stelle am Berg als zuvor, so wird der Dreifüßler diese Position nicht akzeptieren und diesen Fuß lediglich in Richtung der anderen Füße versetzen oder "kontrahieren". Verbessert sich die Position seines Fußes auch nach dieser **Kontraktion** nicht, so muß er alle Standorte seiner Füße, bis auf den besten, zu deren Mittelpunkt hin kontrahieren (**Schrumpfung**).

In jedem Fall wird der Dreifüßler seinen niedrigsten Fuß nur dann versetzen, wenn er für ihn einen höheren Standort gefunden hat. Sobald sein Fuß eine höhere Position eingenommen hat, spricht man von einem **Iterationsschritt**.

Nach einem solchen Tastzyklus, der in der Regel aus 1-2 Tastschritten (Reflexion oder Reflexion mit Expansion oder Reflexion mit Kontraktion) besteht, wird der

Dreifüßler in einer nächsten Iteration nach genau den gleichen Spielregeln seinen nun tiefststehendsten Fuß versetzen.

Im Falle der Optimierung zweier Parameter benötigt der Vielfüßler drei Beine, um den Berg hochzulaufen. Erhöht sich die Parameterzahl auf m , so benötigt er immer ein Bein mehr als zu optimierende Parameter vorliegen, um seine Optimierung zu starten. Die $m + 1$ Parameterkombinationen mit den dazugehörigen Ergebnissen werden in seinem Hirn gespeichert. In dem nun vieldimensionalen Gebilde bewegt sich der Vielfüßler nach den gleichen Regeln dem Maximum der Zielgröße entgegen, wie zuvor für den dreidimensionalen Fall beschrieben: Auch bei $m + 1$ Parametern wird der niedrigststehende Fuß über den Mittelpunkt der anderen hinausgesetzt. Bei jeder Iteration wird nur die Parameterkombination, die das schlechteste Ergebnis erzielt, durch eine neue bessere ausgetauscht; und der Vielfüßler merkt sich nun die m alten Kombinationen mit den zugehörigen Ergebnissen sowie die neue Kombination. Mit dieser Information wird eine neue Parameterkombination vorgeschlagen (Tastschritt) und das Ergebnis ermittelt usw..

Durch die beschriebenen Schritte Expansion oder Kontraktion wird eine Anpassung an die Topologie des Gebirges erreicht. Eine Verminderung der Schrittzahl zum Erreichen des Optimums gegenüber dem Durchtesten aller möglichen Parameterkombinationen wird v.a. durch zwei Tatsachen erzielt: Der Vielfüßler setzt seinen Fuß immer nur an einen neuen Ort, wenn er einen besseren Standort gefunden hat. Innerhalb einer Iteration kommen maximal 2 Trittversuche vor.

Das Prinzip der Methode besteht also im Verändern der schlechtesten Position in einem vieldimensionalen Gebirge zum Mittelpunkt der übrigen Positionen hin. Diese sind zwangsläufig besser oder gleich gut. Die mathematischen Grundlagen sind in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

3. Material und Methoden

3.1 Anzucht von Lactobacillus confusus

Gefriergetrocknete Zellen von Lactobacillus confusus (DSM 20 196) konnten nach Bezug von der "Deutschen Sammlung für Mikroorganismen" (DSM, Göttingen) nach fünfmaliger Passage im MRS-Flüssigkeitsmedium nach Merck (Kap. 3.2.1.1) für die Stammhaltung, Vorkulturen und weitere Konservierung eingesetzt werden. Zellen aus diesen Anfangskulturen wurden auf Glasperlen im DMSO-haltigen MRS-Medium immobilisiert und bei -80 °C eingefroren. Hierdurch standen nach ebenfalls fünfmaliger Passage Zellen aus derselben Anfangskultur für Langzeitversuche wie kontinuierliche Kulturen oder für eine Neuanzucht nach Infektionsfällen zur Verfügung.

Stammkulturen wurden auf MRS-Agarplatten von den beschriebenen Anfangskulturen angelegt, bei 30 °C 18 h inkubiert und dann bei 4 °C aufbewahrt. Die Überimpfung von Einzelkolonien erfolgte alle drei Tage.

Frisch bebrütete Agarplatten dienten zum Animpfen von 200 ml Vorkulturen in 500 ml-Erlenmeyer-Kolben. Die Zellen wuchsen als Standkulturen im MRS-Medium nach Merck bei 30 °C 14 h lang heran, wurden dann bei 8000 upm (5100 g) im GS3- oder GSA-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert und bei der Aufnahme in sterilem Kalium-Phosphat-Puffer (KPi-Puffer, pH 7) etwa 10-fach konzentriert. Die so gewaschenen Zellen dienten zum Animpfen aller weiteren Hauptkulturen. Die Animpfdichte dieser Hauptkulturen betrug, soweit nicht anders vermerkt, bei 578 nm 0.1. Dies entsprach je nach Dichte der Vorkulturen einer circa 5 - 7.5 %-tigen Beimischung (vol/vol), bezogen auf das Volumen der ungewaschenen Vorkultur pro Hauptkultur. Jede Animpf- und Hauptkultur wurde mikroskopisch und durch dreitägige Bebrütung auf Agarplatten auf ihre Reinheit hin überprüft.

3.2 Untersuchungen zu Wachstumsbedingungen und Enzymaktivität

3.2.1 Sukzessive Faktorenvariation

3.2.1.1 Verfahren

Ein Faktor, z.B. der pH-Wert oder die Wachstumstemperatur, wurde unter Konstanthaltung aller übrigen Bedingungen variiert und die Antwort des Systems, z.B. die Enzymaktivität oder verschiedene Wachstumsparameter, beobachtet. Das Prinzip der Methode ist in Kap 2.5 beschrieben.

3.2.1.2 Kulturmedien

Für alle nachfolgenden Batch- und Kolbenversuche gilt eine Autoklavierzeit von 20 min. Es erfolgte eine Nachtitration auf den jeweiligen pH-Wert des Versuches, da der pH-Wert sich beim Autoklavieren und durch spätere Zusätze um 0.5 oder mehr pH-Einheiten änderte. Bei kontinuierlichen Kulturen wurde die Autoklavierzeit auf 1 h 20 min verlängert, da bei kürzeren Sterilisationszeiten Kontaminationen aufgetreten waren. Zucker, Malzextrakt (Kap. 3.2.2.2) und Aminosäuren wurden separat autoklaviert und hitzelabile Keto-, Hydroxysäuren und Vitamine sterilfiltriert. Zur Sterilfiltration dienten bei kleinen Volumina Nalgene-Filter (0.2 μ m Porengröße; Nalge, Rochester, USA) und bei Volumina über 5 ml Sterivex-GM-Filter (0.2 μ m Porengröße; Millipore, Bad Homburg). Alle Zusätze wurden über sterile Stahlschnellkupplungen oder direkt ins Nährmedium gepumpt, bis das Arbeitsvolumen erreicht war. Dieses betrug bei Fermentationen 1 l oder 5 l, bei Vorratsmedien 15 l und bei Kolbenversuchen 200 ml. Die getrennte Sterilisation von Zuckern dient der Vermeidung von Maillard-Reaktionen, bei denen toxische Produkte durch die Reaktion von NH_2 -Gruppen mit Zucker-Aldehyd-Gruppen entstehen können.

Standard-MRS-Medium nach deMan, Rogosa und Sharpe (1960) (Tab. 2): Dieses Medium diente für Batch- und kontinuierliche Versuche im Fermenter und enthielt die in Tab. 2 beschriebenen Bestandteile. Der Original-pH-Wert von pH 6.5 und die Original-Glucose-Monohydrat-Konzentration von 20 g/l (entsprechend 18.18 g Glucose/l) wurden je nach Versuch abgeändert.

MRS-Medien nach Merck und nach Hummel et al. (1983): In Abwandlung zum ersten Medium waren beim käuflichen MRS-Medium Universalpepton statt Pepton aus Casein, nur 5 statt 10 g Fleischextrakt, 0.1g MgSO_4 statt 0.2 g pro l Medium enthalten. Dieses Medium diente zur Herstellung von Animpfkulturen (pH 6.5) oder Agarplatten; wobei dem MRS-Medium für Agarplatten 20 g Agar pro l zugesetzt wurde. Hummel et al. (1983) beschreibt ein MRS-Medium mit 5 g Fleischextrakt pro l und 0.1 g statt 0.2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ / l .

Verdünntes MRS-Medium: Das MRS-Medium nach deMan et al. kam in einer 20-fachen Verdünnung für Untersuchungen zum Zuckerspektrum und zum Einfluß organischer Säuren auf das Wachstum zur Anwendung. Bei Versuchen zum Zuckerspektrum enthielt das verdünnte Medium einen Zusatz von 10 ml der entsprechenden, separat autoklavierten Zucker zu einer Endkonzentration von 3 g Zucker/l und einem Endvolumen von 200 ml. Um die von den Bakterien gebildete Säure abzuf puffern, wurde in manchen Fällen CaCO_3 (3% wt/wt) am Vortag zu dem bereits autoklavierten Medium zugesetzt.

Bei Untersuchungen mit organischen Säuren betrug deren Konzentration 3 g/l. In diesem Fall erfolgte der Glucose-Zusatz aus einer stark konzentrierten Stammlösung (1-2 ml) zu einer Endkonzentration von 1 g/l.

M₂-Medium (Tab. 2): Dieses Medium entsprach mit Ausnahme einer erhöhten MgSO₄-Konzentration dem aus Kostengründen für die D-Lactat-Dehydrogenase-Produktion minimierten M₂-Medium (Hummel et al., 1983) und war wie in (Tab. 2) zusammengesetzt. Es wurde in kontinuierlichen und Batch-Fermentationen eingesetzt, zum Teil mit sterilfiltrierten Vitaminen.

Bestandteil	MRS-Medium		M ₂ -Medium	
	Konzentration		Konzentration	
	(g/l)	(mM)	(g/l)	(mM)
Pepton aus Casein (tryptisch)	10		0	
Fleischextrakt	10		0.5	
Hefeextrakt	5		10	
Tween 80	1		0	
K ₂ HPO ₄	2	11.48	2	11.48
Natriumacetat	5	60.95	0	0
Diammonium-Hydrogen-Citrat	2	8.84	2	8.84
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.2	0.81	0.2	0.81
MnSO ₄ × H ₂ O	0.2	1.18	0.05	0.30
Glucose-Monohydrat	10 - 80	50.45 - 403.6	20	100.9
ad 1 l H ₂ O dest.				

Tab. 2. Standard-Kulturmedien: MRS-Medium nach deMan et al. (1960) und M₂-Medium nach Hummel et al. (1983)

3.2.1.3 Kulturbedingungen

Alle Kolbenkulturen enthielten 200 ml Medium in 300 ml- oder 500 ml-Erlenmeyerkolben. Animpfkulturen wuchsen bei 30 °C als Standkulturen in 500 ml-Kolben.

Für die Temperierung auf 37 °C und Durchmischung aller übrigen Kolbenkulturen in 300 ml Kolben sorgte eine Tisch-Rundschüttelmaschine (Infors, Bottmaringen, CH) mit Inkubationshaube bei einer Rührgeschwindigkeit von 150 upm. Je nach Versuch wuchsen die Zellen nicht-pH-statisiert oder mit CaCO₃ gepuffert oder unter halb-stündlicher Nachtitration des pH-Wertes mit 50 - 100 µl steriler 4 N NaOH. Bei Nachtitration erfolgten pH-Kontrollen und Sterilkontrollen. Der pH-Wert betrug, sofern nicht anders angegeben, 6.5. Die Kolben wurden in Parallel- oder Dreifach-Ansätzen einschließlich Doppelkontrollen untersucht.

Bei Batch-Fermentationen im Biostaten E (Braun Diesseltech GmbH, Bad Melsungen) betrug das Arbeitsvolumen 5 l, die Rührgeschwindigkeit 300 upm, die Temperatur

30 °C oder 37 °C, der pH-Wert 6.5 oder 6.8. Die Zellen wuchsen unter leichter Stickstoffbegasung, von circa 0.2 NI/(min × l Kulturvolumen).

Kontinuierliche Fermentationen im M₂-Medium und MRS-Medium nach deMan liefen im Biostaten M (Braun Diesseltech GmbH, Bad Melsungen) bei einem Arbeitsvolumen von 1 l, Verdünnungsraten von 0.05 - 0.8 h⁻¹, einer Temperatur von 30 °C, 300 upm Rührgeschwindigkeit und einer Stickstoffbegasung von 0.2 NI/(min × l). Der apparative Aufbau ist in Kap. 3.3 beschrieben.

3.2.2 Simultane Faktorenvaryation (Simplex-Verfahren)

3.2.2.1 Verfahren

Für die Simplex-Optimierung der Kulturbedingungen und Nährmediumszusammensetzung wurde die Methode nach Nelder und Mead (1965) herangezogen. Die Ausgangssituation wurde nach der Methode von Spendley et al. (1962) in einer leichten Abwandlung nach Yarbrow und Deming (1974) festgelegt. Eine anschauliche Beschreibung der Methode findet sich in Kap. 2.5 unter "prinzipielle Funktionsweise der Simplex-Strategie".

Begriffsdefinitionen

Einige zum Verständnis der Methode erforderliche Begriffe sind nachfolgend erklärt:

- *Optimieren*
Suche nach der besten Lösung für ein Problem
- *Faktoren x_i*
Einflußgrößen (hier die Kulturbedingungen und Nährmediumszusammensetzung) auf die Zielgröße der Optimierung (hier die Volumenaktivität der L-Hic-DH)
Die Faktoren werden als Dimensionen im Raum aufgefaßt. Die jeweiligen Koordinatenabschnitte geben die Werte der Faktoren an. Diese Koordinaten sollen so verändert werden, daß die Zielgröße des Prozesses einen maximalen Wert annimmt.
- *m*
Zahl der Faktoren, die in die Optimierung miteinbezogen werden
- *Antwort y_i*
Versuchsergebnis bei einer bestimmten Kombination von Faktorenwerten
Die Antwort wird als $(m + 1)$ -te Dimension des Optimierproblems aufgefaßt.
 y_L : schlechtestes Ergebnis, $y_L = \min (y_i)$, L steht für low
 y_H : bestes Ergebnis, $y_H = \max (y_i)$, H steht für high
- *n*
Zahl der Dimensionen des Optimierproblems; $n = m + 1$

- **Vertex**
eine Kombination aus beliebigen Koordinatenabschnitten der m Faktoren; nachfolgend vereinfachend als Faktorenkombination bezeichnet; bildet man statt einer Vertex $(m + 1) = n$ Faktorenkombinationen, so erhält man n verschiedene Punkte $P_1 \dots P_n$ im Raum der Optimierung.
- **Simplex**
geometrischer Raum, der durch $(m + 1) = n$ Vertices (Faktorenkombinationen) mit deren zugehörigen Antworten $y_i = y_1 \dots y_n$ aufgespannt wird; die Simplex wird durch die Punkte $P_1 \dots P_n$ mit entsprechenden Ergebnissen bestimmt, also immer durch einen Punkt mehr als zu optimierende Faktoren vorliegen.

Die Simplex läßt sich in Form einer Matrix schreiben (Tab. 3):

Vertex-Nr.	Faktoren				Antwort
Beispiel	pH	T	...	D	Enzymaktivität
1	a_{11}	a_{12}	...	a_{1m}	y_1
2	a_{21}	a_{22}	...	a_{2m}	y_2
3	a_{31}	a_{32}	...	a_{3m}	y_3
.	.	.	...	.	.
.	.	.	...	.	.
.	.	.	...	.	.
m	a_{m1}	a_{m2}	...	a_{mm}	y_m
n	a_{n1}	a_{n2}	...	a_{nm}	y_n

Tab. 3. Allgemeine Matrix einer Simplex: für m Faktoren

Jede Zeile entspricht einer Vertex aus verschiedenen Faktoren. Jede Spalte entspricht den verschiedenen Werten, die der gleiche Faktor in einer Simplex annehmen kann.

- **Startvertex**
eine Kombination von Faktorenkoordinaten, von der ausgehend m weitere Kombinationen berechnet werden
- **Anfangssimplex**
Raum, der durch n Vertices zu Beginn einer Optimierung aufgespannt wird; der Raum wird im Text auch als Ausgangssituation, und die n Vertices der Anfangssimplex werden als Anfangskombinationen bezeichnet.
- **Schrittweite**
Betrag des Variationsbereiches, innerhalb dessen die Koordinaten für jeden Faktor bei der Berechnung der Anfangssimplex schwanken dürfen; dieser Bereich wird für jeden Faktor vor Berechnung der Anfangssimplex festgelegt; der Begriff bezieht sich nicht auf die Schrittweite des Verfahrens bei laufender Optimierung

- **Iterationsschritt**
nach Bestimmung der Anfangssimplex sich wiederholende feste Abfolge von Rechenoperationen
Die Rechenschritte folgen hier dem Algorithmus nach Nelder und Mead. Der Iterationsschritt führt zum Ersatz der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis durch eine neue Vertex mit einem besseren Ergebnis und damit zu einer neuen Simplex. Da die übrigen Vertices beibehalten werden, bleibt die Anzahl der Vertices nach jedem Iterationsschritt gleich.
- **Algorithmus**
Rechenvorschrift, ausführbar und eventuell wiederholbar
- **Mittelwert der Ausgangskombinationen**
Wert, der sich durch die spaltenweise Addition aller Werte für einen Faktor oder das Ergebnis in der Anfangssimplex und durch die nachfolgende Division durch die Anzahl der Vertices (n) ergibt
- **Mittelwert der Simplex**
Wert, der sich durch die spaltenweise Addition der Werte für einen Faktor oder das Ergebnis in der jeweiligen Iteration und durch die nachfolgende Division durch n ergibt.

Übertragung auf das Anschauungsbeispiel in Kap. 2.5:

Im dreidimensionalen Problem des Auffindens der maximalen Enzymaktivität (y_H) sind Temperatur und pH-Wert ($m = 2$) die beiden zu variierenden Faktoren. Eine Vertex entspricht hier einer Kombination von pH-Wert und Temperatur. Ein Standort des in diesem Fall dreibeinigen Vielfüßlers ergibt sich aus der zu dieser Kombination gemessenen Enzymaktivität. Die Anfangssimplex wird durch drei verschiedene Kombinationen von pH-Wert und Temperatur ($m + 1 = 3$ Vertices) sowie den Standorten seiner drei Füße (Ergebnisse $y_1 \dots y_3$) aufgespannt.

Faktorenwahl und Zielgröße

Die Wahl der Faktoren aus dem Bereich der Nährmediumskomponenten und der Fermentationsbedingungen ist in Kap. 4.3.1 beschrieben. Zielgröße war die L-Hic-DH-Volumenaktivität im steady state der kontinuierlichen Kultur.

Berechnung der Anfangssimplex

Zur Berechnung der Anfangssimplex wurde für jeden Faktor ein Variationsbereich ($a_{\min} \dots a_{\max}$) gewählt (Kap. 3.2.2.2). Die Schrittweite s_n für die Variation der Faktoren in der Anfangssimplex betrug bei allen Faktoren 80 % dieses Variationsbereiches ($S_n = 0.8 \times (a_{\max} - a_{\min})$). Die Startvertex selbst kann zu Beginn frei gewählt werden. Es wurde eine Kombination gewählt, bei der bereits ein gutes Ergebnis gemessen worden war. Die Zahlenwerte (Kap. 3.2.2.2, Tab. 4) orientierten sich am MRS-Medium (Kap. 3.2.1.2). Die Schrittweite war mit 80 % sehr groß, um zu Beginn einen mög-

lichst großen Meßbereich abzudecken. Auch sollten hierdurch große Unterschiede in den Kulturbedingungen eingestellt werden, um überhaupt Unterschiede in der Enzymaktivität feststellen zu können. Falls der Algorithmus statt als Suchverfahren als Vorschrift für die Anpassung von Meßparametern an Modelle herangezogen wird, empfiehlt es sich, für die Modellparameter erwartete Werte in der Startvertex einzusetzen, die Schrittweite aber kleiner, zwischen 1 - maximal 10 % des Variationsbereiches zu wählen.

Allgemein gesprochen nehmen die Werte der Startvertex die Werte $a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1m}$ an. Die übrigen 32 Vertices werden ausgehend von den Werten der Startvertex durch Addition von p und q gemäß der folgenden Matrix nach Yarbro und Deming (1974) berechnet (Tab. 3). Die Zahlenwerte der Anfangssimplex finden sich in Tab. 4 und 5. In 32 dieser Vertices haben 31 Faktoren ein gleich hohes Niveau; in jeweils einer Vertex (dort, wo p addiert wurde) ist nur ein Faktor stark gegenüber seinem sonstigen Niveau in den übrigen 32 Vertices erhöht.

Die Startvertex nimmt insgesamt niedrigere Werte als die übrigen 32 Vertices an, da hier keine Addition von p - und q -Werten erfolgt.

Die 33 Vertices wurden in kontinuierlicher Kultur nacheinander eingestellt. Hierzu wurden 33 verschiedene Nährmedien hergestellt und die entsprechenden Fermentationsbedingungen laut den Vorschlägen in der Anfangsmatrix eingehalten. Nach Probenahme im steady state und off-line Bestimmung der Volumenaktivitäten ergab sich die n -te Spalte (Ergebnisspalte) der Anfangssimplex. Alle Vertices und Ergebnisse wurden im Computer gespeichert und zur Berechnung einer neuen Vertex herangezogen. Hierdurch wird die eigentliche Optimierung gestartet.

Vertex-Nr.	Faktoren					
	1	2	3	...	$m - 1$	m
1	a_{11}	a_{12}	a_{13}	...	a_{1m-1}	a_{1m}
2	$a_{11} + p$	$a_{12} + q$	$a_{13} + q$	...	$a_{1m-1} + q$	$a_{1m} + q$
3	$a_{11} + q$	$a_{12} + p$	$a_{13} + q$	...	$a_{1m-1} + q$	$a_{1m} + q$
4	$a_{11} + q$	$a_{12} + q$	$a_{13} + p$	...	$a_{1m-1} + q$	$a_{1m} + q$
.	.	.	.	...	.	.
.	.	.	.	...	.	.
.	.	.	.	...	.	.
m	$a_{11} + q$	$a_{12} + q$	$a_{13} + q$	...	$a_{1m-1} + p$	$a_{1m} + q$
$m + 1 = n$	$a_{11} + q$	$a_{12} + q$	$a_{13} + q$	...	$a_{1m-1} + q$	$a_{1m} + p$

Tab. 4. Berechnung der Anfangssimplex aus der Startvertex: nach Yarbro und Deming (1974)

mit

$a_{11} \dots a_{1m}$ Werte der Startvertex
 m Zahl der Faktoren
 n Zahl der Dimensionen der Simplex

S_n Schrittweite für die Anfangssimplex

$$p = \frac{s_n}{m\sqrt{2}} (\sqrt{n} + m) \quad (3.1)$$

$$q = \frac{s_n}{m\sqrt{2}} (\sqrt{n} - 1) \quad (3.2)$$

Optimierung

Die Vertices mit dem besten Ergebnis, also der höchsten Enzymaktivität, y_H und dem schlechtesten Ergebnis y_L werden zunächst ermittelt.

Dann erfolgt die Bestimmung des Mittelpunktes im Raum der 32 besten Vertices. Diese Operation entspricht der spaltenweisen (faktorenweisen) Addition der Werte in der obigen Matrix (Tab. 3). Dabei sind die Werte der Ergebnisspalte und der Zeile (Vertex) mit dem schlechtesten Ergebnis von der Addition ausgenommen. Die Operation schließt die Division der Summe jeder Spalte durch m ein. Hieraus ergeben sich die Koordinaten des Mittelpunktes aller Vertices. Dieser, auch als Zentroid bezeichnete Punkt, wird durch $\bar{P}$ symbolisiert.

Es schließt sich die Suche nach einer Vertex an, die, wenn sie eine besseres Ergebnis erzielt, die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis ersetzen soll. Drei Schritte können zum Finden einer "besseren Vertex" dienen: Reflexion, Kontraktion, Expansion.

1. Reflexion

Die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis wird am Mittelpunkt der übrigen Vertices, dem Zentroid, gespiegelt:

$$P^* = (1 + \alpha)\bar{P} - \alpha P_L \quad (3.3)$$

mit

P^*	Koordinaten der reflektierten Vertex
α	Reflektionskoeffizient, wählbare Konstante > 1
$\bar{P}$	Koordinaten des Mittelpunktes aller Vertices außer der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis
P_L	Koordinaten der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis

2. Expansion

Die reflektierte Vertex wird am Mittelpunkt $\bar{P}$ expandiert, falls die reflektierte Vertex ein besseres Ergebnis als y_H erzielte.

$$P^{**} = \gamma P^* + (1 - \gamma)\bar{P} \quad (3.4)$$

mit

P^*	Koordinaten der expandierten Vertex
γ	Expansionskoeffizient, wählbare Konstante > 1
P^*	Koordinaten der reflektierten Vertex
$\bar{P}$	Koordinaten des Mittelpunktes aller Vertices außer der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis

3. Kontraktion

Die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis wird zum Mittelpunkt der übrigen Vertices hin kontrahiert, wenn die reflektierte Vertex ein schlechteres Ergebnis als y_L erzielt.

$$P^{***} = \beta P_L + (1 - \beta)\bar{P} \quad (3.5)$$

mit

P^{***}	Koordinaten der kontrahierten Vertex
β	Kontraktionskoeffizient, wählbare Konstante von 0 - 1
P_L	Koordinaten der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis
$\bar{P}$	Koordinaten des Mittelpunktes aller Vertices außer der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis

Statt P_L kann auch P^* eingesetzt werden.

4. Schrumpfung

Falls die Kontraktion der Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis zum Mittelpunkt der übrigen hin eine Vertex ergibt, deren Ergebnis immer noch schlechter als y_L ist, werden alle Vertices geschrumpft. Hierzu werden alle Koordinaten außer denen der besten Vertex zu dieser besten Vertex hin kontrahiert, und alle P_i werden durch $(P_i + P_H)$ ersetzt.

$$P_i = (P_i + P_H) / 2 \quad (3.6)$$

mit

P_H	Vertex mit dem besten Ergebnis
P_i	Koordinaten aller übrigen Vertices

Die Koeffizienten α , β , γ werden zu Beginn der Optimierung gewählt und in der Regel während der Optimierung konstant gehalten. Richtwerte geben Nelder und Mead (1965) an. Die Werte in der vorliegenden Optimierung sind im Abschnitt "Computerprogramm" zu finden. Zu hohe Werte für α und γ können vermehrt zu Vorschlägen außerhalb eines physiologisch sinnvollen Bereiches führen, zu niedrige ein langsames Fortschreiten der Optimierung verursachen.

Die Änderung der Faktoren in der jeweiligen Iteration ist in jedem Schritt je nach Höhe der Koeffizienten und dem "Abstand" der Vertex mit dem schlechtesten Ergeb-

nis vom Mittelpunkt der anderen Vertices unterschiedlich hoch. Daher soll der Begriff Schrittweite hier nur auf die Anfangssimplex beschränkt bleiben.

Wann die genannten Operationen angewendet werden, geht aus dem Anschauungsbeispiel in Kap. 2.5 unter "prinzipielle Funktionsweise der Simplex-Strategie" und dem nachfolgenden Fließschema in Abb. 5 hervor.

Immer dann, wenn eine Vertex durch eine Kombination mit einem besseren Ergebnis ersetzt wird, ist eine Iteration abgeschlossen.

Variationsbereich für die Faktoren während der Optimierung

Falls der Algorithmus für einen Faktor physiologisch unsinnige Werte, wie negative Werte oder eine Verdünnungsrate von 0 h^{-1} , einen pH-Wert von 1 vorschlug, wurden andere Werte in der Fermentation eingestellt. Meist entsprachen diese der vorgeschlagenen Tendenz. Die geänderten Faktoren wurden über eine Korrekturmöglichkeit in die Berechnung neuer Vertices miteinbezogen. Hierdurch oder durch Eingabe eines schlechten Ergebnisses (Deming und Morgan, 1973) ist eine indirekte Kontrolle des Variationsbereiches der Faktoren während der Optimierung möglich. Im Laufe der Optimierung werden auch Faktorenwerte außerhalb des Bereiches für die Berechnung der Anfangssimplex eingesetzt.

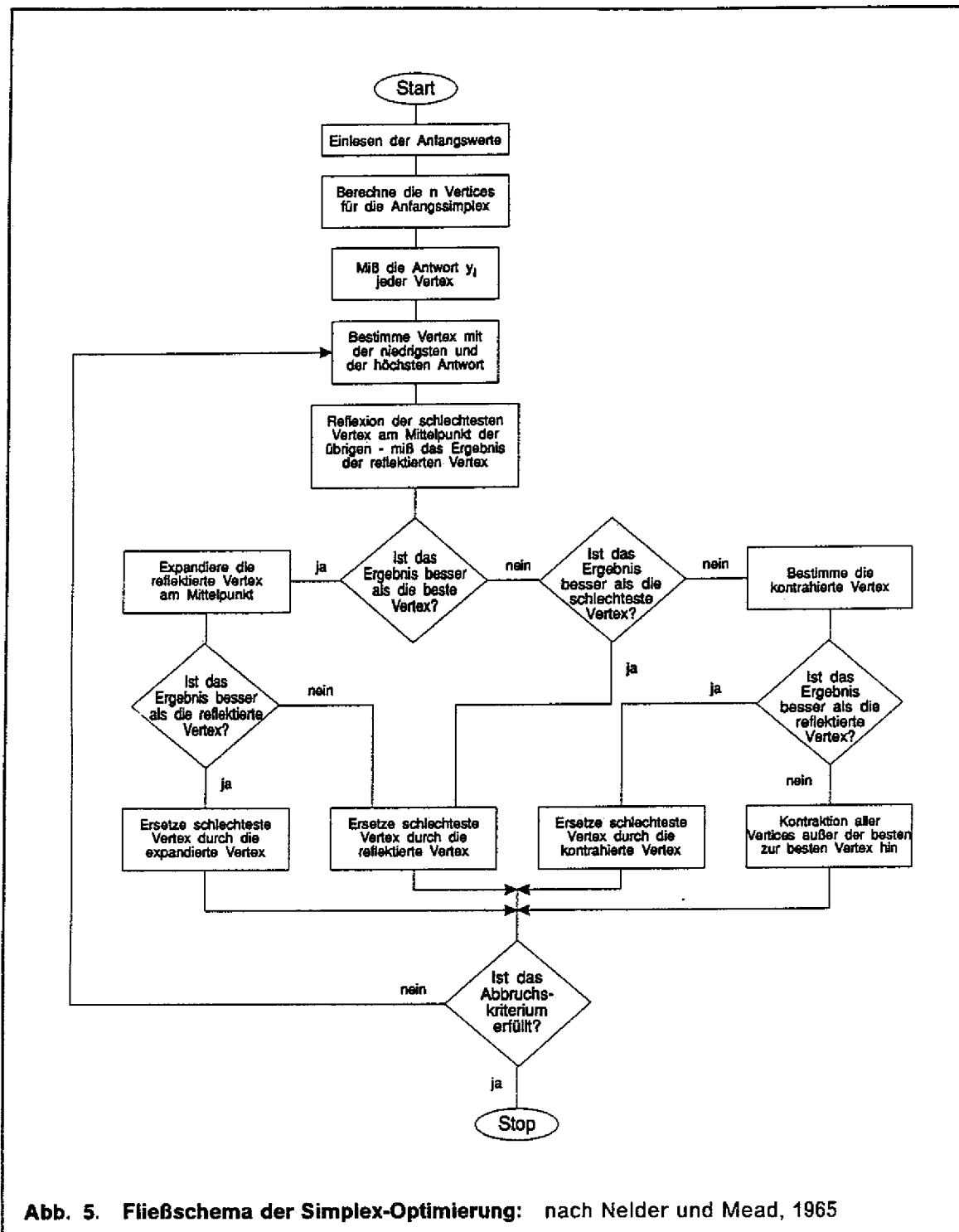
Abbruch der Optimierung

Die Optimierung sollte abgebrochen werden, wenn in n aufeinander folgenden Iterationen die Ergebnisse nur noch innerhalb ihrer Fehlergrenze, die als 8 % der Volumenaktivität angenommen wurde, schwankten.

$$|y - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i| < 0.08 \quad (3.7)$$

Computerprogramm

Ein Computerprogramm zur Berechnung der Anfangssimplex und der Optimierung wurde in Microsoft Basic erstellt und ist in Anhang C ersichtlich. Informationen über n , m werden über input-Befehle, Informationen über Schrittweiten und Variationsbereiche für die Faktoren in der Anfangssimplex werden über DATA-Befehle eingegeben. Für die vorliegende Optimierung wurden die folgenden Konstanten eingegeben: $n = 33$, $m = 32$ (Zahl der Faktoren), $s_n = 80 \%$ (Schrittweiten), $\alpha = 2$ (Reflektionskoeffizient), $\beta = 0.5$ (Kontraktionskoeffizient), $\gamma = 2$ (Expansionskoeffizient) Das Programm sieht Korrekturmöglichkeiten für Faktorenwerte vor. Nach jeder Eingabe des Ergebnisses kann die Korrektur der zuvor getesteten Vertex angegeben werden. Vom Vorschlag des Algorithmus abweichende Fermentationen können so beim Fortschreiten der Optimierung berücksichtigt werden. Das Abbruchkriterium war nicht Bestandteil des Programms. Die Berechnung von Vorschlägen für Kulturmedien und Fermentationsbedingungen wurde off-line durchgeführt.



3.2.2.2 Kulturmedien und -bedingungen

Kulturmedien wurden wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben zubereitet. Die Zusammensetzung und die Kulturbedingungen der Startvertex, von der aus die übrigen 32 Vertices der Anfangssimplex berechnet werden, gibt Tab. 5 wieder. Die Tabelle gibt außerdem das Durchschnittsniveau der Faktoren in den übrigen 32 Vertices an. Das

Durchschnittsniveau (auch "Normalniveau") entspricht den Positionen $a_{ix} + q$ in der jeweiligen Spalte der Tab. 4. Diese 32 übrigen Vertices der Anfangssimplex waren einander bis auf eine Ausnahme gleich: In jeder Vertex war jeweils ein Faktor - und zwar in jeder Vertex ein anderer - stark gegenüber dem Normalniveau in den übrigen 32 Vertices erhöht. Das Normalniveau der Faktoren in den Vertices 2 - 33 ist in der vorletzten Spalte in Tab. 5 und die Erhöhung der jeweiligen Faktoren in Tab. 6 ersichtlich. Man beachte, daß Tab. 5 nach Faktoren (entsprechend den Spalten der in Tab. 4 dargestellten Matrix) und Tab. 6 nach Vertices (entsprechend den Zeilen in der in Tab. 4 dargestellten Matrix) geordnet sind.

Vitamine, Spurenelemente und die Zusammensetzung von "Mix" sind im Anschluß gesondert dargestellt. Vitamine und Spurenelemente wurden als Stammlösungen bei - 20 °C bzw. 4 °C aufbewahrt. Die Vitamine Folsäure, Thiamin, Riboflavin und die Spurenelemente Mangan und Eisen wurden als Einzelfaktoren in die Optimierung miteinbezogen. Ihre Werte wurden direkt in μg oder mg/l Vorratslösung in das Computerprogramm eingesetzt. Die übrigen Vitamine wurden als Vitamingemisch als Ganzes in konstantem Konzentrationsverhältnis zueinander und zur Spurenelemente-Lösung (Hutner-Lösung, Tab. 7) variiert. Beide Lösungen werden als Faktor 32 (Mix) normiert eingesetzt. Ein Wert von 1 entspricht dabei 4 ml der Hutner-Lösung, je 10 μg Nicotinamid, Calciumpantothenat, Pyridoxin-HCl, 5 μg Pyridoxamin, 2 μg Biotin und je 0.1 μg Vitamin B12 (Cyanocobalamin) und para-Aminobenzoessäure pro l Vorratsmedium. $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ wurden aus 1000 x konzentrierten Stammlösungen zugesetzt. Tab. 7 faßt die Konzentrationen von Vitaminen und Spurenelementen in der Anfangssimplex zusammen.

Zubereitung von Maisquellwasser:

Ein Teil Corn steep und 10 Teile entionisiertes Wasser wurden nach pH-Einstellung auf pH 7 mit KOH über Nacht gerührt, dann 20 min bei 8000 upm im GS 3-Rotor der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand bei - 20 °C in Portionen eingefroren. Der Zusatz zur Kultur betrug 0 - 30 ml pro l Kulturvolumen.

	Faktor-Nr. (x)	Faktor	Einheit	Start-vertex a_{1x}	übrige Vertices $a_{1x} + q$	Berechnung $a_{\min}, a_{\max}$
Kulturbedingungen	1	Rührerdrehzahl	upm	200	260	100 - 800
	2	Verdünnungsrate (D)	(1/h)	0.16	0.205	0.06 - 0.6
	3	pH-Wert		6.2	6.54	4.5 - 8.5
	4	Temperatur	°C	29	30.2	25 - 39
	5	N ₂ -Begasung	NI/(minxl)	0.2	0.32	0.16 - 1.6
Zucker	6	Glucose × H ₂ O	g/l	10	13.4	0 - 40
	7	Maltose × H ₂ O	g/l	5.0	7.5	0 - 30
Komplexe Extrakte	8	Hefeextrakt	g/l	10.0	12.5	0 - 30
	9	Corn steep	ml/l	0	2.52	0 - 30
	10	Malzextrakt	g/l	0	2.52	0 - 30
	11	Pepton (Casein)	g/l	5.0	7.52	0 - 30
	12	Fleischextrakt	g/l	5.0	7.52	0 - 30
einzelne Spurenelemente	13	MnSO ₄ × 7 H ₂ O	mg/l	0.025	0.11	0 - 1
	14	FeSO ₄ × H ₂ O	mg/l	2.0	3.68	0 - 20
Wachstumsverstärker	15	Tween 80	g/l	1.0	1.42	0 - 5
einzelne Vitamine	16	Folsäure	μg/l	2.0	6.2	0 - 50
	17	Riboflavin	μg/l	10.0	18.4	0 - 100
	18	Thiamin	μg/l	10.0	18.4	0 - 100
anorganische P-, N-Quelle, Sonstiges	19	K ₂ HPO ₄	g/l	2.0	2.42	0 - 5
	20	NH ₄ Cl	g/l	1.0	1.42	0 - 5
	21	Monocitronensäure	g/l	1.0	1.42	0 - 5
	22	Ascorbinsäure	g/l	0.5	0.67	0 - 2
Aminosäuren	23	Leucin	g/l	0	0.42	0 - 5
	24	Isoleucin	g/l	0	0.42	0 - 5
	25	Valin	g/l	0	0.42	0 - 5
	26	Arginin	g/l	0	0.42	0 - 5
	27	Asparaginsäure	g/l	0	0.42	0 - 5
	28	Tryptophan	g/l	0	0.42	0 - 5
	29	Methionin	g/l	0	0.42	0 - 5
Ketosäuren	30	Ketoleucin	g/l	0	0.42	0 - 5
	31	Ketovalin	g/l	0	0.42	0 - 5
Mix	32	Mix	-	0	0.42	0 - 5

Tab. 5. Faktoren in der Anfangssimplex: Kulturbedingungen und Mediumszusammensetzung in der Startvertex und den übrigen 32 Vertices (Normalniveau ohne Erhöhung); die angegebenen Vitamine und Aminosäuren wurden zusätzlich zu den bereits in komplexen Extrakten enthaltenen zugesetzt. Die letzte Spalte gibt den Variationsbereich ($a_{\min} \dots a_{\max}$) für die Berechnung der Anfangssimplex an (In Tab. 4 sind die Faktoren in Zeilenrichtung aufgeführt)

Vertex-Nr.	erhöhter Faktor	Einheit	erhöhter Wert $a_{ix} + p$	Erhöhung gegenüber dem Normalniveau	
1	Startvertex	-	-	-	-
2	Rührerdrehzahl	upm	660	400	2.5x
3	Verdünnungsrate (D)	(1/h)	0.511	0.306	2.5x
4	pH-Wert	-	8.8	2.3	-
5	Temperatur	°C	38.1	7.9	-
6	N ₂ -Begasung	NI/(minxl)	1.14	0.82	-
7	Glucose x H ₂ O	g/l	36.0	22.6	2.7x
8	Maltose x H ₂ O	g/l	24.5	17.0	3.3x
9	Hefeextrakt	g/l	29.5	17.0	2.4x
10	Corn steep	ml/l	19.5	17.0	7.7x
11	Malzextrakt	g/l	19.5	17.0	7.7x
12	Pepton (Casein)	g/l	24.5	17.0	3.3x
13	Fleischextrakt	g/l	24.5	17.0	3.3x
14	MnSO ₄ x 7 H ₂ O	mg/l	0.68	0.57	6.2x
15	FeSO ₄ x H ₂ O	mg/l	14.99	11.33	4.1x
16	Tween 80	g/l	4.3	2.9	3.0x
17	Folsäure	µg/l	34.52	28.3	5.5x
18	Riboflavin	µg/l	75.0	56.6	4.1x
19	Thiamin	µg/l	75.0	56.6	4.1x
20	K ₂ HPO ₄	g/l	5.3	2.87	2.2x
21	NH ₄ Cl	g/l	4.3	2.88	3.0
22	Monocitronensäure	g/l	4.3	2.88	3.0
23	Ascorbinsäure	g/l	1.8	1.13	2.7x
24	Leucin	g/l	3.3	2.88	7.9x
25	Isoleucin	g/l	3.3	2.88	7.9x
26	Valin	g/l	3.3	2.88	7.9x
27	Arginin	g/l	3.3	2.88	7.9x
28	Asparaginsäure	g/l	3.3	2.88	7.9x
29	Tryptophan	g/l	3.3	2.88	7.9x
30	Methionin	g/l	3.3	2.88	7.9x
31	Ketoleucin	g/l	3.3	2.88	7.9x
32	Ketovalin	g/l	3.3	2.88	7.9x
33	Mix	-	3.3	2.88	7.9x

Tab. 6. Erhöhung von Faktoren in der Anfangs-Simplex: Erhöhung der Einzelfaktoren in den jeweiligen Vertices gegenüber ihrem Normalniveau. Die Tabelle ist in Zeilenrichtung der Matrix in Tab. 4 geordnet.

	Anfangssimplex Vertex 2 - 32 Normalniveau ($a_{1x} + q$)	Anfangssimplex Vertex 2 - 32 erhöhtes Niveau ($a_{1x} + p$)	Variations- bereich Anfangssimplex
Vitamine ($\mu\text{g/l}$ Kulturmedium)			
Folsäure	6.20	34.48	0 - 50
Thiamin HCl	18.4	74.96	0 - 100
Riboflavin	18.4	74.96	0 - 100
Nicotinamid	4.19	32.5	0 - 50
Ca-Pantothenat	4.19	32.5	0 - 50
Biotin	0.84	6.5	0 - 10
Pyridoxin HCl	4.19	32.5	0 - 50
Vitamin B ₁₂	0.04	0.32	0 - 0.5
Pyridoxamin	2.10	16.24	0 - 25
p-Amino- benzoesäure	0.04	0.32	0 - 0.5
Spurenelemente			
MnSO ₄ × 7 H ₂ O (mg/l)	0.68	4.3	0 - 1
MgSO ₄ × H ₂ O (mg/l)	14.99	34.5	0 - 20
Hutner-Lösung	0.42 $\equiv$ 1.68 ml/l	3.3 $\equiv$ 13.21 ml/l	0 - 5 $\equiv$ 0 - 20 ml/l

Tab. 7. Vitamine und Spurenelemente für die Anfangssimplex

Die Spurenelementelösung orientierte sich an Hutner (1972), war jedoch mangan- und eisenfrei (Tab. 8).

Titriplex I	10.00 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	3.33 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 24 H ₂ O	9.25 mg
Metalllösung (s. Tab. 9)	50 ml
Anmerkung: ad 1 l H ₂ O dest., pH 6.6 mit NaOH eingestellt	

Tab. 8. Hutner-Spurenelemente-Lösung ohne Eisen und Mangan

Titriplex II	250 mg
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	1.095 mg
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	39.2 mg
Co(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	24.7 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ × 10 H ₂ O	17.7 mg
Anmerkung: ad 1 l H ₂ O dest., Zugabe von 6 N H ₂ SO ₄ , falls Niederschläge auftreten	

Tab. 9. Metalllösung ohne Eisen und Mangan

3.3 Apparativer Aufbau

3.3.1 Batch-Fermentationen

Für Batch-Fermentationen kam der Biostat E mit dem 10 l-Edelstahlgefäß zum Einsatz. Dieses Gefäß wurde nur halb mit einem Arbeitsvolumen von 5 l gefüllt, damit die vor allem gegen Ende des Wachstums schäumende Kultur nicht das Abluftsystem verstopfen konnte. Der Zusatz von Antischaummitteln wurde vermieden, um bei der Analyse der Kulturüberstände über HPLC-Anlagen die Säulen nicht zu beschädigen. Die Sterilisation erfolgte in situ, danach wurden alle übrigen, im Autoklaven für 30 min sterilisierten Zubehöerteile wie Zuluftfilter, Zusatzlösungen, steriles Wasser, Säure- und Laugeflaschen über Membransepten mit dem Fermenter verbunden und das Arbeitsvolumen eingestellt. Der Fermenter wurde mit 20 - 50 ml steril gewaschener Zellsuspension mit einer Spritze durch ein Deckelseptum angeimpft.

Der Biostat E war für die vorliegenden Untersuchungen mit Meßeinrichtungen für pH-Wert, Redoxpotential, Temperatur, Rührerdrehzahl, Gefäßinnendruck und mit Regeleinrichtungen für pH-Wert, Temperatur (über einen wasserumflossenen Doppelmantel des Gefäßes) und für die Drehzahl ausgestattet. Die pH-Messung und Redox-Messung erfolgte mit autoklavierbaren Einstab-Meßketten (Typ:465-35-90 K9, Ingold KG, Urdorf, CH). Sie wurden vor jeder Fermentation frisch mit Viscolyt gefüllt und geeicht. Die Elektroden waren während der Fermentation mit 200 mbar gegenüber dem Fermenterinnern drucküberlagert, um ein Eindringen von Nährlösung zu verhindern. Zur pH-Wert-Einstellung diente 3 N NaOH und 3 M H_3PO_4 . 6 N NaOH eignete sich nicht für die Titration, da sie an der Einlaßstelle auskristallisierte. Ein Platinfühler erfaßte die Temperatur. Stickstoff wurde über ein Rotameter (Krohne) und den Zuluft-Keramikfilter in den Fermenter geleitet. Ein 6-Farben-Punkteschreiber hielt alle Meßwerte fest.

3.3.2 Batch-Fermentationen mit Mikrofiltration

Der Aufbau des Fermentergefäßes entsprach dem in Kap 3.3.1. Hinzu kamen noch folgende Einrichtungen:

- Mikrofiltrationseinheit: Sartocon Mini, 0.2 m^2 , feed: 5 l/min (Sartorius, Göttingen)
- zwei Zelluloseacetat-Module parallel geschaltet, Porengöße 0.2 μm , Sartopure PP mini, (Sartorius, Göttingen)
- Vorfilter, Porengöße 50 μm zum Zurückhalten eventueller Feststoffe, Sartorius SM 332019P15TT112A
- Pumpe Ismatec Zahnradpumpe MX-2P-142

- Stahl-Sterilschnellkupplungen und Anstechnadel zum Verknüpfen des Fermenter-Probenahmeventils und des Fermenterdeckels mit der Mikrofiltrationseinheit

Das Probenahmeventil des Fermenters, das Filtrationsmodul und die Zubehörschläuche wurden 20 min mit heißem Dampf sterilisiert. Die Membran-Pumpe erlaubte keine Dampfsterilisation und wurde daher über Nacht mit 0.02 % Natriumazidlösung gefüllt und durch Sterilkupplungen in den Mikrofiltrationskreislauf eingefügt. Über einen Kurzschluß des Kreislaufes konnten Luftblasen und Azidlösung mit sterilem Wasser entfernt sowie zwischen Mikrofiltrationsschritten das System gespült werden.

3.3.3 Kontinuierliche Kultur

Zwei Rührkesselfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 1 l wurden als Chemostaten mit Overflow geführt. Die Glasfermentergefäße waren Bestandteile zweier Biostat M-Anlagen (Braun Diesseltech, Bad Melsungen), die mit Meß- und Regeleinrichtungen ausgestattet sind. Zur Meßwerterfassung, nicht jedoch zur Regelung, war zusätzlich ein MEAS-System (Meßdaten- Erfassungs- und Auswertesystem, KFA Jülich) mit einem Personalcomputer und zwischengeschaltetem Interface angeschlossen.

Das Fermentergefäß mit Korrekturmittelflaschen und Filtern, Vorratsflasche, Zubehörteilen der Zudosierung und Auffangflasche wurden im Autoklaven für mindestens eine Stunde und im Falle der Vorratsflasche für 1' 20'' sterilisiert. Die Einzelteile wurden durch Sterilschnellkupplungen aus Edelstahl (Braun Diesseltech, Bad Melsungen) verbunden.

Nachfolgend sind die Einzelteile der Apparatur weitergehend beschrieben:

Zudosierung

- 20 l Duranglas-Vorratsflasche mit 15 l Nährlösung und Zupumpmöglichkeiten für extra sterilisierte Lösungen, auf einem starken Rührer (Maxi M1, Janke und Kunkel, Staufen)
- Zudosiereinheit aus Schlauchpumpe, Waage, Regeleinheit (in die Pumpe integriert) mit externer Fülleinrichtung; Feststellen des momentanen Flusses über den Gewichtsverlust (g/l) einer Zwischenflasche auf einer Waage; Einstellen einer konstanten Flußrate; Auffüllen der Zwischenflasche bei Unterschreiten eines Sollfüllstandes aus der Vorratsflasche durch Ansprechen einer zweiten Schlauchpumpe (501 U, 100 upm); Einstellung des Environment Codes auf 3 für unstabile Standorte
- Schlauchverbindung zum Fermenter wahlweise verzweigbar mit 1.6 mm oder 3.2 mm Innendurchmesser für Flußraten unter- und oberhalb 250 g/h

- Thermofalle am Fermenterdeckel; alle zwei Wochen wegen Verstopfungsgefahr ausgetauscht, besonders bei niedrigen Verdünnungsraten unter 0.15 h^{-1} ; ohne Thermofalle Rückinfektionen zum Vorratsgefäß

Biostat M

Der Biostat M bestand aus:

- Kulturgefäß M_2 aus Borosilikatglas, mit Flachboden, mit thermostatisierbarem Doppelmantel, Scheibenrührer, maximales Arbeitsvolumen 1.5 l, nicht in situ sterilisierbar
- integriertem Rührarm
- integriertem Thermostatsystem, dem zusätzlich noch ein Kühlwasserkreislauf über ein Haake-Thermostat F3 (Haake GmbH, Karlsruhe) angeschlossen wurde; durch diesen Zusatz sollte ein direkter Kontakt zum Leitungswasser und damit eine Verkalkung vermieden und das Kühlwasseraufkommen herabgesetzt werden
- Thermofalle
- eingebautem Rotameter mit Konus für eine konstante Flußrate von $0.16 - 1.6 \text{ NI}/(\text{min} \times \text{l})$
- Meßsonden: Platinfühler für Temperaturmessung; pH-, Redox-Meßkette (Ingold, Urwalden, CH), alle drei Wochen wegen Elektrodendrift ausgetauscht und Meßeinschub neu geeicht
- integrierte Korrekturmittelpumpen; Laugezudosierung statt durch 4-fach-Stutzen in ein in die Bakterienkultur ragendes Rohr, da sonst bei starker Begasungsrate die Lauge direkt mit der Abluft ausgetragen wurde
- Säure-Lauge-Meßeinschub zur Summierung der Pumpenlaufzeiten und somit zum Messen des Korrekturmittelverbrauchs

Die Bestückung des Fermentersgefäßes erfolgte nur über den Deckel und ist im Anhang A schematisch dargestellt.

Begasungssystem

- zuführendes System: Stickstoff 99.8 % aus der Vorratsgasflasche zum Rotameter des Biostaten über zwei hintereinandergeschaltete, austauschbare hydrophobe Filter (Midisart, Porengröße $0.2 \mu\text{m}$, Sartorius, Göttingen) in den Fermenter, Sicherheitsregelung am Biostateneingang für maximalen Eingangsdruck von 1 bar
- abführendes System: Ableitung des Abgases in eine Schaumfalle: eine 10 l Glasflasche, in der die bei starkem Schäumen der Kultur ausgetragene Bakterienflüssigkeit aufgefangen wurde, um ein Zusetzen der Abgasfilter zu vermeiden

Abdosierung

- über ein nach unten bis zum Füllstand von einem Liter in die Kultur getauchtes Rohr
- Watson-Marlow-Pumpe (501 U, 10 upm), Abdosierate leicht größer als die Zuflußrate, um ein Vollaufen des Fermenters zu vermeiden
- Auffangbehälter: eine Glasflasche, sterilisiert, zum Vermeiden von Rückinfektionen von außen

Falls bei hohen Rührgeschwindigkeiten oder Begasungsraten der Füllstand im Fermenter unter 1 l fiel, wurde die Solflußrate an der Sartorius-Pumpe gemäß $D = f/V$ zu langsameren Förderraten hin korrigiert, um die gewünschte Verdünnungsrate zu gewährleisten.

Meßwerterfassung und Regelung

- über Meßsonden und Meß- und Regeleinschübe am Biostaten M

Messung on line: Temperatur, Rührerdrehzahl, pH-Wert, Säure-, Laugeverbrauch, Redoxpotential;

Messung offline: Enzymaktivitäten, Substrataufnahme, Produktbildung usw.

Regelung: Temperatur, Rührerdrehzahl, pH-Wert

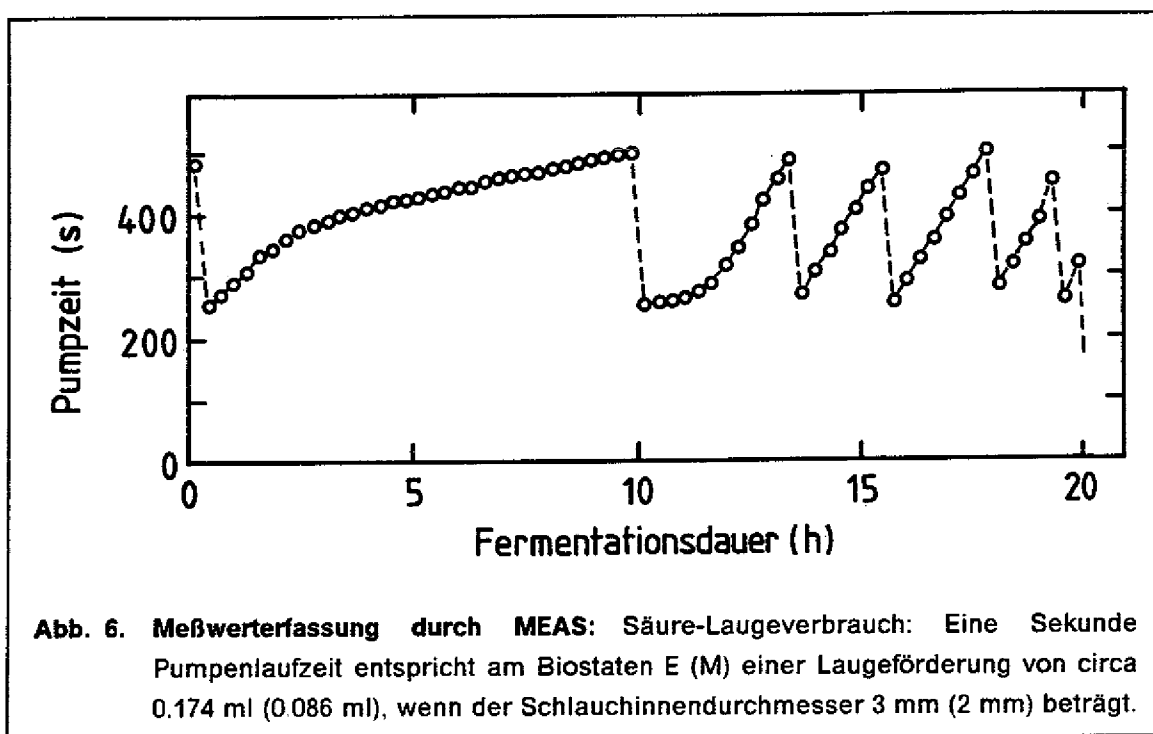
- über MEAS

- Personal-Computer IBM AT: 640 kB Arbeitsspeicher (RAM), Festplatte, Arithmetikprozessor, Herkules-Graphikkarte
- Siemens-Interface: Siemens SMP-System mit 19" Rahmen zur Signalumwandlung, mehrere Analogein- und -ausgänge, Relaisausgänge, vier serielle Schnittstellen; nur 6 Analogeingänge (0-10 V) waren belegt
- Buskopplung zwischen PC und Interface
- Epson-Drucker FX-85
- Software: Concurrent DOS (mit 4 Fenstern), Digital Research, MEAS Version 1.1, 1986, KFA Jülich

Das MEAS-System wurde zusätzlich als Meßwerterfassungssystem für den pH-Wert, das Redoxpotential und vor allem den Laugeverbrauch herangezogen. Die von den Meßsonden erfaßten Daten wurden nach Wandlung in einem Interface im Computer abgespeichert und konnten jederzeit graphisch dargestellt werden.

Besonders Änderungen im Laugeverbrauch als Zeichen geänderten Wachstumsverhaltens der Kultur und Änderungen im Redox-Wert als Zeichen geänderter Begasungsverhältnisse konnten über das MEAS-System deutlich, über den Punktschreiber jedoch nicht, erkannt werden. Abb. 6 zeigt einen Verlauf des Laugeverbrauches über 20 Stunden hin. Der Verbrauch wird als Erhöhung des Ausgangs-

signals am Biostaten angezeigt. Die Geraden kommen durch die Summation der Pumpenlaufzeiten über die Zeit zustande. An der oberen Grenze (500 s Laufzeit) wird das Signal zurückgesetzt. Die Umstellung auf ein Medium, in dem die Organismen besser wachsen ist am langsam steigenden Laugeverbrauch ab der 10. Stunde erkennbar.



Da bei den meisten Fermentationen ein volles Medium gefüttert und keine extremen pH-Werte eingestellt wurden, kam es vor allem zu Beginn der Arbeit häufig zu Infektionen mit Fremdkeimen, vor allem mit Bacillussporen. Durch Verwendung von Doppelfiltern, neuen Sterilschnellkupplungen (Braun Melsungen), Doppelsterilisationen, durch leichte Begasung während der Probenahme, häufigen O-Ring-Wechsel im Fermenterdeckel, Verwendung eines silikonhaltigen O-Ringfettes (Wacker Chemie, München) und vor allem durch Umzug der Apparatur in einen Raum ohne Bacillusfermentationen, konnte dieser Situation Abhilfe geschaffen werden. Hiernach war sogar eine 5-monatige Fermentation möglich. Wandbewuchs wurde durch kurzfristig hohe Rührgeschwindigkeiten bei ganz gefülltem Fermenter eingedämmt. Um abzusichern, daß sich die Organismen während der Fermentationszeit nicht verändert hatten, wurden Kontrollansätze im 1l Maßstab mit Standard-MRS-Medium nach deMan herangezogen. Die gemessene Enzymaktivität und Zellmasse blieb über die ganze Fermentationszeit beim gleichen Wert im Rahmen der Meßschwankungen.

Die Gesamtanlage (mit nur einem Gefäß) ist in Abb. 7 photographisch und in Abb. 8 schematisch dargestellt.

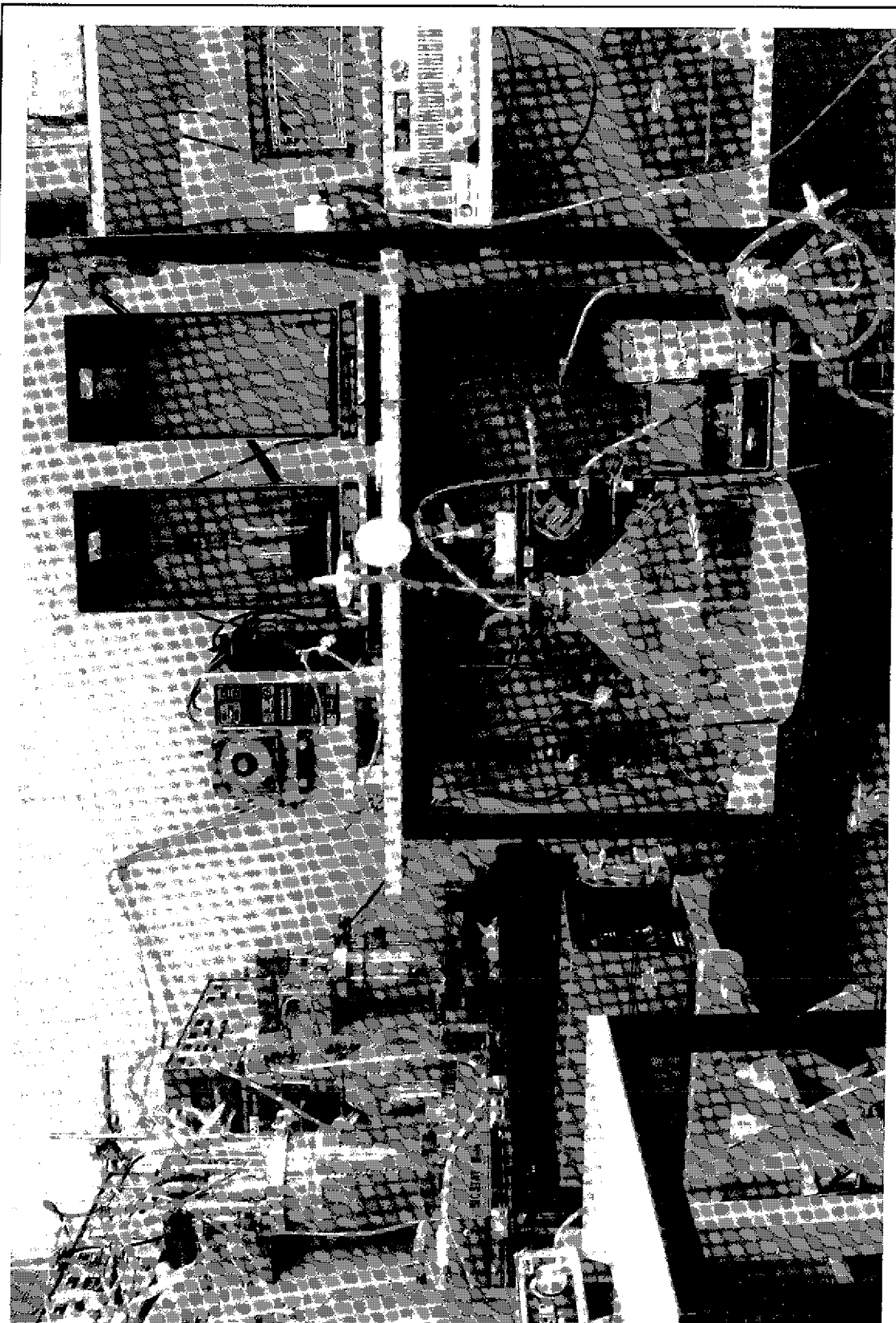


Abb. 7. Fotografische Ansicht der Biostat M Anlage: Chemostatisch betriebene kontinuierliche Kultur mit overflow

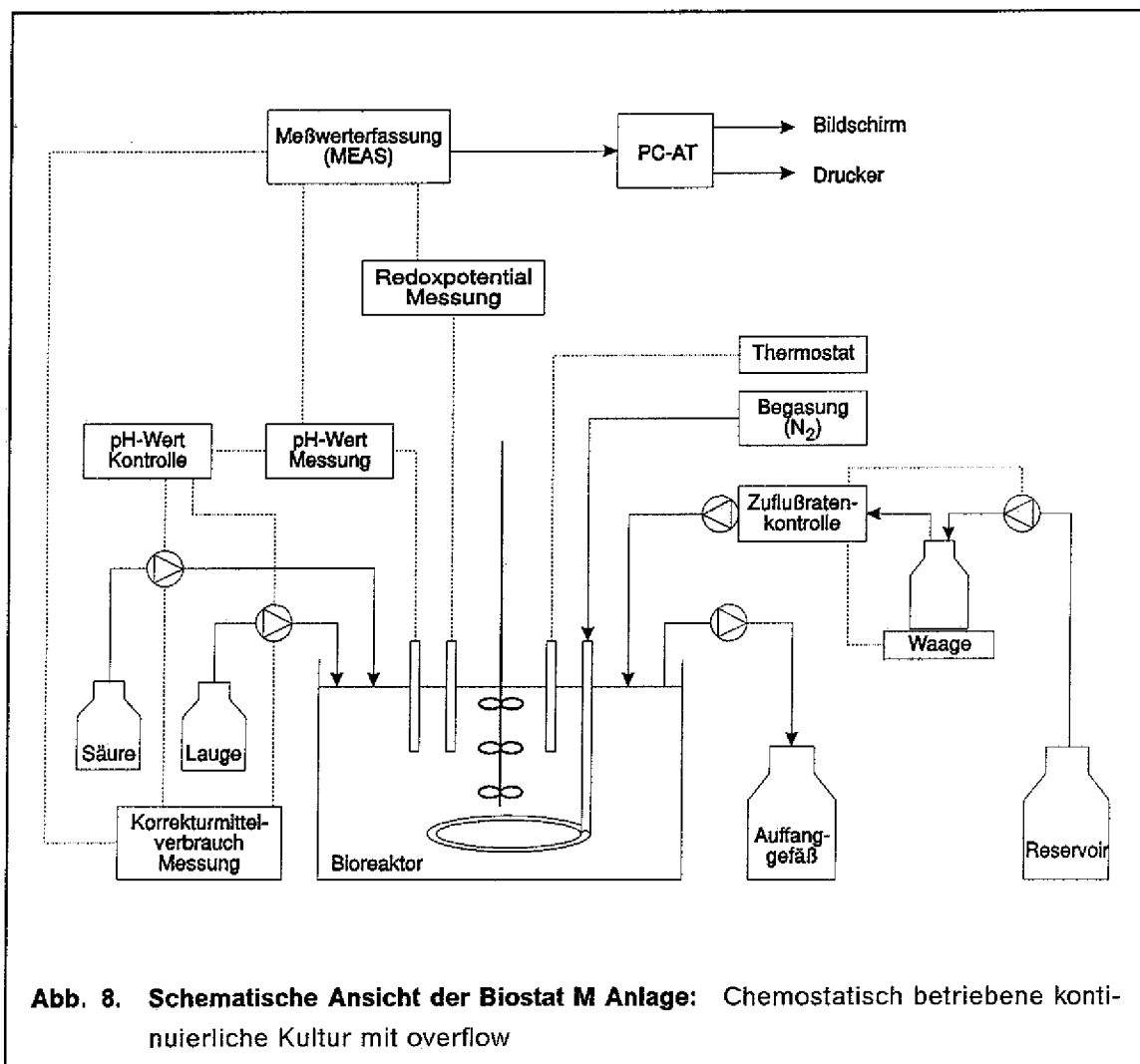


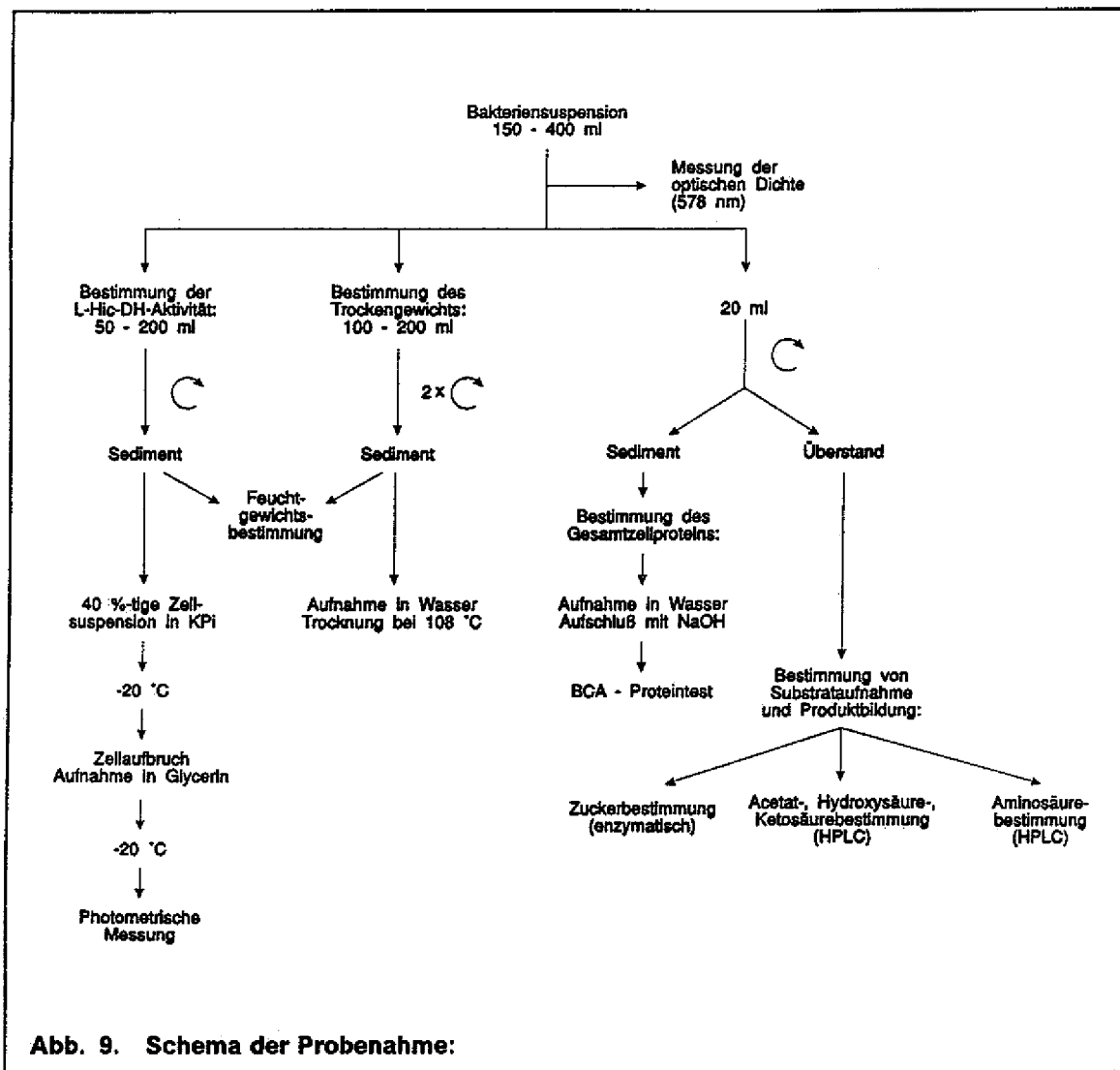
Abb. 8. Schematische Ansicht der Biostat M Anlage: Chemostatisch betriebene kontinuierliche Kultur mit overflow

3.4. Zellernte

Proben aus Batch- und kontinuierlichen Kulturen wurden gemäß der folgenden Darstellung verarbeitet (Abb. 9). Bei Batch-Kulturen fand die Probenahme alle 30 min statt. Bei kontinuierlichen Kulturen wurden frühestens fünf Verweilzeiten nach Umstellung auf neue Bedingungen Proben entnommen. Nach der Probenahme wurde der Fermenter mit dem gleichen Medium auf den Sollfüllstand gebracht, die Bakterien wuchsen zwei Stunden als Batch-Kultur und wurden dann auf die kontinuierliche Betriebsweise umgeschaltet.

3.5 Zellaufbruch

50 - 200 ml Bakteriensuspension wurden nach 15-minütiger Zentrifugation bei 8000 upm (5100 g) im GSA-Rotor der Sorvall-Zentrifuge (RCB-5B, Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg) in KPi-Puffer (pH 7) so aufgenommen, daß eine



40-prozentige Zellsuspension (wt/wt) entstand. Diese Suspension wurde bei -20°C eingefroren. Nach sechsminütigem Schütteln von $600\ \mu\text{l}$ aufgetauter Suspension mit $1.2\ \text{g}$ Glasperlen (Durchmesser $0.3\ \text{mm}$, Firma Claus, Nidderau) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ($1.4\ \text{ml}$ Volumen) in der Schwingmühle MM2 (Retsch, Haan, D) bei voller Schwingintensität waren die Zellen vollständig aufgebrochen.

Die Zellen wurden drei min im vorgekühlten Rotor der Biofuge A (Heräus Christ, Osterode) bei $11\ 000\ \text{upm}$ abzentrifugiert, $200\ \mu\text{l}$ des Überstandes abpipettiert und mit KPi (pH 7) 1:2 verdünnt. Von diesem 1:2 verdünnten Rohextrakt wurden Verdünnungen in hochrein filtriertem Wasser für die spätere Protein-Bestimmung bei -20°C eingefroren. Der Rest wurde über Nacht 1:2 mit 87 % Glycerin (p.A.) bei -20°C für den Enzymtest aufbewahrt. Als Rohextrakt (abgekürzt mit RE) wird im folgenden die insgesamt 1:4 verdünnte, in Glycerin befindliche, aufgebrochene Zellsuspension bezeichnet. Der Aufbruch orientierte sich im wesentlichen an der Methode nach Hummel und Kula (1989b).

3.6 Analysenmethoden

3.6.1 Bestimmung der L-Hic-DH-Aktivität

Die L-Hic-DH-Aktivität wurde aus dem Rohextrakt der Zellen anhand der Umsetzung von 2-Ketoisocaproat zu L-2-Hydroxyisocaproat, also der Reduktionsreaktion bestimmt. Die Stereospezifität des Enzyms war mit gereinigtem Enzym und Rohextrakt überprüft worden (Hummel et al., 1984). Der mit der Umsetzung der Ketosäure gekoppelte Verbrauch von NADH, der der Enzymaktivität proportional ist, wurde an einem Shimadzu UV 160 Spektrophotometer (Kyoto, Japan) mit Sipperausrüstung bei 340 nm, 30 °C und pH 8 verfolgt.

Der Testansatz enthielt 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer (KPi pH 8), 0.79 mM Ketoisocaproat, 0.235 mM NADH und limitierende Mengen Rohextrakt in einem Gesamtvolumen von 2.02 ml. Der Rohextrakt wurde während der Messung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der Testansatz wurde vor dem Starten der Reaktion durch den Rohextrakt eine Minute bei 30 °C vorgewärmt.

Die gemessenen Extinktionsabnahmen wurden um den nichtspezifischen NADH-Verbrauch in einem Blindansatz ohne das Substrat 2-Ketoisocaproat korrigiert. Dieser unspezifische NADH-Verbrauch wird als sogenannte Hintergrundaktivität bezeichnet. Kontrollansätze zeigten keinen Zerfall von NADH während der einminütigen Meßzeit. Die um die Hintergrundaktivität korrigierte Extinktionsabnahme sollte 0.05 Einheiten pro Minute betragen; andernfalls wurde der Rohextrakt verdünnt oder mehr Rohextrakt eingesetzt.

Ein Unit L-Hic-DH-Aktivität wird als die Enzymmenge bezeichnet, die ein μmol NADH pro Minute unter Testbedingungen umsetzt. Die spezifische Aktivität wird in Units pro mg Protein im Rohextrakt oder manchmal auch pro g Trockengewicht, die Volumenaktivität in Units pro l Kulturvolumen ausgedrückt. Zur Proteinbestimmung wurde die BCA-Methode herangezogen (Kap. 3.6.4).

Die Aktivitäten lassen sich nach den folgenden Formeln berechnen:

- Volumenaktivität des Rohextraktes:

$$\frac{(dE/\text{min}) \times V_T \times F_1}{V_E \times \epsilon_{\text{NADH}} \times d} \quad (\text{U/ml Rohextrakt}) \quad (3.8)$$

- spezifische Aktivität:

$$\frac{(dE/\text{min}) \times V_T \times F_1}{V_E \times \epsilon_{\text{NADH}} \times d \times P} \quad (\text{U/mg Protein im Rohextrakt}) \quad (3.9)$$

- Volumenaktivität der Kultur:

$$\frac{(dE/\text{min}) \times V_T \times F_1}{V_E \times \epsilon_{\text{NADH}} \times d \times F_2} \quad (\text{U/l Kultur}) \quad (3.11)$$

mit:

dE/min : Extinktionsänderung pro Minute

V_T : Gesamtvolumen einschließlich Rohextrakt, 2.02 ml

V_E : Rohextraktvolumen, 0.02 ml

ϵ_{NADH} : Extinktionskoeffizient von NADH, $6.22 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

d : Schichtdicke der Küvette, 1 cm

F_1 : Verdünnungsfaktor (alle Verdünnungsschritte beim Herstellen des Rohextraktes sowie beim Verdünnen des RE für die Messung)

P : Proteingehalt des Rohextraktes in mg/ml RE

F_2 : Konzentrierungsfaktor beim Herstellen der 40 %-tigen Zellsuspension

Mindestens fünf Parallelproben jeweils für Gesamt- und Hintergrundaktivität wurden gemessen. Die Abweichung der Meßwerte vom Mittelwert betrug $\pm(3-5) \%$, in manchen Fällen mit sehr hoher Hintergrundaktivität bis zu 10 %. Diese Hintergrundaktivität lag bei in Kolben gewachsenen Zellen im Rahmen von 80 - 90 % der Gesamtaktivität, bei in Fermenter angezogenen Zellen dagegen meist nur zwischen 30 % bis maximal 40 % der Gesamtaktivität.

Der Enzymtest richtete sich im wesentlichen nach dem optimierten Test von Schütte et al. (1984), zeigte aber wegen des Test-pH-Wertes von 8 statt 7 circa 15 % niedrigere Enzymaktivitäten an. Diese Verminderung der Aktivität stimmt mit der von Schütte angegebenen überein.

3.6.2 Bestimmung der Bakterienzellmasse

3.6.2.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde bei 578 nm im Shimadzu-Doppelstrahl-Spektrophotometer UV 150-02 (Kyoto, Japan) bestimmt. Die scheinbare Extinktion des Meßstrahles durch die Probe, im folgenden mit A_{578} angegeben, ist ein Maß für die Bakterienmasse. Bei einer A_{578} von mehr als 0.5 mußte die Probe in 0.9 % NaCl verdünnt werden, da dann die Beziehung zwischen der A_{578} und der Bakterienmasse nicht mehr linear war. Die Korrelation der A_{578} mit dem Trockengewicht über alle in kontinuierlicher Kultur gemessenen Werte befindet sich in Kap. 4.3.6.

3.6.2.2 Bestimmung des Trocken- und des Feuchtgewichts

100 - 200 ml Bakteriensuspension wurden nach Zentrifugation bei 8000 upm (5100 g) in der Sorvall-Kühlzentrifuge RC-5B zweimal in 50 ml entionisiertem Wasser gewaschen und in 11 ml hochrein filtriertem Wasser suspendiert (OD 45 - 50). Aliquots von 2 ml trockneten in vorgetrockneten Aluminiumschiffchen 17.5 h bei 108 °C. Nach dem Abkühlen im Eksikator bis zur Gewichtskonstanz enthielten die Schiffchen 15 - 30 mg Trockenmasse. Die Abweichung vom Mittelwert von fünf Parallelen betrug $\pm 0.5 \%$. Das Feuchtgewicht der Kultur pro l ergab sich aus dem Gewicht des abzentrifugierten Sediments pro entnommenem Volumen.

3.6.2.3 Bestimmung des Gesamtzellproteins

18 ml Bakterienkultur wurden 15 min bei 10 000 upm (6700 g) im SS 34 Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde zu einer A_{578} von 6 resuspendiert und bei -20 °C bis zur Proteinbestimmung aufbewahrt. 0.5 ml dieser Zellsuspension wurde mit 0.5 ml 1 M NaOH in einem Schraubdeckelreagenzglas 5 min bei 100 °C gekocht und dann schnell in Eis heruntergekühlt. Die Neutralisation erfolgte mit 0.5 ml 1 M HCl. Im Proteintest mit BCA (siehe Kap. 3.6.4; nach Smith et al., 1985) wurde der Proteingehalt ermittelt. Proben für eine Eichkurve mit dreifach konzentrierten Eichlösungen wurden in gleicher Weise gekocht und neutralisiert.

3.6.3 Bestimmung von Produkt und Substrat im Zellüberstand

3.6.3.1 Bestimmung organischer Säuren

Acetat, Lactat, Ketoleucin, Ketovalin und in manchen Fällen auch Citrat und 2-Hydroxyisocaproat aus Kulturüberständen wurden mit Hilfe der Ionenausschlußchromatographie über eine ORH-801-Säule zur Trennung organischer Säuren (ICI, Frankfurt, D) an einer HPLC-Anlage der Firma Gynkothek (Germering bei München) bestimmt. Die Anlage bestand aus einem Gradientenformer (250 B) mit Hochpräzisionspumpe (300 C), Säule, einer Shimadzu-Recheneinheit (Chromatopac C-R3A), einem Thomachrom R-Motorventil H (Reichert), einem UV-Detektor (Gynkotec), einem Injektionsautomaten Gina 160 (Vers. 2.03), Gynkotec, mit Probenraumkühlung und einer 20 μ l Probenschleife.

Die Trennbedingungen sind nachfolgend angegeben:

Säulenbeheizung 40 °C, $\lambda = 214$ nm, attenuation = 1, window = 3, Laufmittel: hochrein filtrierte 0.002 N H₂SO₄, isokratische Arbeitsweise. Die Ausarbeitung der Trennung ist in Kap. 4.1.3 angegeben. Die Linearitätsbereiche lagen je nach Substanz zwischen 0.5 - 5 mM (Tabelle im Ergebnisteil).

Falls nur der Lactat- und der Acetat-Gehalt gemessen wurden, betrug die Flußgeschwindigkeit 0.6 ml/min, sonst 0.2 ml/min. Die Auftrenndauer variierte je nach Fluß-

geschwindigkeit zwischen 20 und 70 min. Nach 10 Fermenterproben wurden 2 Standards vermessen.

Alle Proben und Standards wurden in hochrein filtriertem Wasser (Anlage Millipore, Bad Homburg) verdünnt. Fermenterproben mußten unbedingt zweimal nach der Probenahme und nach dem Verdünnen filtriert werden (Minisart, 0.2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen), da sie sonst bewuchsen. Wegen der unterschiedlichen Substanzkonzentrationen in den Fermenterproben mußten diese zur Ketovalin- und Ketoleucin-Bestimmung 1:10 und zur Lactat- und Acetat-Bestimmung 1:50 - 1:200 verdünnt werden. Eine gleichzeitige Bestimmung dieser Substanzen war nur bedingt möglich.

Eichlösungen: 0.125 (0.5) mM Ketovalin, 0.5 (2.0) mM Citronensäure, 0.125 (0.5) mM Ketoleucin, 0.5 (2.0) mM Lactat, 0.5 (2.0) mM Acetat und 0.5 (2.0) mM L-2-Hydroxyisocaproat. Die Standards hielten sich mindestens ein bis zwei Tage bei Raumtemperatur (+22°C) oder 4 Tage bei 4 °C. Bei längerer Lagerung mußten sie eingefroren werden und konnten dann nur einmal aufgetaut werden.

3.6.3.2 Aminosäure-Bestimmung

Der Gehalt an Aminosäuren in Kulturüberständen und Kulturmedien wurde mit einem Aminosäureanalysator LC 5001 (Biotronik, Maintal) ermittelt. Ein Integrator des Typs C-R2HX (Shimadzu) war mit angeschlossen. Die Aminosäuren werden vor allem wegen ihrer unterschiedlichen pI-Werte an einem Kationenaustauscher getrennt und mit Ninhydrin zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Dieser wird bei 570 nm photometrisch gemessen. Prolin läßt sich bei 470 nm bestimmen. Die Coil-Temperatur betrug 125 °C.

Die Probemenge (50 µl) sollte zwischen 4 und 20 nmol der jeweiligen Aminosäuren enthalten. Daher wurden alle Proben in Citratpuffer (pH 2.2) verdünnt und mit HV-Filtern (Porengröße 0.4 µm, Millipore, Eschborn) filtriert. Der Citratpuffer setzte sich aus Natriumcitrat (9.8 g/l) und Citronensäure (14 g/l) und 5 % Thiodiethanol zusammen.

Die Auswertung erfolgte über die Umrechnung der für 50 µl Probe ausgegebenen Area-Werte mit Hilfe der Area-Werte für Standard-Aminosäuregemische, die nach circa allen 10 Proben analysiert wurden.

3.5.3.3 Ethanol-Bestimmung

Ethanol und auch Acetat ließen sich gaschromatographisch unter Verwendung von Methanol als internem Standard messen. Der Linearitätsbereich lag für Ethanol zwischen 0.4 und 100 mM und für Acetat zwischen 0.15 und 50 mM. Der Gaschromatograph (GC-Terminal Typ 5480 A mit angeschlossenem Integrator;

Hewlett Packard, USA) war mit Flammenionisationsdetektor (FID), automatischem Probengeber ausgestattet.

Die Analysebedingungen waren:

Säule:	Porapak QS, 80 - 100 mesh (Waters Associates Inc., Milford USA)
Trärgas:	Stickstoff 99.999 %
Trärgasstrom:	30 ml/min
Probevolumen:	1 μ l
Einspritzblocktemperatur:	250 °C
FID-Temperatur:	230 °C
Säulentemperatur:	155 °C

Retentionszeiten: Ethanol 0.92 min, Acetat 3.35 min

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet:

500 μ l interner Standard A und 500 μ l Probe oder Acetat-, Ethanol-Eichlösung (mit Konzentrationen < 50 mM) werden vermischt.

Die Eichlösungen setzten sich zusammen aus:

A: Methanol (1.2 g/l) in 0.2 N HCl

B: Ethanol (7 g/l)

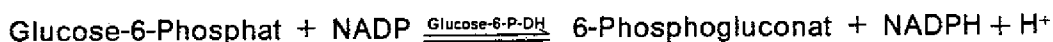
C: Natriumacetat, wasserfrei (12 g/l), von denen je 1 ml B und C mit 8 ml Wasser vermischt wurden. Hiernach lag ein Eichgemisch mit 50 mM Methanol, 17.5 mM Ethanol und 20 mM Natriumacetat vor.

Acetat-Werte wurden meist HPLC-Analysen entnommen.

3.6.3.4 Zuckerbestimmung

Der D-Glucose-Gehalt in Kulturüberständen und Nährlösungen wurde enzymatisch mit einem Testkit (UV 716-251) der Firma Boehringer (Mannheim) bestimmt.

D-Glucose wird unter der Wirkung von Hexokinase mit Mg^{2+} und ATP zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt. Dieses reagiert mit NADP unter Katalyse der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Glc-6-P-DH) zu 6-Phosphogluconat und $NADPH + H^+$. Die produzierte $NADPH + H^+$ -Menge ist der vorliegenden Glucose-Menge proportional:



Der Testansatz bestand aus 0.5 ml NAD^+ /ATP-Lösung 0.95 ml hochrein filtriertem Wasser, 0.05 ml Probe und 0.01 ml eines Gemisches aus Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zum Starten der Reaktion.

Die Messungen wurden im Shimadzu UV-160 Photometer mit cell positioner CPS-240 A bei 25 °C durchgeführt. Eine Referenzprobe enthielt 0.05 ml Wasser statt Probe. Kontrollen mit mitgelieferter Standardlösung (Glucose 0.5 g/l) wurden bei jeder Messung mitanalysiert.

Der Endpunkt war nach circa 10 min erreicht. Die Extinktion bei 340 nm wurde um die Anfangsextinktion vor Zugabe von Enzym korrigiert. Proben wurden so verdünnt, daß die Probekonzentration unter 0.5 g/l lag.

Die Glucose-Konzentration errechnete sich folgendermaßen:

$$c = \frac{dE/\text{min} \times V_T \times F \times M_r}{V_E \times \epsilon_{\text{NADPH}} \times d \times 1000} \quad (\text{g/l}) \quad (3.11)$$

dE/min	Extinktionsänderung pro min
c :	Konzentration der Glucose (oder Glucose-Monohydrat in der Probe)
ϵ :	Extinktionskoeffizient von NADPH, $6.3 \text{ l} \times \text{cm}^{-3} \times \text{mol}^{-1}$
d :	Schichtdicke der Küvette, 1 cm
V_E :	Probevolumen, 0.05 ml
V_T :	Gesamtvolumen, 1.15 ml
F :	Verdünnungsfaktor der Probe
M_r :	Molekulargewicht von Glucose (180.16) oder -Monohydrat (198.16)

Für eine schnelle Abschätzung des Glucose-Gehaltes wurden Glucose-Harnteststreifen der Firma Boehringer (Diabur-Test 5000) verwendet. Glucose wird unter Wirkung der Glucoseoxidase mit Sauerstoff und Wasser zu Gluconat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Wasserstoffperoxid ändert die Farbe des Indikatorstoffes auf den Teststäbchen. Durch Vergleich mit einer Farbskala ist der ungefähre Glucose-Gehalt der Probe ersichtlich.

3.6.4 Proteinbestimmung

Die Proteingehalte der Rohextrakte (Kap. 3.5) und das Gesamtzellprotein (3.6.2.3) wurden nach der Methode von Smith et al. (1985) bestimmt.

Bicinchoninic acid (BCA) reagiert mit Cu^{1+} -Ionen in alkalischer Lösung zu einem blauen Komplex, der bei 595 nm photometrisch nachgewiesen wird. Die Cu^{1+} -Ionen bilden sich bei der Biuret-Reaktion von Protein mit Cu^{2+} in alkalischer Umgebung.

Das BCA-Reagenz (Pierce, Illinois, USA) entsteht durch Mischen eines Teiles der Lösung A mit 50 Teilen der Lösung B.

Lösung A: 4 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Lösung B: 1 % Bicinchoninic-Na-Salz

2 % Na_2CO_3

0.16 % Natriumtartrat

0.4 % NaOH

0.95 % NaHCO_3

Einstellen mit 50 % NaOH und festem NaHCO_3 auf pH 11.25

In Mikrotiterplatten wurden pro Vertiefung 10 μl Probe oder Eichlösung (Rinderserumalbumin, Merck, Darmstadt) und 200 μl des Arbeitsreagenzes pipettiert, 10 s geschüttelt und 30 min bei 37 °C im Titertek-Twinreader Plus (Flow Laboratories, Meckenheim) inkubiert. Die Ausgabe der Absorptionswerte erfolgte korrigiert gegen einen Blindwert mit Wasser. Die Linearität der Beziehung zwischen A_{595} und Proteinkonzentration ist nur bis circa 350 μg Protein/ml Probe linear. Daher wurden die Absorptionswerte der Standards bei jeder Proteinbestimmung mittels einer Regression 2. Ordnung von 0 - 1000 μg Protein/ml ausgewertet (Microsoft Chart 2.0). Mit den ermittelten Koeffizienten " a_0 ", " a_1 ", " a_2 " aus der Regression konnten die Proteinkonzentrationen der Proben über ein hierfür selbstgeschriebenes BASIC-Programm errechnet werden.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die L-Hic-DH-Volumenaktivität pro Kulturvolumen zu steigern. Eine solche Steigerung kann zum einen erreicht werden, wenn die *Zellmasse* pro Volumeneinheit unter Erhalt der biomassespezifischen Enzymaktivität vergrößert wird. Dieser Effekt drückt sich in einer Erhöhung der Aktivität pro Kulturvolumen aus. Andererseits kann die Aktivität pro *Zelle* bei gleichbleibender Zellmasse gesteigert werden. Dieser Effekt ist an einer erhöhten spezifischen Aktivität, also der Aktivität pro mg Protein im Rohextrakt der aufgebrochenen Zellen oder der Aktivität pro g Trockenmasse, erkennbar. Beide Effekte können sich überlagern.

Eine Erhöhung der spezifischen Aktivität bringt den Vorteil mit sich, weniger Fremdprotein vom eigentlichen Enzymprotein "wegreinigen" zu müssen. Die Suche nach einer aktivierenden Substanz, um mit dieser die spezifische Aktivität gezielt zu erhöhen, kann sich jedoch als eine Suche nach der Nadel im Heuhaufen gestalten.

Generell ist, selbst wenn bereits eine solche Substanz gefunden ist, die Erhöhung der Zellmasse pro Kulturvolumen im Sinne einer vollständigen Kulturmedienausnutzung interessant. Gerade bei Einsatz des für Milchsäurebakterien benötigten teuren, komplexen Nährmediums ist es wünschenswert, viele aktive Zellen pro Kulturvolumen heranzuziehen. Eine niedrige Zelldichte würde mit einem unvollständigen Substratverbrauch einhergehen.

In diesem Sinne wurden zunächst eine Reihe eventuell aktivierender Substanzen oder Repressoren hinsichtlich ihres Effektes auf die L-Hic-DH-Aktivität und das Wachstum untersucht. Dabei konnten Effekte auf das Wachstum wegen der Möglichkeit zu vielen Parallelansätzen vorab in Kolbenversuchen betrachtet werden. Der Einfluß auf die Enzymaktivität war unter anderem wegen eines hohen erforderlichen Probevolumens und aus anderen Gründen (Kap. 4.2.1.4) nicht durch Kolbenversuche ermittelbar und mußte daher zu einem späteren Zeitpunkt in Versuchen mit größeren Volumina in Fermentern durchgeführt werden.

Weiterhin versucht die vorliegende Arbeit, Ursachen für die Begrenzung des Wachstums zu finden. Hierbei interessieren Fragen nach Medienlimitierungen, nach dem Vorhandensein von Produktinhibitionen oder sonstigen Repressionen und nach günstigeren Kulturbedingungen als den in der Literatur angegebenen (Schütte et al., 1984). Da jedoch nicht bekannt ist, ob die L-Hic-DH wachstumsgekoppelt auftritt oder induziert wird, wurde kontrolliert, ob eine Wachstumsverbesserung auch mit einer Erhöhung der Enzymaktivität einhergeht.

Nach Anpassung der Methoden an die Versuchsbedingungen (Kap. 4.1) sollen die in Kap. 4.2 beschriebenen Experimente Aussagen über Einflußparameter auf die Enzymaktivität ergeben. Für das Lactobacillen-Standardmedium wird eine Optimierung des Wachstums nach einem mathematischen Modell beschrieben. An den Er-

gebnissen aus Kap. 4.2 orientiert sich die Parameterwahl für die eigentliche Optimierung der L-Hic-DH-Volumenaktivität durch Suche nach geeigneten Fermentationsbedingungen und Nährmediumszusammensetzungen mit Hilfe einer simultanen Faktorenvaryation in Kap. 4.3. Bei den in Kap. 4.4 dargestellten Experimenten kommen Versuchsergebnisse beider vorausgegangener Kapitel in der Kosten-Reduzierung der Kulturmedien und der Dauerproduktion des Enzyms zur Anwendung.

Alle Optimierungen werden in vollen oder sehr verdünnten Komplexmedien durchgeführt. Ein mineralisches Nährmedium für Milchsäurebakterien ist zwar von Ledesma et al. (1977) veröffentlicht worden. Wegen der zeitaufwendigen Herstellung und seiner Vielzahl an Komponenten ist dieses Medium jedoch wenig geeignet. Auch sollte die Optimierung in der Praxis verwendete Mediumsbestandteile wie Hefeextrakt und andere komplexe Extrakte miteinbeziehen, um zu einem für die Enzymproduktion einsetzbaren Medium zu führen.

Außer über die Optische Dichte bei 578 nm wurde das Wachstum über das Trocken-, Feuchtgewicht, das Gesamt-Zellprotein (als Kontrolle für den Proteingehalt der mit Glasperlen aufgebrochenen Zellen und für die Zellmasse-Bestimmung über das Trockengewicht) und über den Laugeverbrauch verfolgt.

Verschiedene Kulturverfahren kamen zur Anwendung: Batch-, Fed batch-, Repeated Batch- und kontinuierliche Verfahren. Als Betriebsweise für kontinuierliche Kulturen wurde die chemostatische gewählt. Die turbidostatische Betriebsweise, die über die optischen Dichte reguliert wird, kam wegen der starken Größenveränderung der Zellen je nach Kulturbedingungen nicht in Frage. Bei hohen Temperaturen oder sonstigen Streßbedingungen werden die Zellen bis zu 1/3 kleiner, ändern ihre Zellform von dick, oval und länglich zu rund, mit Tendenz zur Kettenbildung. Über Zellformänderungen berichten auch Holzapfel und Kandler (1969). Auch neigen die Zellen zur Schleimbildung, was zu einer Schicht auf der Küvettenwand führt. Ein somit nötiges häufiges Wechseln der Küvette hätte die ohnehin schon großen Sterilitätsprobleme noch erhöht.

4.1 Optimierung der Methoden

4.1.1 Haltbarkeit von Zellmaterial und Rohextrakten

Bei - 20 °C eingefrorene 40 %-tige (wt/wt) Zellsuspensionen verlieren ab drei Monaten Lagerzeit an L-Hic-DH-Aktivität; nach ungefähr einem Jahr weisen sie nur noch 20 - 30 % ihrer Anfangsaktivität auf. Da in den meisten Fällen besonders bei halbstündlicher Probenahme in Batch-Kulturen die Messung der Enzymaktivität nicht am

Tag der Probenahme möglich war, mußte die Lagerstabilität des mit Glycerin versetzten Rohextraktes getestet werden.

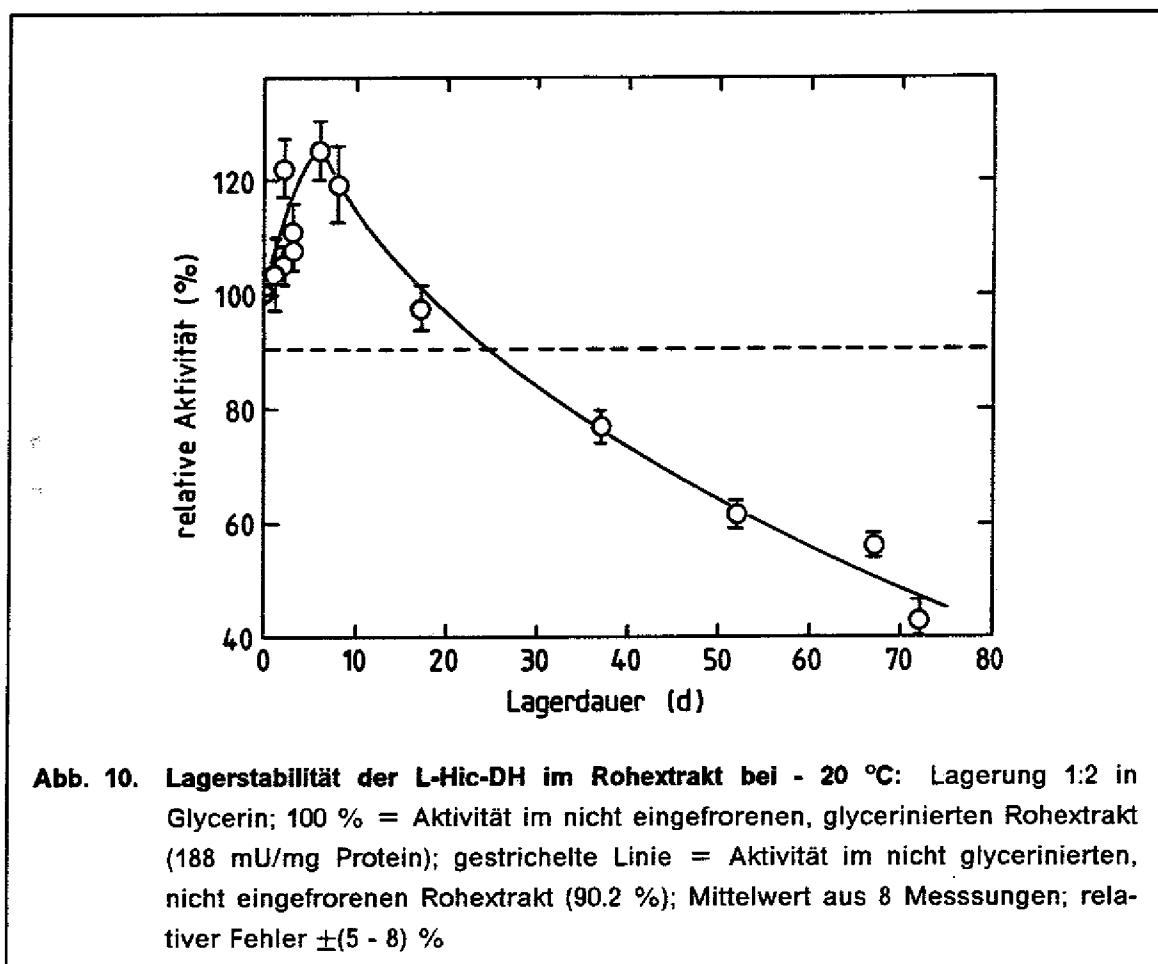


Abb. 10 zeigt die Abhängigkeit der L-Hic-DH-Aktivität (U/mg Protein im RE) von der Lagerdauer bei - 20 °C nach 1:2 Versetzen mit 87 % Glycerin (p.A.). Die Aktivität steigt bis zum 6. Tag der Lagerung gegenüber der Aktivität des uneingefrorenen, glycerinierten Rohextraktes vom ersten Tag (100 %) an. Dieser Anstieg wurde auch bei Wiederholung des Lagertests verzeichnet und ist der Wirkung des Glycerins zuzuschreiben (Gekko und Timasheff, 1981). Bei bis zu 14 Tagen Lagerung tritt kein nennenswerter Verlust der Aktivität auf (nur 3 %); nach 4 Wochen sind 18 % und nach 8 Wochen 40 % der Ausgangsaktivität verloren.

Um einen der Anfangsaktivität entsprechenden NADH-Umsatz messen zu können, andererseits aber auch den Probenahmetag vom Meßtag zu trennen, wurden künftig alle Proben nach einem Tag Einfrierzeit vermessen. Nach einem Tag betrug der Aktivitätsanstieg nur 3.5 %.

4.1.2 Einflüsse auf die Proteinbestimmung

Smith et al. (1985) berichten über einen Störeffekt von basischen oder sauren pH-Werten oder großem Salzgehalt im Probenmaterial auf die Proteinbestimmung mit Bicinchoninic acid (BCA). Im Hinblick auf stark basische Proben aus dem alkalischen Aufschluß von Zellen (Kap. 3.6.2.3) wurde daher der Einfluß von 0.5 M NaOH auf den BCA-Test untersucht. Desweiteren wurde der Effekt von 0.1 M NaCl, 0.5 M HCl, 0.1 M KPi-Puffer, in dem sich das Material aus Zellaufbrüchen befand, und der Effekt von Glycerin, in dem sich eingefrorene Rohextrakte befanden, betrachtet. NaCl und Kaliumphosphatpuffer beeinflussten den Test nicht, Glycerin dagegen erhöhte die Extinktionen über 35 %. Proben aus dem alkalischen Zellaufschluß waren erst nach Neutralisation mit einer äquimolaren Menge HCl in die BCA-Proteinbestimmung einsetzbar. Ohne diese Neutralisation ist der für die Bildung des Farbstoffkomplexes aus Cu^+ und BCA erforderliche pH-Wert von 11.25 (Smith et al., 1985) nicht gewährleistet. Da Glycerin die Proteinbestimmung stark, KPi dagegen nicht stört, wurden Verdünnungen aus dem Rohextrakt für den BCA-Test vor Versetzen mit Glycerin hergestellt und eingefroren.

4.1.3 HPLC-Trennung von organischen Säuren

a) Trennung von Standards

Ketoalin, Ketoleucin, Lactat, Acetat, 2-Hydroxyisocaproat, Ascorbinsäure und Monocitronensäure wurden erst einzeln und dann im Gemisch über eine ORH 801-Säule von ICI gegeben. Durch Herabsetzen der Flußgeschwindigkeit von 0.8 auf 0.2 ml/min, Erhöhen der Säulentemperatur von 37 ° auf 40 °C und Herabsetzen der Laufmittelkonzentration von 0.02 N auf 0.002 N H₂SO₄ ließen sich auch die schwer trennbaren Substanzen Ketoalin, Citrat und Ketoleucin vom Kationenpeak (Durchlauf) trennen, sowie die Trennung untereinander verbessern. Jedoch liegt der Fehler bei der Konzentrationsberechnung bei diesen drei Substanzen bei 10 %. Sie lassen sich auch durch einen Gradienten in diesem Bereich nicht besser auflösen. Tab. 10 zeigt die Retentionszeiten der Keto- und Hydroxysäuren bei verschiedenen Flußgeschwindigkeiten:

	Fluß (ml/min)			
	0.8	0.6	0.4	0.2
Substanzen	Retentionszeiten (min)			
Na ⁺ -Ketoalin		5.2	7.6	10.1
Monocitrat		5.9	8.2	16.3
Na ⁺ -Ketoleucin		5.9	8.8	17.7
Ascorbat		-	-	19.8
Na ⁺ -Lactat	7.6	10	14.1	27.5
Na ⁺ -Acetat	8.9	12.4	17.5	33.2
Na ⁺ -Hydroxyisocaproat		17.7	25.3	49.4
Gesamtzeit		21	31	68

Tab. 10. HPLC-Trennung organischer Säuren (Retentionszeiten): Retentionszeiten von Keto- und Hydroxysäuren bei verschiedenen Laufmittelflüssen (Trennung über ORH 801 - Säule, 40 °C, λ = 214 nm, attenuation = 1, window = 3, Laufmittel = 0.002 N H₂SO₄)

Ketoalin, Citrat und Ketoleucin lassen sich hiernach nur bei einem Fluß von 0.2 ml/min ausreichend trennen. Ascorbat wurde nur bei 0.2 ml/min in das Standardgemisch gegeben und ist nicht exakt analysierbar, da immer ein zweiter Schmierpeak mitauftritt. Bei 0.8 ml/min wurden nur Lactat und Acetat betrachtet. Bei diesen beiden Säuren steigen die Retentionszeiten mit abnehmender Flußrate stark. Sollen nur diese beiden aufgetrennt werden, kann die Flußgeschwindigkeit von 0.2 auf 0.6 ml/min heraufgesetzt und damit die Trenndauer von über einer Stunde auf 20 - 30 min herabgesetzt werden. Beim Umschalten auf andere Flußgeschwindigkeiten wurde eine neue Eichkurve aufgenommen, da die Beziehung zwischen Flächenwerten und Flußrate nicht linear ist. Die Nachweisgrenzen für die aufgetrennten Proben sind in Tab. 11 dargestellt.

Substanzen	Nachweisgrenzen (mM)
Na ⁺ -Ketovalin	0.1 ... 4
Monocitrat	0.1 ... 3
Na ⁺ -Ketoleucin	0.1 ... 4
Ascorbat	0.75 ... 4
Na ⁺ -Lactat	0.5 ... 3
Na ⁺ -Acetat	0.5 ... 4
Na ⁺ -Hydroxyisocaproat	0.5 ... 5

Tab. 11. HPLC-Trennung organischer Säuren (Nachweisgrenzen): Auftrennung von Keto- und Hydroxysäuren bei einer Flußgeschwindigkeit von 0.2 ml/min (Trennung über ORH 801 - Säule, 40 °C, λ =214 nm, attenuation=1, window=3, Laufmittel=0.002 N H₂SO₄).

b) Trennung von Fermenterproben

Werden Fermenterproben aufgetrennt, überlagern sehr große Kationenpeaks leider oft die nachfolgenden ersten drei Substanzen; diese können daher meist nur bei höheren Konzentrationen (>1 mM) erkannt werden. Die Retentionszeiten verlängern sich bei Fermenterproben um 1 - 2 min. Besonders bei Fermenterproben, aber auch bei Standards, sollten nach der eigentlichen Probe 1 - 2 schwefelsäure-haltige "Spülproben" wegen des Ghost-Effektes vermutlich aufgrund von Proberesten in der Probeschleife aufgegeben werden. Nach jeweils 10 - 15 Fermenterproben wird eine Nacheichung nötig.

Ascorbat, Citrat und Hydroxyisocaproat werden in Fermenterproben häufig von anderen, unbekannten Substanzen überdeckt. Auch bei Parallelproben mit internem Standard waren die meisten Fermenterproben hinsichtlich dieser Substanzen zumindest nicht quantitativ auswertbar. Nur Ketovalin, Ketoleucin, Lactat und Acetat wurden daher quantitativ ausgewertet.

Entgegen der Beobachtung von Schellenberger und Selke (1959) und Büchs (1988), nach der Ketosäuren mit der Zeit durch Einwirken von Manganionen zerfallen, zeigte die Kontrolle bei Kulturreservoir-Proben maximal einen Verlust von 15 % der zuvor eingewogenen Ketoleucinmenge. Diese Überprüfung wurde 3 - 6 Tage nach Medienherstellung durchgeführt. Vermutlich war das Mangan durch das im Kulturmedium ebenfalls enthaltene Citrat komplexiert und die Ketosäure so vor dem Zersetzen geschützt (Büchs, 1988).

4.2 Optimieren durch sukzessive Faktorenvariation und nach einem mathematischen Modell

Einzelne Parameter wurden unter Konstanthaltung aller übrigen variiert. Eine Fortsetzung der Optimierung der Enzymaktivität im Optimum bezüglich eines zuvor verbesserten Parameters verspricht jedoch nicht unbedingt eine weitere Produktionssteigerung (Mathieu et al., 1977; Kap. 2.5). Daher beschränkt sich dieser Teil der Arbeit weitgehend auf das Erkennen möglicher Einflußfaktoren auf die Volumenaktivität und überläßt die weiterführende Optimierung der simultanen Parametervariation in Kap. 4.3.

In einem MRS-Medium war die zu verbessernde niedrige Volumenaktivität von 200 U/l Kultur aufgetreten. Daher soll das Wachstumsverhalten und die Enzymproduktion im Lactobacillen-Standardmedium (MRS nach deMan) genauer betrachtet werden.

Folgende Aspekte sind dabei von Interesse:

- Vorhandensein des Enzyms in allen Wachstumsphasen?
- Verhalten der spezifischen Aktivität (Auskunft über Regulation)
- Vergleich verschiedener Wachstumsparameter
- Aufnahmespektren (Aminosäuren, Zucker) als Hinweis auf eventuell limitierende Nährmediumskomponenten
- Enzymproduktion im Batch-Verfahren im Standardmedium
- Übertragung der Batch-Produktion in die kontinuierliche Enzymproduktion im Standardmedium, Wachstumskinetik

Als Ausgangsbedingungen für die Batch-Kultur waren wie für die meisten Lactobacillen eine Temperatur von 30 °C und ein pH-Wert von 6.5 empfohlen worden (Schütte et al., 1984; DSM-Katalog).

4.2.1 Variation des Kulturmediums

4.2.1.1 Aminosäure-Aufnahmespektrum im Laufe des Wachstums

Da für die L-Hic-DH ein Zusammenhang mit dem Aminosäurestoffwechsel vermutet wird (Kula, 1986), wurde zunächst überprüft, ob Lactobacillus confusus im MRS-Medium nach deMan hinreichend mit Aminosäuren versorgt ist. Die Aufnahme der freien Aminosäuren aus dem Kulturüberstand wurde im Laufe des Wachstums bei pH 6.5, 30 °C, 0.2 NI N₂/(min × l) und 18.2 g Glucose/l beobachtet. Abb. 11a zeigt die Aufnahme bzw. die Bildung freier Aminosäuren im Kulturüberstand, bezogen auf die zum Zeitpunkt des Beimpfens vorhandenen Aminosäuren (100 %). Wiedergegeben sind die Werte der zum Zeitpunkt der höchsten Volumenaktivität am stärksten veränderten Aminosäuren. Rest-Glucose lag zu diesem Zeitpunkt keine mehr vor.

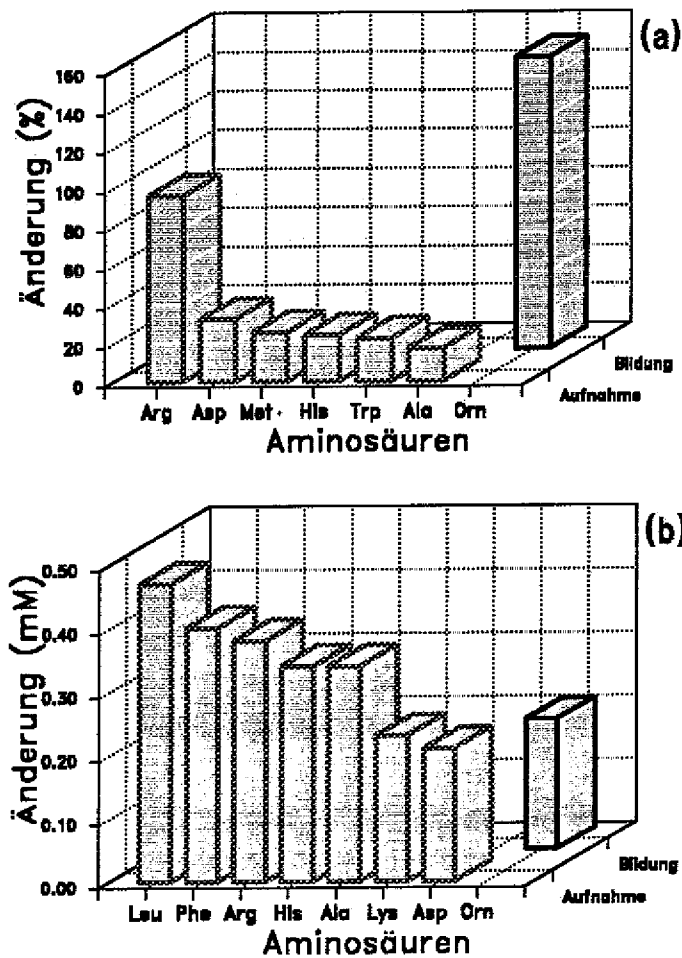


Abb. 11. Änderung von Aminosäuren im Kulturmedium bei Batch-Kultivierung: Aufnahme zum Zeitpunkt der höchsten L-Hic-DH-Volumenaktivität, Aufnahme: vorderer Balken, Bildung: hinterer Balken; Wachstum im MRS-Medium (deMan) bei 30 °C, pH 6.5, 300 upm, 0.2 NI N₂/(l × min)
a) relative Aufnahme: 100 % = Konzentration zum Zeitpunkt des Beimpfens
b) absolute Aufnahme (mM)

Nur im Falle von Arginin findet eine fast völlige Aufnahme statt, weiterhin werden die Konzentrationen von Asparat, Methionin, Histidin und Tryptophan auf 70 - 80 % ihres Ausgangswertes reduziert. Bei den übrigen, nicht in der Abb. 11 dargestellten Aminosäuren beträgt die Aufnahme 10 - 16 %. Ornithin fällt durch Zunahme um fast 150 % seines Ausgangswertes auf.

Weiter wurden die absoluten Aufnahmewerte in Abb. 11b dargestellt. Hier erkennt man, daß besonders Leucin, Phenylalanin, Arginin, Histidin und Alanin sich durch eine mengenmäßig starke Aufnahme auszeichnen.

Auch nach Nachfüttern von Glucose und weiterem Wachstum der Zellen tritt außer bei Arginin keine 100 %-tige Aufnahme auf. Aminosäuren sind also in diesem Medium vermutlich nicht limitierende Bestandteile. Peptide können von Lactobacillen ebenfalls aufgenommen werden. Daher sind Aufnahmespektren von Aminosäuren nur begrenzt zur Feststellung von Limitierungen geeignet, sind aber als Hinweis für Aufnahmepräferenzen wichtig.

4.2.1.2. Einfluß des C/N-Verhältnisses auf Wachstum und Enzymaktivität

Da der natürliche Standort von Lactobacillus confusus in zuckerreichen Säften beschrieben wird (Sharpe et al., 1972), wurde überprüft, ob das käufliche MRS-Medium (Merck) und das Medium nach deMan den Organismus ausreichend mit der C-Quelle versorgen. Das MRS-Medium nach Merck und nach Hummel enthalten 20 g Proteinstickstoff und 18.2 g Glucose/l Kultur (100.9 mM), das Standardmedium nach deMan 25 g Proteinstickstoff und 18.2 g Glucose/l Kultur.

Alle nachfolgend aufgeführten Fermentationen erfolgten bei pH-Konstanz, da gegenüber nicht-pH-statisierten Fermentationen höhere Zellerträge erzielt werden konnten (siehe Kap. 4.2.2.1).

Lactobacillus confusus wurde zunächst im käuflichen MRS-Medium bei pH 6.5 herangezogen. Die Messung der Glucose-Konzentrationen im Kulturüberstand zeigte einen völligen Verbrauch der C-Quelle circa 20 min, nachdem die Zellen ihr Wachstum eingestellt hatten.

Um zu überprüfen, ob der Zuckerverbrauch und nicht etwa ein hoher Lactat-Gehalt für den Wachstumstop verantwortlich war, wurde eine Fed-batch-Fermentation im MRS-Medium nach Merck durchgeführt (Abb. 12). Die Glucose-Nachdosierung erfolgte erst nach leichter Abnahme der A_{578} , um zu gewährleisten, daß die Glucose zu diesem Zeitpunkt ganz aufgebraucht war. Insgesamt erhielten die Zellen 239 mM (43.1 g/l) Glucose zur bereits vorhandenen Glucose. Abb. 12 zeigt deutlich, daß sowohl die L-Hic-DH-Volumenaktivität als auch das Trockengewicht nach erneuter Glucose-Gabe ansteigen. Die Volumenaktivität erreicht mit 98 U/l im ersten Anstieg nur 67 % ihres Maximalwertes nach Glucosenachfütterung (145 U/l). Trockengewicht und A_{578} lassen sich durch die Nachdosierung mit Glucose um das 1.3 fache steigern. Im Gegensatz hierzu nimmt das Gesamtzellprotein immer den gleichen Maximalwert an (320 -330 mg Protein /l Kultur).

Die maximal erreichten Wachstumswerte und Enzymaktivitäten sind für alle drei Anstiege in Tab. 12 wiedergegeben.

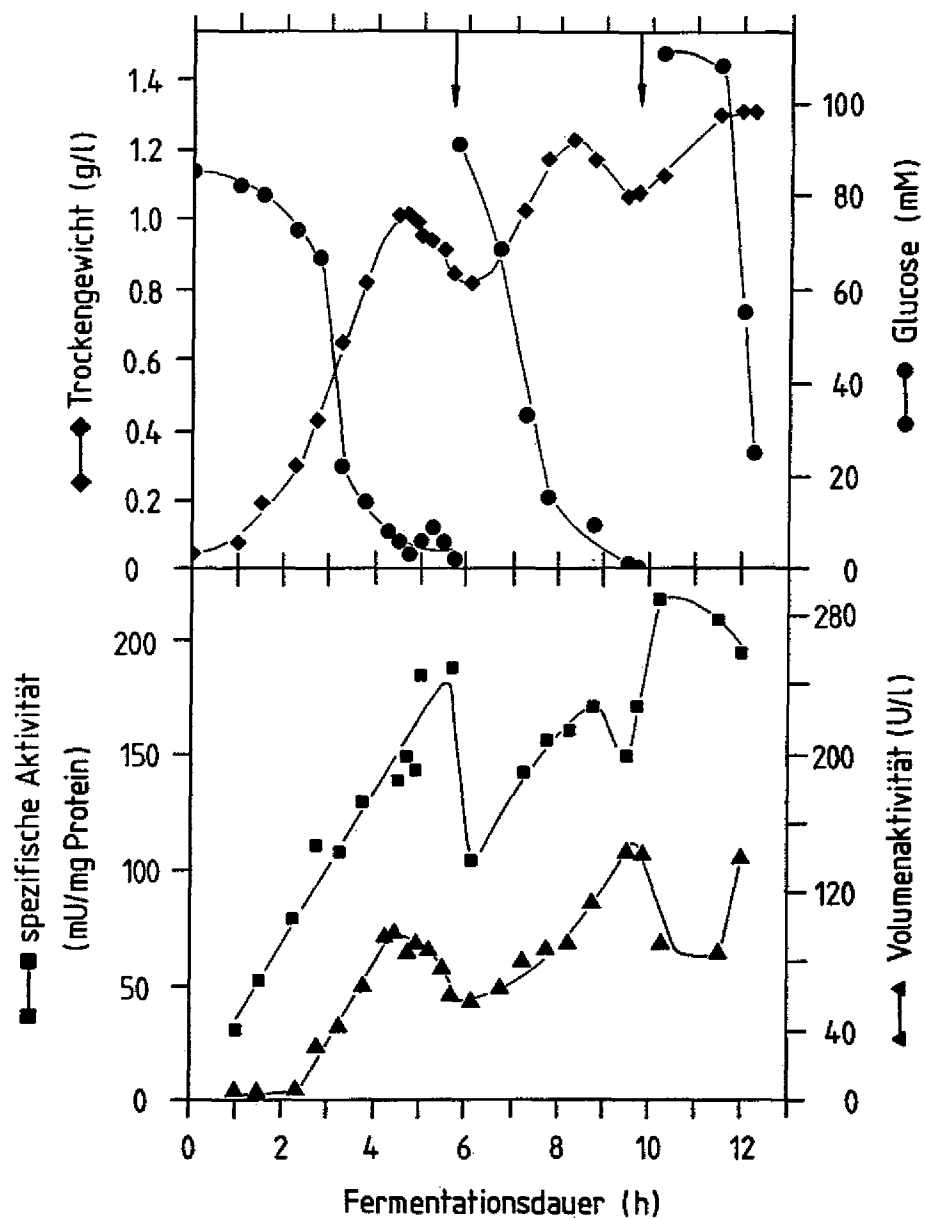


Abb. 12. Fed batch mit Glucose bei *Lactobacillus confusus*: Wachstum, Glucose-Aufnahme und L-Hic-DH-Aktivität während des Wachstums im MRS-Medium (Merck) bei 30 °C, pH 6.2, 300 upm, 0.2 NI N₂/(l × min); die Pfeile kennzeichnen die Nachdosierung von Glucose

	1. Anstieg	2. Anstieg	3. Anstieg	Steigerung
Volumenaktivität (U/l Kultur)	98	145	139	1.5x
spezifische Aktivität (mU/mg Protein im RE)	188	170	220	1.2x
spezifische Aktivität (U/g Trockengewicht)	97	119	106	1.1x
Trockengewicht (g/l Kultur)	1.01	1.22	1.31	1.3x
A ₅₇₈	4.4	5.2	5.9	1.3x
Zellprotein (mg/l Kultur)	331	317	334	1.0x
Feuchtgewicht (g/l Kultur)	10	11.9	13	1.3x

Tab. 12. Fed-Batch mit Glucose (Enzymaktivitäten): maximale L-Hic-DH-Aktivität und Erträge im Laufe des Wachstums in MRS-Medium (18.2 g Glucose/l) bei 30 °C und pH 6.2 und zweimaliger Nachdosierung von Glucose auf eine Gesamtmenge von 61.3 g/l Kultur

Ein zu hoher Lactat-Gehalt kann nicht für den ersten Wachstumsstop verantwortlich gewesen sein, denn die Lactat-Konzentration steigt auch nach der Glucose-Nachdosierung weiter an. Eher kann man von einer Limitierung des Wachstums durch einen zu geringen Glucose-Gehalt im käuflichen MRS-Medium nach Merck ausgehen.

Die spezifische Aktivität, auf das Protein im Rohextrakt bezogen, übersteigt ihren Wert im ersten Anstieg um 17 %. Bei Bezug auf das Trockengewicht ist sie jedoch nur um 9 % erhöht. Es liegt also kein wirklich extremer Anstieg der spezifischen Aktivität vor, denn das Zellprotein bleibt gleich und täuscht so einen Anstieg vor. Die maximale Volumenaktivität ist nach 9.5 h und die maximale Zellmasse erst nach 12.5 Stunden erreicht.

Aus den stark abnehmenden Wachstumsraten, der im Verhältnis zur aufgenommenen Glucose immer weniger gebildeten Trockenmasse vom ersten zum dritten Anstieg hin erkennt man, daß die zweite Nachfütterung mit Glucose nicht mehr so effektiv verwertet wird.

	1. Anstieg	2. Anstieg	3. Anstieg
Wachstumsrate μ (h ⁻¹)	0.66	0.23	0.14
Verdoppelungszeit t_d (h)	1.52	4.35	7.14
Ertragskoeffizient (g Tg _{geb} / mol Glc _{aufg})	6.16	5.44	0.87
Ertragskoeffizient Y ((g Tg _{geb} / g Glc _{aufg}) $\times 10^{-3}$)	34	30	4.3

Tab. 13. Fed-Batch mit Glucose (Wachstum): Wachstumsraten und Ertragskoeffizienten im Laufe des Wachstums in MRS-Medium bei 30 °C und pH 6.2 bei zweimaliger Nachdosierung von Glucose.

Zur Bildung von 10 g Feuchtgewicht/l werden circa 26.7 g Glucose/l benötigt.

Alle weiteren Experimente gingen von dem in der Literatur meist verwendeten Standard-MRS-Medium nach deMan aus.

Eine Serie von Batch-Fermentationen mit konstanter Ausgangskonzentration an Proteinstickstoff aber variablen Glucose-Ausgangskonzentrationen (0 - 72.3 g/l) sollte zeigen,

- ob die Zellmasse und Volumenaktivität sich auch gegenüber einer Kontrollfermentation mit 18.2 g Glucose/l steigern lassen, wenn zusätzlicher Zucker gleich zu Beginn und nicht erst nach Aufbrauch zugegeben wird,
- ob die Erhöhung der Glucose-Ausgangskonzentration das Wachstumsverhalten, die Produktbildung (Lactat) und die Enzymaktivität im Laufe der Fermentation verändert.

Da sich bei vorausgegangenen Fermentationen die Anlaufphasen von 2.5 auf 1.5 Stunden verkürzen und die Erträge ansteigen (Kap. 4.4.2), wenn die Temperatur von 30 ° auf 37 °C erhöht wird, wurde eine Fermentationstemperatur von 37 °C gewählt.

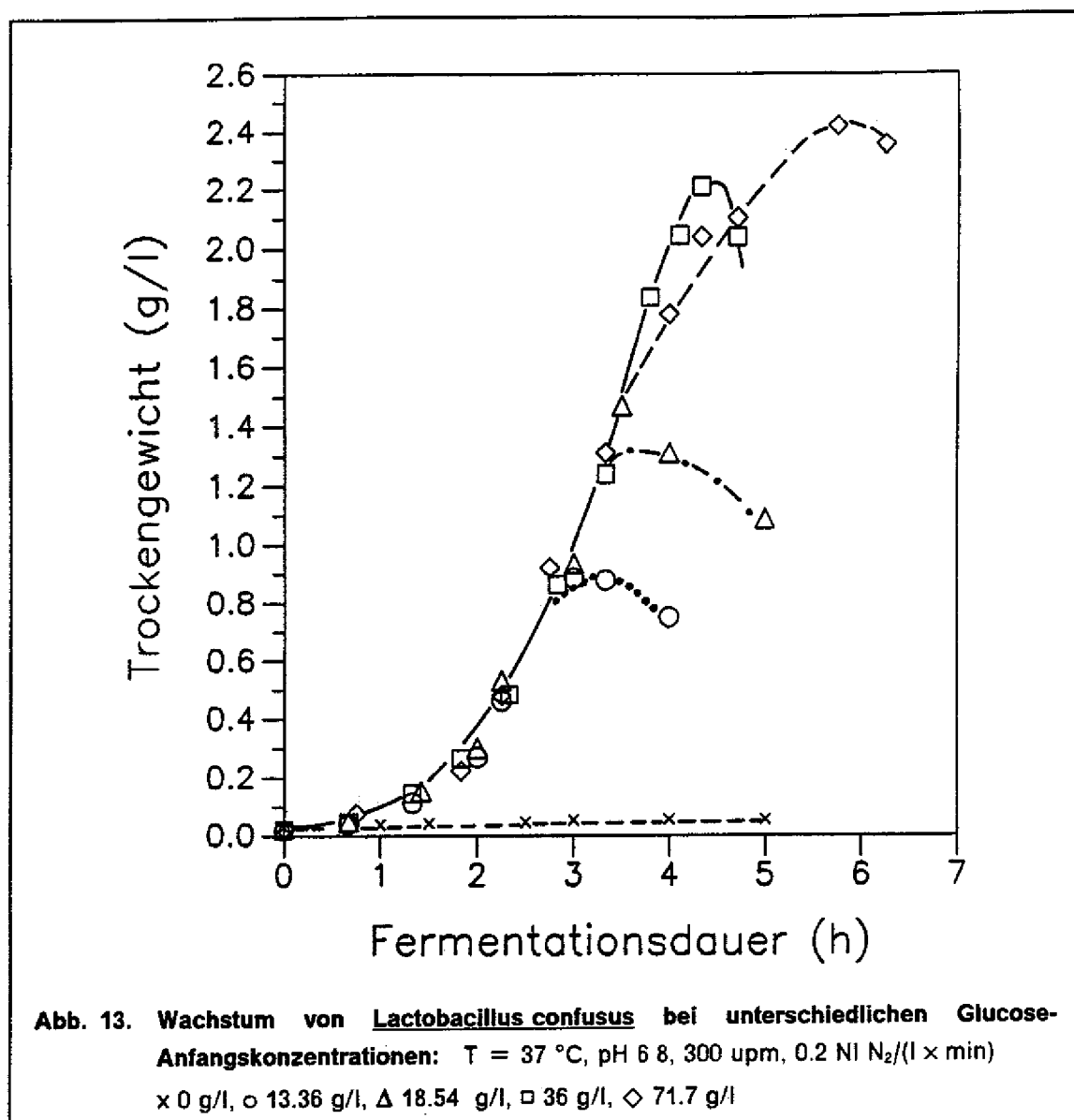
Den Anstieg der **Biomasse** im Laufe des Wachstums zeigt Abb. 13. Die Wachstumscharakteristika sind in Tab. 14 dargestellt.

Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, verlaufen die Wachstumskurven bei den verschiedenen Zuckerkonzentrationen ähnlich. Eine Anlaufphasen-Verlängerung durch steigende Anfangszuckerkonzentrationen findet nicht statt (siehe auch Tab. 14 über die Wachstumscharakteristika). Alle Zuckerkonzentrationen sind auf wasserfreie Glucose bezogen.

Die maximale spezifische Wachstumsrate liegt bei allen Konzentrationen etwa gleich hoch bei einem Mittelwert von $\mu_{\max} = 1.09 \text{ h}^{-1}$. Hinsichtlich seiner Wachstumsgeschwindigkeit befindet sich Lactobacillus confusus also im Substratsättigungsbe- reich, in dem die Geschwindigkeit unabhängig von der Konzentration des limitie- renden Substrates ist (Monod, 1942; Gleichung 2.6).

Bei gleichlangen Anlaufphasen und Wachstumsraten verlängert sich lediglich die Fermentationsdauer bis zum Erreichen der maximalen Zellmasse. Durch Erhöhen der Standardkonzentration von 18.2 g Glucose/l (100.9 mM) auf 71.7 g/l läßt sich die Trockenmasse von 1.45 g/l auf 2.4 g/l um das 1.63 fache steigern. Glucose ist also offensichtlich bei der von deMan gewählten Medienzusammensetzung bis Zuckeran- fangskonzentrationen von 54 g/l das limitierende Substrat. Ohne Glucose, nur mittels der Protein-Stickstoffkomponenten, vermag Lactobacillus confusus nicht zu wachsen. Bei 54 g Glucose/l wurden nur Anfangswerte und maximale Werte, keine vollständige Wachstumskurve aufgenommen.

Eine Proteaseaktivität (PMSF), die eventuell für die Abnahme der L-Hic-DH-Aktivität bzw. des Wachstums in der exponentiellen Phase verantwortlich sein könnte, wurde



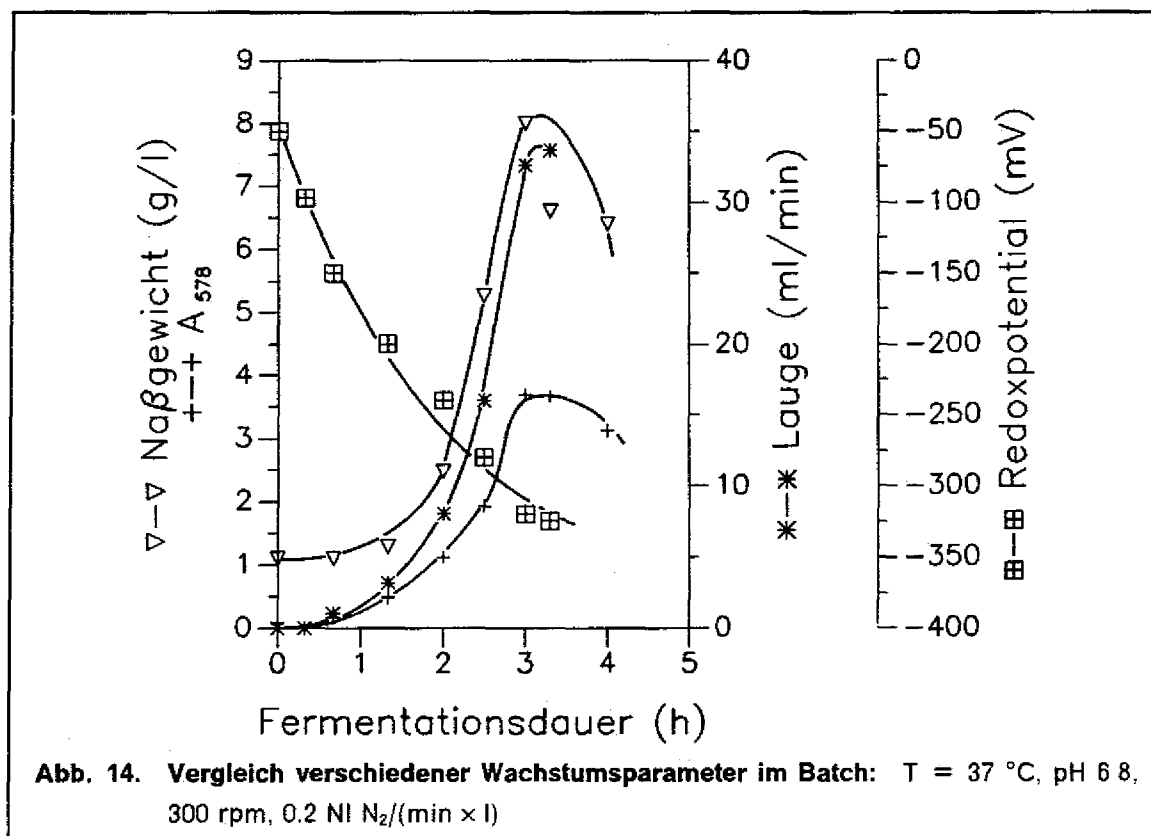
in den Rohextrakten von Kulturen, die bei mittleren Zuckeranfangskonzentrationen gewachsen waren, nicht festgestellt.

Die übrigen Wachstumsparameter Feuchtwicht, A_{578} , auch der Laugeverbrauch zeigen während der Fermentation einen ähnlichen Verlauf wie die Trockenmasse (Abb. 14). Mit Eintritt in die stationäre Phase war bei allen Fermentationen das Redoxpotential auf -350 - -400 mV abgesunken und änderte sich nicht mehr.

Die Beendigung des Laugeverbrauchs kann nunmehr als gutes Erntesignal für Zellen statt des bisher verwendeten pH-Abfalls (Schütte et al., 1984) dienen: bei allen Zuckerkonzentrationen ist das Erreichen der maximalen A_{578} durch ein Einstellen des Laugeverbrauchs (wie in Abb. 14) und den Beginn eines leichten Säureverbrauchs gekennzeichnet. Das Einstellen des Laugeverbrauchs fällt mit dem Stop der Lactat-Produktion zusammen.

Anfangs-Glucose (g/l Kultur)	0	13.36	18.54	36.0	54.0	71.7
Anfangs-Glucose (mM)	0	74.2	102.9	199.8	299.7	398.0
max. spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	-	1.08	1.16	1.07	-	1.03
Verdopplungszeit t_d (h)	-	0.64	0.6	0.64	-	0.67
Dauer Anlaufphase (h)	-	1.25	1.25	1.25	-	1.25
Fermentationsdauer bis max. Trockengewicht (h)	-	3	3.5	4.25	5.0	5.75
Ertrag $(A_{578})_{\max} - (A_{578})_0$	0.10	3.61	6.02	9.11	9.36	9.97
Ertrag Trockengewicht (g/l)	0	0.87	1.45	2.20	2.26	2.40
Ertrag Feuchtgewicht (g/l)	0	6.9	8.1	12.1	12.9	14.3

Tab. 14. Wachstum bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen: Batch in MRS-Medium nach deMan (Standard-Glucose-Konzentration: 18.2 entsprechend 20.0 g/l Glucose-Monohydrat) bei 37 °C, pH 6.8, 0.2 l N₂/(min × l), 300 upm



Die **Produktbildung und Ertragskoeffizienten** sind in Tab. 15 dargestellt. Alle berechneten Werte sind auf wasserfreie Glucose bezogen.

Bis zu einer Anfangs-Glucose-Konzentration von 54 g/l Kultur wird der eingesetzte Zucker vollständig zu Lactat umgesetzt, bei 71.7 g/l nur noch zu 80.4 % mit einer entsprechenden Restzuckermenge (Tab. 15). Bei 54 g Glc/l werden 0.51 g Lactat pro g aufgenommener Glucose gebildet. Mittels der Henderson-Hasselbalch- Gleichung, dem entsprechenden pH-Wert, den gemessenen Gesamt-Lactat-Konzentrationen und dem pKs-Wert läßt sich die Konzentration der undissoziierten Milchsäure errechnen. Sie steigt mit zunehmender Zuckerkonzentration von 7 bis 33 mg/l Kultur und beträgt in allen Fällen nur 0.12 % des Gesamt-Lactats.

Mit 30 - 64 mmol Acetat/l Kultur zusätzlich zum eingesetzten Acetat wird viel weniger Acetat als Lactat (75 - 320 mM) gebildet. Entsteht bei niedrigen Glucose-Konzentrationen noch 2 g Acetat pro 5 g Lactat, nimmt das Verhältnis von Acetat zu Lactat mit steigender Zuckerkonzentration auf 1/5 ab. Diese Acetat-Bildung tritt immer erst ganz am Ende der exponentiellen Wachstumsphase auf.

Anfangs-Glucose (g/l Kultur)	0	13.36	18.54	36.0	54.0	71.7
Anfangs-Glucose (mM)	0	74.2	102.9	199.8	299.7	398.0
Rest-Glucose (g/l Kultur)	0	0	0	0	0	14.1
Ertragskoeffizient ($\text{g Tg}_{\text{geb.}}/\text{g Glc}_{\text{aufg.}} \times 10^{-2}$)	0	65	78.2	61	75	41.6
Lactatbildung (g/l)	0	6.75	9.9	19.8	27.45	28.8
undissoziierte Milchsäure (mg/l)	0	7.7	11.3	23.8	31.5	33.1
Acetatbildung (g/l)	0	1.8	2.16	3.18	3.24	3.84

Tab. 15. Produktbildung und Ertragskoeffizient:
bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen; Batch in MRS-Medium nach deMan (Standard-Glucose-Konzentration = 18.2 g/l) bei 37 °C, pH 6.8, 0.2 NI N₂/(min × l), 300 upm

Die Betrachtung der **L-Hic-DH-Aktivität** zeigt, daß die Volumenaktivität sich durch Erhöhung der Glucose-Ausgangskonzentration von 18.54 g/l Kultur auf 71.7 g/l um das 2.7 fache von 502 U/l auf 1355 U/l steigern läßt. Die Charakteristika der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Glucose-Anfangskonzentration sind in Tab. 16 und Abb. 15 dargestellt.

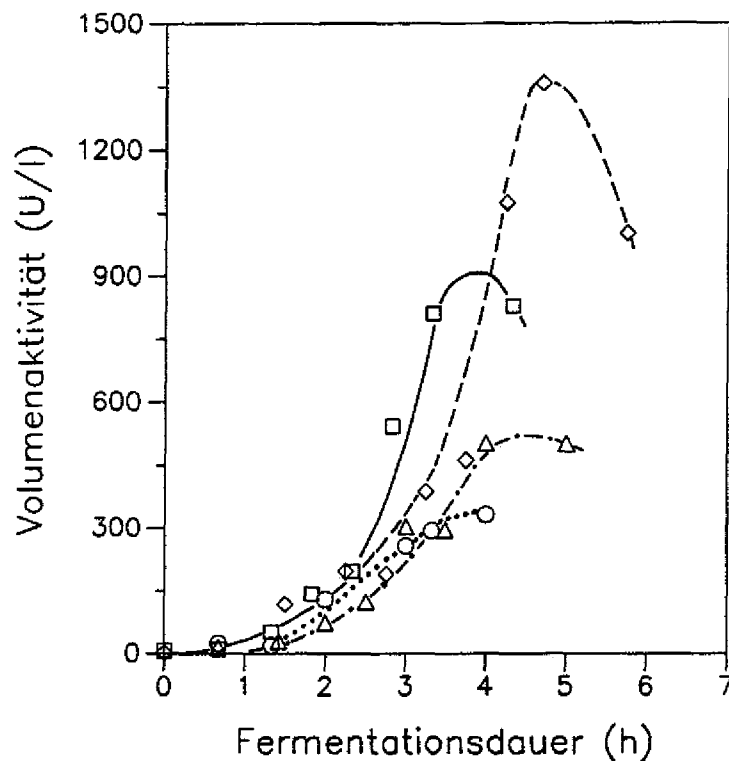


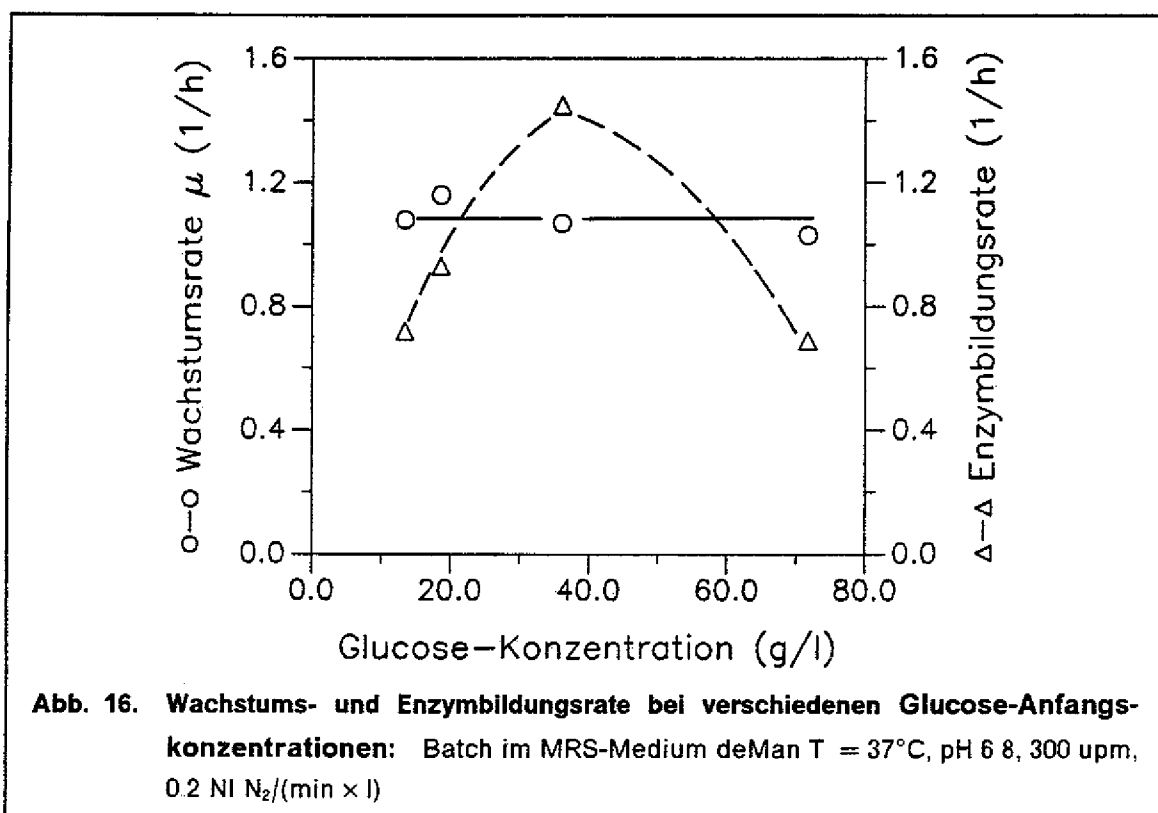
Abb. 15. L-Hic-DH-Volumenaktivität bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen
: Aktivitäten im Laufe des Wachstums bei $T = 37^\circ\text{C}$, pH 6.8, 300 upm,
0.2 NI $\text{N}_2/(\text{min} \times \text{l})$
○ 13.36 g/l, Δ 18.54 g/l, □ 36 g/l, ◇ 71.7 g/l

Zu Beginn des Wachstums ist eine ganz kleine Volumenaktivität von maximal 10 U/l vorhanden. Diese macht 3 - 0.75 % der späteren Aktivität aus und nimmt bereits nach 30 min deutlich zu. Die höchste Volumenaktivität wird bei niedrigen Zuckerkonzentrationen (13.36, 18.54 g/l) 1 - 0.5 h vor Einstellen des Laageverbrauchs, bei 36 g/l zusammen mit dem Laagestop und bei hohen Zuckerkonzentrationen 0.5 - 1 h nach Ende des Laageverbrauchs erreicht. Das Maximum der Volumenaktivität fällt also im Gegensatz zum Maximum der Zellmasse nicht mit dem Ende des Laageverbrauchs zusammen. Zum Erhalt einer maximalen Volumenaktivität muß also für den Erntezeitpunkt auch die Zuckerkonzentration im Medium berücksichtigt werden.

Anfangs-Glucose (g/l Kultur)	0	13.36	18.54	36.0	54.0	71.7
Anfangs-Glucose (mM)	0	74.2	102.9	199.8	299.7	398.0
Volumenaktivität (U/l)	0	322	502	823	1008	1355
Bildungsrate Volumenaktivität (1/h)	0	0.72	0.93	1.45	-	0.69
Dauer bis zur max. Volumenaktivität (h)	-	4	4	4.25	4.25	4.75
spezifische Aktivität (U/mg Protein im RE)	0	1.09	1.04	1.75	2.0	2.14
spezifische Aktivität (U/g Trockengewicht)	0	370	346	374	446	565

Tab. 16. L-Hic-DH-Aktivität bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen: Batch in MRS-Medium nach deMan (Standard-Glucose-Konzentration = 18.2 g/l) bei 37 °C, pH 6.8, 0.2 NI N₂/(min × l), 300 upm

Im Gegensatz zur maximalen spezifischen Wachstumsrate $\mu_{\max}$ bleibt die Enzymbildungsrate (Zahl der Verdopplungen der Volumenaktivität pro Stunde in der exponentiellen Phase) nicht konstant.



Pro Zeiteinheit wird am meisten Enzym bei einer Zuckerkonzentration von 36 g/l gebildet. Bei niedrigen und bei hohen Substratkonzentrationen verdoppelt sich die Volumenaktivität weniger schnell (Abb. 16; Tab. 16).

Um zu sehen, ob die L-Hic-DH-Aktivität wachstumsgekoppelt ist, wurden zum einen die Volumenaktivitäten im Laufe der Fermentation mit den entsprechenden Trockengewichtswerten und zum andern die maximalen Volumenaktivitäten mit den maximalen Trockengewichtswerten bei verschiedenen Glucose-Ausgangskonzentrationen korreliert.

Für keine Zucker-Anfangskonzentration ergab sich eine Korrelation zwischen Aktivität und Trockengewicht im Laufe des Wachstums, da weder die Länge der Anlaufphase, noch die Zeit bis zum Erreichen der Maximalwerte, noch die Bildungsraten übereinstimmten. Einzige Ausnahme stellt die in Kap. 4.1.1 dargestellte Fermentation bei pH 6.5 und 54.6 g/l Glucose dar. Dort waren Aktivitäten und Trockengewicht im Laufe des Wachstums streng korreliert und Enzymbildungs- wie Wachstumsraten, wie nach Abb. 16 erwartet, gleich.

Vergleicht man jedoch die maximalen Volumenaktivitäten mit dem maximalen Trockengewicht, so ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen den beiden Größen bis zu einer Anfangs-Glucose-Konzentration von 36 g/l (Abb. 17).

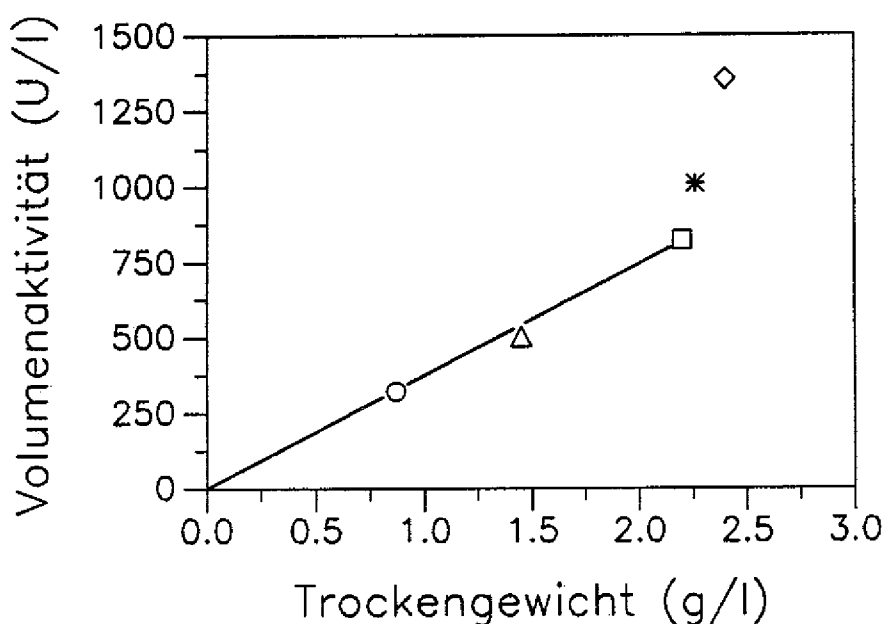
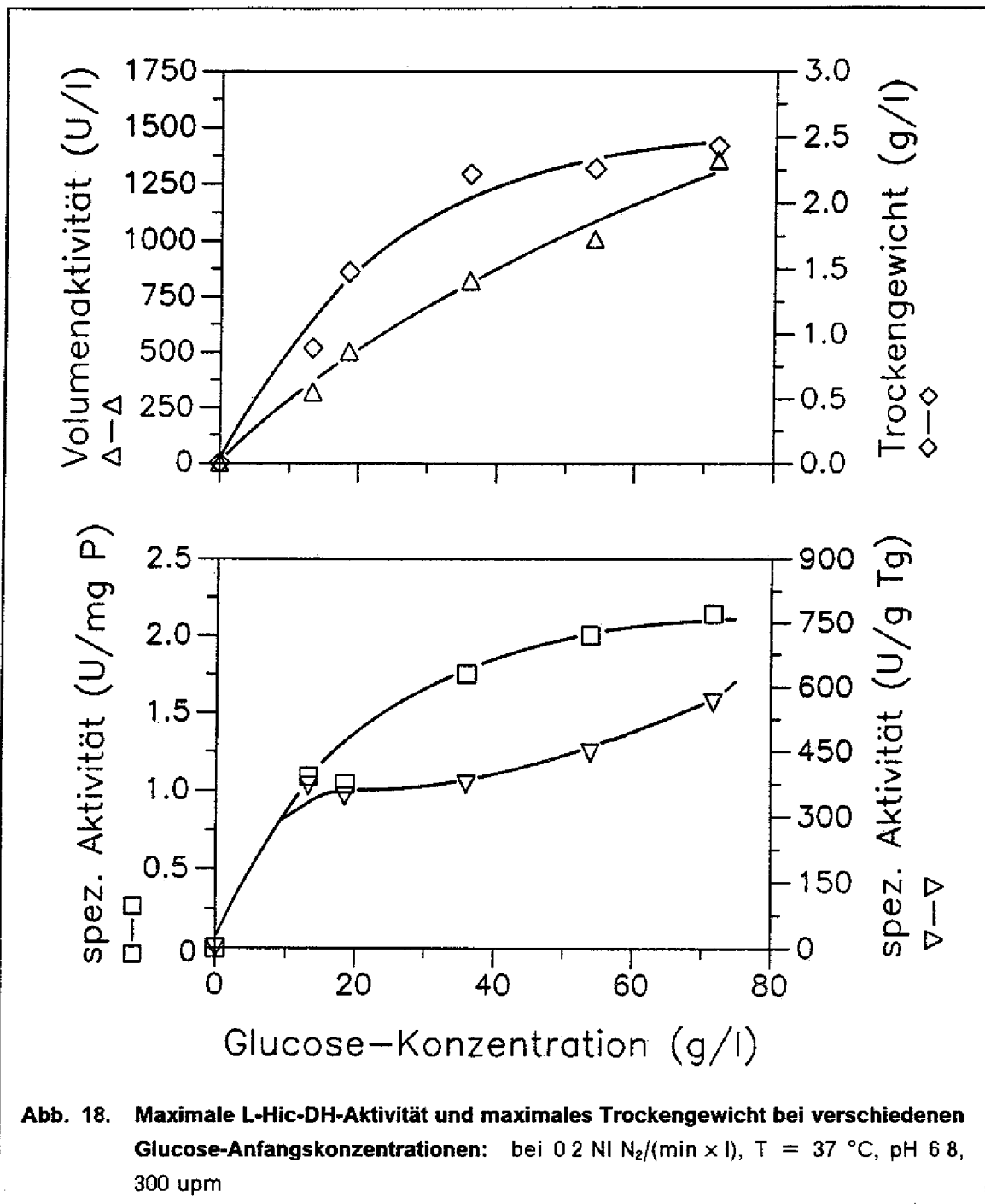


Abb. 17. Beziehung zwischen L-Hic-DH-Volumenaktivität und Trockengewicht bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen: maximale Aktivitäten bei pH 6.8, 300 upm, $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0.2\text{ NI N}_2/\text{min} \times \text{l}$
 ○ 13.34 g/l, Δ 18.2 g/l, □ 36 g/l, * 54 g/l, ◇ 71.7 g/l

Eine Kopplung der maximalen L-Hic-DH-Aktivität im Batch mit dem Trockengewicht liegt also nur für bestimmte Zuckerkonzentrationen vor. Diese Korrelation gilt auch für die A_{678} und die Aktivität. Die maximalen Aktivitäten und Zellmasse in Abhängigkeit von der Glucose-Anfangskonzentration sind in Abb. 18 zusammenfassend dargestellt.



Die auf das Trockengewicht bezogene spezifische Aktivität steigt wie nach Abb. 17 erwartet erst oberhalb von 36 g Glucose/l weiter an, während die auf das Zellprotein bezogene spezifische Aktivität über alle Zuckerkonzentrationen hin zunimmt.

Entgegen den Erwartungen, daß, solange die eben erwähnte Wachstumskopplung besteht, die maximal erreichte spezifische Aktivität pro mg Protein im Rohextrakt auch konstant bliebe, erhöht sich diese also schon bei niedrigen Zuckeranfangskonzentrationen. Dies liegt an dem mit zunehmendem Trockengewicht (Glucose-Zunahme) abnehmenden Gesamtzellprotein, wodurch die resultierenden spezifischen Aktivitäten bei Bezug auf das Protein höher ausfallen, als bei Bezug auf das Trockengewicht. Diese nicht parallele Entwicklung zwischen beiden spezifischen Aktivitäten wird auch später in der mangelnden Korrelation beider Größen mittels aller steady-state-Meßpunkte bestätigt.

4.2.1.3 Einfluß verschiedener C-Quellen auf das Wachstum

Da Lactobacillus confusus an zuckerreichen Standorten vorkommt, wurde untersucht, ob der Organismus auch auf anderen Zuckern als Glucose gut wächst. Das von Holzapfel und Kandler (1969) und Sharpe et al. (1972) veröffentlichte, qualitative Zuckerspektrum sollte durch quantitative Angaben ergänzt werden.

Die pH-Konstanz in den Kolben wurde durch Titration (Kap. 4.2.2.1) gewährleistet. Ein verdünntes Medium nach deMan und eine Temperatur von 37 °C wurden für vergleichende Wachstumsuntersuchungen gewählt, da

- die Medienkosten durch die Verdünnung herabgesetzt wurden
- der pH-Wert wegen des im verdünnten Medium geringeren Wachstums weniger nachtitriert werden mußte
- mit der Verdünnung als auch der Temperaturerhöhung eine verkürzte Fermentationsdauer einhergehen.

Das MRS-Medium (deMan) mit erhöhtem Zuckergehalt zur Vermeidung von C-Limitierungen (Kap. 4.2.1.2) wurde unter Wahrung des C-/Protein-N-Verhältnisses herunterverdünnt. Bei einer 1:20 Verdünnung war mit einer $A_{578} = 1$ ein noch meßbarer Ertrag gewährleistet (4.3-facher Ertragsverlust). Die Wachstumsrate blieb bei allen Verdünnungen mit circa 0.8 h^{-1} konstant. Die Zuckerkonzentration betrug noch 3 g/l. Verschiedene C_6 -Einfachzucker, Mehrfachzucker, Zuckersäuren, Zuckeralkohole und C_5 -Zucker wurden zu dem verdünnten MRS-Medium zugesetzt und die Änderung der maximalen spezifischen Wachstumsrate $\mu_{\max}$ und des Ertrages gegenüber der Tageskontrolle mit 3 g Glucose/l beobachtet. Die Änderung ist in Tab. 17 nur prozentual auf die Tageskontrolle bezogen angegeben, da die absoluten Werte tageweise stark schwankten.

Ohne Zucker wuchsen die Zellen nur um $A_{578} = 0.1$. Der mittlere Ertrag aller Glucose-Kontrollen betrug $(A_{578})_{\max} - (A_{578})_0 = 0.91$, die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu = 0.67 \text{ h}^{-1}$. Bei sehr schlecht wachsenden Zellen wurde keine Wachstumsrate bestimmt. Ein Wachstum unter 3 % wird als nicht wachsend (-) angegeben. Abb. 19 zeigt die Erträge, die im Vergleich zum Ertrag auf Glucose am höchsten waren. Das qualitative Zuckerspektrum stimmt mit dem von Holzapfel und Kandler überein; auf Saccharose und Fructose wurde allerdings ein ganz geringes Wachstum beobachtet. Kein Wachstum ist auf Arabinose und Lactose möglich. Der Glucose in der Stereoisomerie ähnliche Substanzen können umgesetzt werden (Maltose, Gluconsäure, Xylose). Gluconsäure kann über 6-Phosphogluconat und Xylose über Xylulose-5-Phosphat in den heterofermentativen Abbauweg eingeschleust werden (Kandler, 1982). Zuckeralkohole (Mannit, Glycerin, Sorbit) werden, auch wenn sie in der Zahl der C-Atome mit der Glucose übereinstimmen, nicht umgesetzt. Auf Dextrose, einer Glucose mit geringerem Reinheitsgrad, wird nur 70 % des Ertrages auf Glucose erreicht. Diese billige Glucose-Quelle scheidet somit für weitere Versuche aus.

Zucker	Wachstum qualitativ	Wachstum im Vergleich zur Glucose-Kontrolle	
		$\mu_{\max} (\%)$	$(A_{578})_{\max} - (A_{578})_0 (\%)$
Glucose	+	100	100
Dextrose	+	147	71
Fructose	(+)	-	3.2
Maltose	+	108	74.6
Saccharose	(+)	-	3.6
Lactose	-	-	2.1
Xylose	+	107	17.1
Arabinose	-	-	0.9
Gluconsäure	+	79	36
Sorbit	-	-	1.1
Mannit	-	-	0.1
Glycerin	-	-	1.7

Tab. 17. Wachstum mit verschiedenen Zuckern und Zuckerderivaten im Kolben: MRS-Medium deMan (1:20), pH 6.5, T = 37 °C, 150 upm, Mittelwerte aus 3 parallelen Versuchen

Die L-Hic-DH-Aktivität war aus den in Kap. 4.2.1.4 (S. 80) aufgeführten Gründen in Kolben nicht bestimmbar.

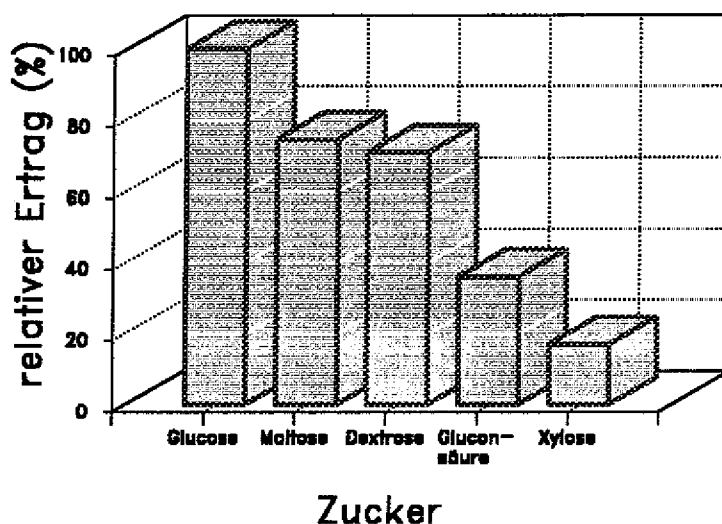


Abb. 19. Ertrag bei Wachstum auf verschiedenen Zuckern im Kolben:

Ausgangsmedium: MRS-Medium nach deMan (1:20 verdünnt) bei $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6.5, 150 upm, mit je 3 g Zucker/l

Wachstum auf Xylose

Xylose ist ein schwer abbaubarer Zucker in Abwässern der Holzindustrie. Die Fähigkeit zu ihrer Verwertung ist daher für die Reinigung und weitere Verwertung solcher Abwässer von Bedeutung.

Die Verwertung der Pentose Xylose wurde im 5 l-Maßstab im Fermenter untersucht. Die Vorkultur wurde mit Xylose angezogen, die Hauptkultur mit erhöhtem Xylose-Gehalt (60 g Xylose-Monohydrat/l).

Abb. 20 zeigt A_{578} , Laugeverbrauch, und L-Hic-DH-Aktivitäten im Laufe des Wachstums. Auch wenn die maximale L-Hic-DH-Aktivität mit 8.5 U/l und 70 mU/mg Protein verschwindend gering ist, fällt auf, daß sie auch ohne Vorhandensein von Glucose auftritt und zusammen mit der Zellmasse ansteigt.

35 mU/mg Protein Grundaktivität scheint in den Zellen immer vorhanden zu sein. Dieser Wert wird auch nach Lyse der Zellen wieder gefunden.

Auf Glucose erreichen die Zellen unter gleichen Bedingungen bei einer A_{578} von 1 bereits eine Aktivität von 100 U/l Kultur (Kap. 4.4.1)! Im Vergleich zum Wachstum im Fermenter auf Glucose werden nur circa 10 % des Ertrages ($A_{578} = 0.72$) erreicht, noch weniger also als im Kolben. Dort erreicht der Ertrag auf Xylose 20 % dessen mit Glucose.

Der Laugeverbrauch endet nicht mit Erreichen der höchsten A_{578} sondern verlangsamt sich nur. Die Zellen brauchen eine circa 1 h längere Anlaufphase als auf Glucose,

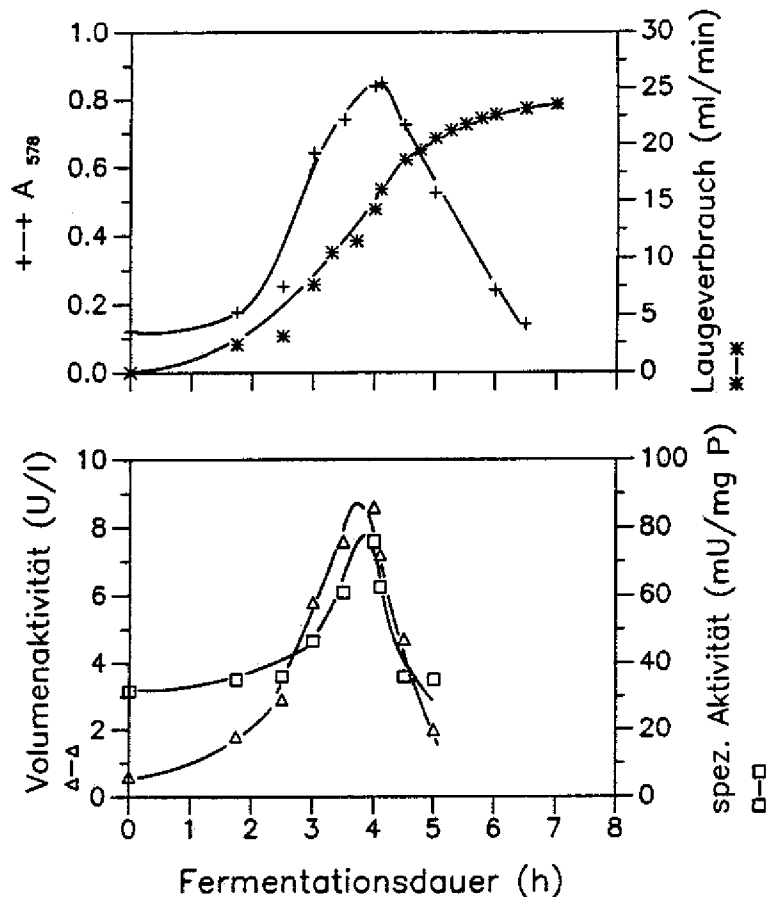


Abb. 20. L-Hic-DH-Aktivität und Wachstum auf Xylose: Ausgangsmedium = MRS-Medium nach deMan mit 54.6 g Xylose/l, bei $T = 37^\circ\text{C}$, pH 6.5, 300 upm, $0.2 \text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$

wachsen dann aber mit einer enorm hohen Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 1.9 \text{ h}^{-1}$. Diese Fermentation läßt sich durch einen Vitamincocktail nicht verbessern.

4.2.1.4 Einfluß organischer Säuren auf das Wachstum

Obwohl die Aminosäuren im MRS-Medium bis auf Arginin nicht limitierend sind (Kap. 4.2.1.1), ist ein Effekt auf die Enzymaktivität oder eine wachstumsfördernde Wirkung im Falle stark aufgenommenen Aminosäuren nicht auszuschließen. Keto- und Hydroxysäuren als Substrate der L-Hic-DH könnten auch die Aktivität steigern. Daher wurden diese und einige andere organische Säuren zusätzlich zu eventuell in komplexen Extrakten enthaltenen den Kulturmedien zugesetzt. Eine möglicherweise reprimierende Wirkung der Säuren war von Interesse, da sie später auch in die Simplex-Optimierung eingesetzt werden sollten.

In diesem Kapitel steht zunächst die Wirkung dieser organischen Säuren auf das *Wachstum* im Vordergrund. Mittels Kolbenversuchen lassen sich zwar viele Substanzen parallel auf ihre Wirkung auf das Wachstum untersuchen. Für die Bestimmung der *Enzymaktivität* jedoch eignen Kolben sich nicht:

- Die in Kolbenversuchen gemessene L-Hic-DH-Aktivität ist selbst im Vollmedium sehr gering (20 - 30 U/l). Wegen einer sehr hohen Hintergrundaktivität, die in Kolben bis zu 80 % der Gesamt-NADH-umsetzenden Aktivität ausmacht, ist die eigentliche L-Hic-DH-Aktivität nicht mehr exakt bestimmbar. Im Fermenter liegt diese Hintergrundaktivität meist nur bei 10 bis maximal 50 % der Gesamtaktivität.
- Da die L-Hic-DH-Aktivität kurz nach Erreichen des Maximalwertes (siehe Abb. 14) schon wieder abfällt, müßte sie im Laufe des Wachstums mehrmals bestimmt werden, um das Maximum nicht zu verpassen. Im Kolben reicht das Probevolumen hierzu nicht aus; bei der sehr geringen Aktivität müßten mindestens 200 ml pro Probenahme veranschlagt werden.
- Die Ernte zu einer bestimmten Zeit nach dem Animpfen verspricht wegen verschieden langer Anlaufphasen auf unterschiedlichen Substraten auch keine Vergleichsmöglichkeit.

Um die Wirkung aktivierender Substanzen nicht zu überdecken und eine zu hohe Säureproduktion zu vermeiden, wurden die Versuche wie im Kap. 4.2.1.3 im 1:20 verdünnten MRS-Medium nach deMan durchgeführt. 1 g Glucose wurden pro l Kultur zugesetzt, da ein Wachstum nur mit organischen Säuren allein nicht möglich war. Der Einfluß auf die maximale spezifische Wachstumsrate und den Ertrag ist wiederum als prozentualer Anteil an der Glucose-Tageskontrolle (1 g Glucose/l) angegeben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 - 3 Parallelproben. Die mittlere Wachstumsrate $\mu_{\max}$ aller Glucose-Kontrollen betrug 1.0 h^{-1} und der mittlere Ertrag 0.494 (A_{578}).

Unter den Aminosäuren können Arginin und Citrullin das Wachstum leicht steigern. Glutamat und Tryptophan bewirken eine Erhöhung der Wachstumsrate, aber kaum eine Änderung des Ertrages. Bei Leucin, Alanin, Aspartat fällt auf, daß die Wachstumsrate stark ansteigt (bis zu 36 %), dies aber mit einer Ertragsverminderung von bis zu 25 % einhergeht. Ornithin erweist sich als starker Hemmer des Wachstums. Keto- und Hydroxysäuren mindern generell die Wachstumsrate bis zu 10 %, den Ertrag um 12 - 15 %.

Die übrigen Säuren, die Nährmedien häufig als Komplexbildner zugesetzt werden, hemmen das Wachstum in in der gewählten Konzentration um circa 10 %.

Zusätze		Änderung von $\mu_{\max}$ (%)	Änderung des Er- trages $(A_{578})_{\max} - (A_{578})_0$ (%)
Aminosäuren.	Alanin	+ 36	-16
	Arginin	+ 18	+ 4
	Aspartat	+ 32.5	-25
	Citrullin	+ 6	+ 2
	Glutamat	+ 19	± 0
	Isoleucin	+ 3	-9
	Leucin	+ 24	-11
	Methionin	-1	-2
	Ornithin	-18	-6
	Phenylalanin	+ 2	-2
	Tryptophan	+ 29	-1
	Valin	+ 1	-2
2-Keto-,Hydroxy- säuren	2-Ketoleucin	-6	-12
	2-Ketovalin	-11	-13
	2-Ketovaleriansäure	-7	-13
	L-2-Hydroxyisocaproat	-2	-15
Sonstige	Citronensäure $\times$ H ₂ O	-8	-9
	Natriumtartrat $\times$ 2 H ₂ O	+ 9	-9

Tab. 18. Einfluß zusätzlicher organischer Säuren auf das Wachstum: Änderung gegen-
über Glucose-Kontrollen im MRS-Medium nach deMan (1:20 verdünnt); 1 g
Glucose/l und 3 g Zusätze/l bei T = 37 °C, pH 6.5, 150 upm; Verringerung: (-);
Verbesserung: (+); Kontrolle = 100%; 2 - 3 parallele Ansätze

4.2.2 Variation der Kulturbedingungen

Ziel der diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen war es, das Verhalten von Lactobacillus confusus bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten sowie das Verhalten im Standardmedium nach deMan und unter Standard-Bedingungen (pH 6.5, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) in kontinuierlicher Kultur kennenzulernen, bevor in Kap. 4.3 eine weitreichende Variation *aller* Kulturbedingungen und Nährmediumsbestandteile durchgeführt wurde.

Im einzelnen sollten die Untersuchungen in kontinuierlicher Kultur dazu dienen,

- die Enzymproduktion vom Batch- in das kontinuierliche Verfahren zu übertragen und quantitativ zu erfassen,
- das Wachstumsverhalten, die Substrataufnahme, die Produktbildung und die Kopplung zwischen Enzymaktivität und Wachstum zu beobachten,
- die Gültigkeit der Monod-Kinetik zu überprüfen,
- und die Parameter der kontinuierlichen Kultur (k_s , Y , $\mu_{\max}$) zu bestimmen.

4.2.2.1 Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum

Bibal et al. (1988) berichten über eine 5-fache Steigerung der Zellmasse bei Streptococcus cremoris, wenn der pH-Wert während der Fermentation konstant gehalten wird. Eine Wiederholung der in der Literatur dargestellten, nicht-pH-statisierten Ausgangsfermentation von Lactobacillus confusus mit einem pH-Wert von 6.5 (Schütte et al., 1984) lieferte bei pH-Konstanthaltung und ansonsten gleichen Bedingungen ein 1.3-fach höheres Feuchtgewicht und vor allem eine 6-fach höhere L-Hic-DH-Volumenaktivität.

Aus diesem Grunde mußte auch für die zuvor beschriebenen Kolbenversuche eine Möglichkeit zur pH-Konstanthaltung gefunden werden. Die Zellen wuchsen im 1:20 verdünnten MRS-Medium mit 3 g Glucose/l wie bei den meisten Kolbenversuchen. Die Konstanthaltung des pH-Wertes erfolgte entweder durch Zupipettieren von 50 - 100 μl steriler 4N NaOH bei jeder Probenahme (alle 30 min) oder durch Pufferung des Mediums mit 3.0 % CaCO_3 . Eine noch höhere CaCO_3 -Konzentration hemmte in Vorversuchen das Wachstum und hätte eine noch höhere Schüttelgeschwindigkeit zur ausreichenden Durchmischung erfordert. Die Pufferung nur durch Kaliumphosphat alleine genügte nicht.

Wie in Abb. 21 ersichtlich fällt der pH-Wert ohne Konstanthaltung von pH 6.5 auf pH 3.7 ab. Diese Erniedrigung tritt im übrigen auch auf, wenn die Zellen im unverdünnten Medium wachsen. CaCO_3 vermag den pH-Wert über den Wachstumsverlauf nicht ganz konstant zu halten; gegen Ende der exponentiellen Phase sinkt er leicht ab. Wachsen die Zellen im unverdünnten Medium, so sinkt der pH-Wert sogar trotz Puf-

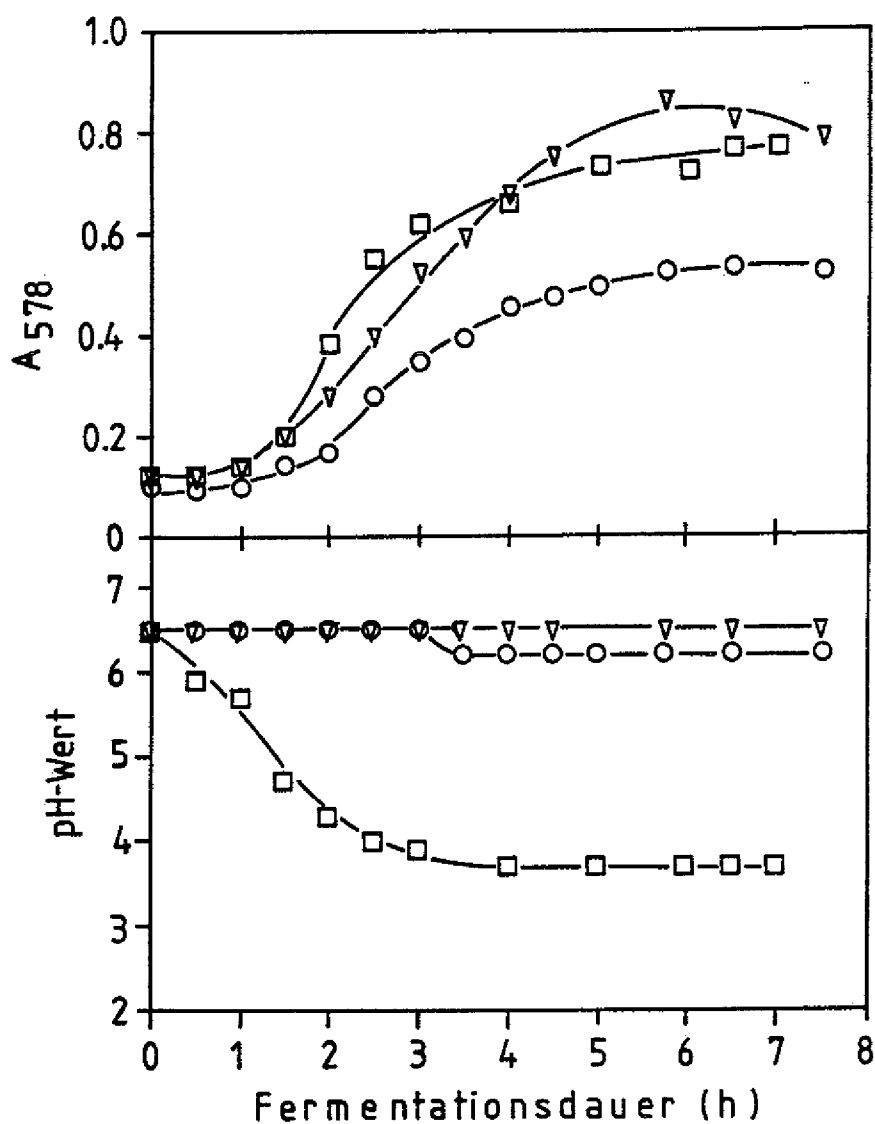


Abb. 21. Zellmasse und pH-Wert bei verschiedenen Pufferungsarten im Kolben: A_{578} und pH-Wert im Laufe des Wachstums in MRS-Medium nach deMan (1:20 verdünnt), pH 6.5, $T = 37^\circ\text{C}$, 150 upm; Mittelwerte aus 3 parallelen Ansätzen
 □: ungepuffert, ▽: mit 4N NaOH nachtitriert, ○: mit 3 % CaCO_3 gepuffert

ferung um 1.5 Einheiten. CaCO_3 scheint das Wachstum zu beeinflussen. Der maximale Ertrag liegt um 42 % niedriger als bei Titration. Die insgesamt niedrigeren A_{578} -Werte können auch von einer Veränderung der Zellgröße durch das Schäumen bei der Neutralisation mit HCl zum Auflösen des Carbonats herrühren. Die Zellen waren hiernach kleiner.

Gegenüber nicht-pH-statisierten Kolben liegt der Ertrag bei Titration um 9 % höher. Da die höchsten Erträge neben Konstanz des pH-Wertes bei Titration gewährleistet

waren, wurde dieses System für Kolbenversuche (Kap. 4.2.1.3, 4.2.1.4, 4.2.2.1, 4.2.2.2) verwendet.

Eine Überprüfung des Wachstumsoptimums im pH-statisierten Kolben mit 3 g Glucose/l ergab maximale Erträge und Wachstumsraten bei pH-Werten zwischen 6.8 und 7.0 (Abb. 22). Dies steht in Übereinstimmung mit Holzapfel und Kandler (1969). Zwischen pH 7 und pH 4.8 blieb der Ertrag weitgehend konstant. Hält man den pH-Wert im Laufe des Wachstums nicht konstant, sondern beobachtet die A_{578} in Abhängigkeit verschiedener Anfangs-pH-Werte, so ändert sich der Ertrag zwischen pH 4.8 und 6.5 deutlich. Aus den bereits in Kap. 4.2.1.4 beschriebenen Gründen wurden auch hier im Kolben nur die Zellmasse und nicht die Enzymaktivität betrachtet.

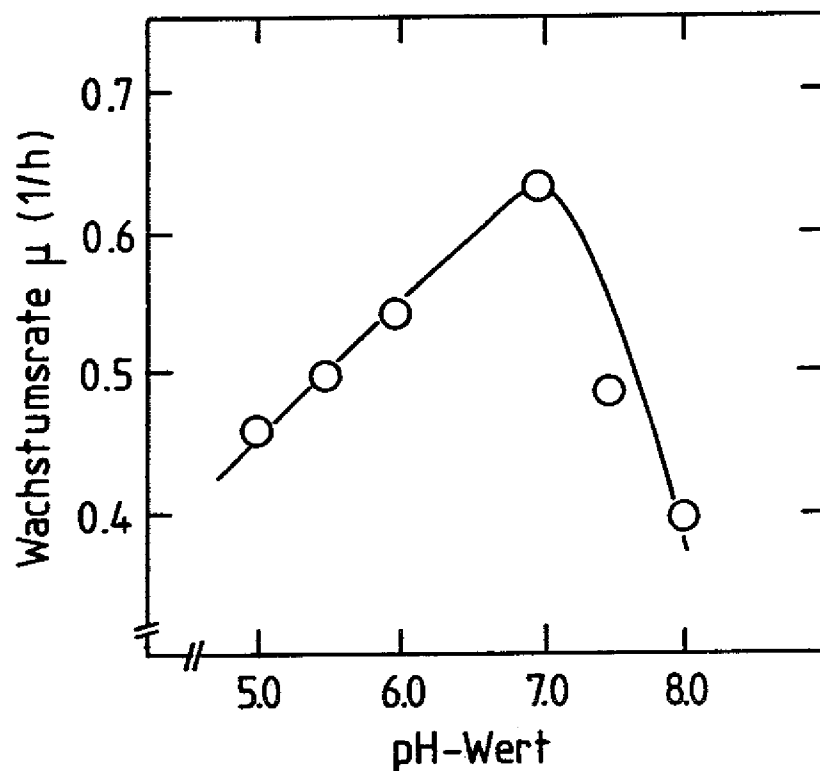
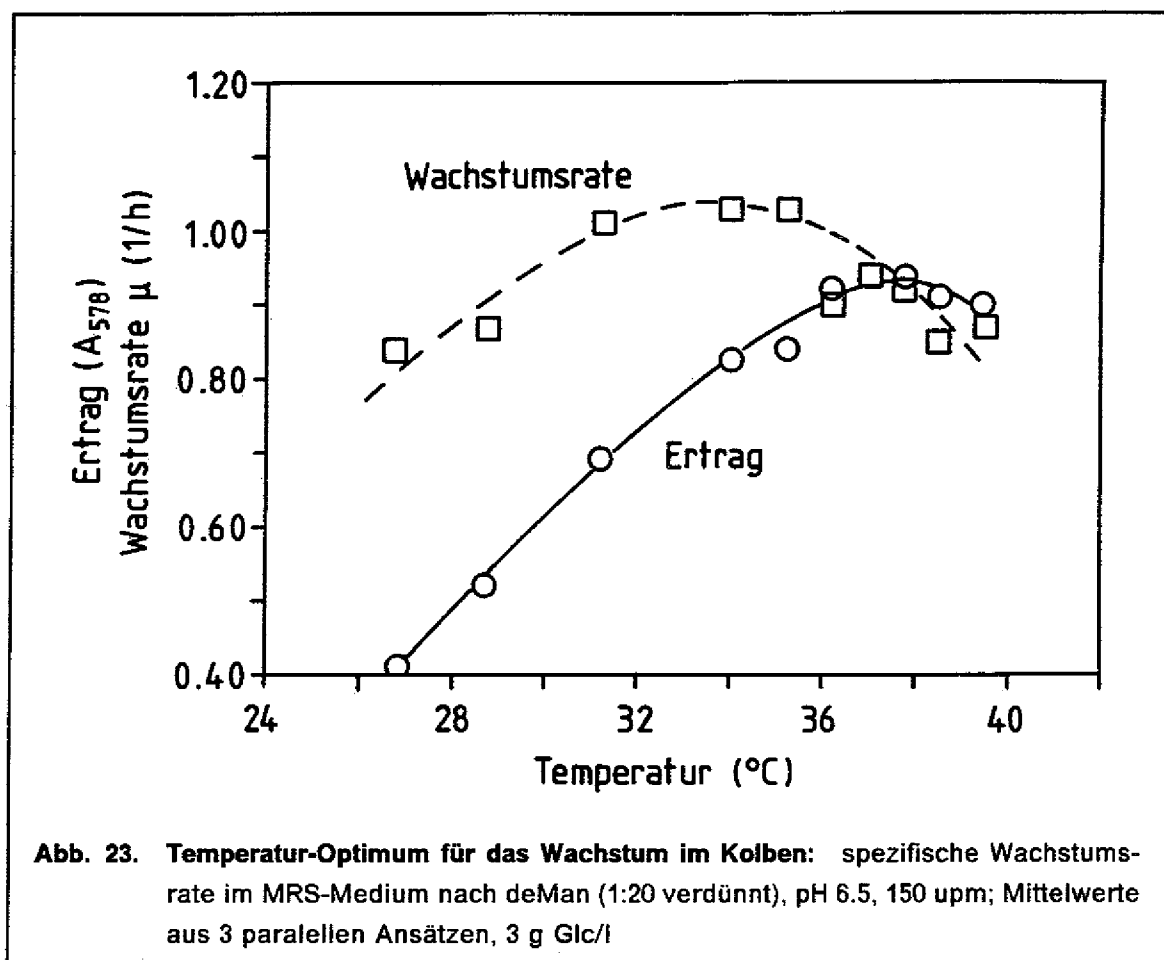


Abb. 22. pH-Optimum für das Wachstum im Kolben: Wachstums im MRS-Medium nach deMan (1:20 verdünnt), 3 g Glc/l, pH 6.5, $T = 37^\circ\text{C}$, 150 upm; Mittelwerte aus 3 parallelen Versuchen

4.2.2.2 Einfluß der Temperatur auf das Wachstum

Im gleichen System, wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben, wurde das Optimum für das Wachstum im Kolben bestimmt.

Wie Abb. 23 zeigt, ergaben sich maximale spezifische Wachstumsraten zwischen 32 °C und 36 °C, maximale Erträge aber zwischen 36 ° und 39 °C. Holzapfel und Kandler beschreiben ein etwas niedrigeres Wachstumsoptimum von 30 ° - 34 °C.



Ein Heraufsetzen der Temperatur im Fermenter von 30 ° C auf 37 °C führt zu einer Verkürzung der Anlaufphase um eine Stunde und zur Formveränderung der Zellen. Die Organismen werden kleiner, rund und neigen zur Kettenbildung.

4.2.2.3 Einfluß der Verdünnungsrate D auf Wachstum und Enzymaktivität

Da laut Herbert (1958) und Tempest et al. (1965) die Bakteriendichte im Chemostaten von der Konzentration des limitierenden Substrates im zufließenden Medium - wie auch in Gl. 2.15 ersichtlich - abhängt, wurde die Glucose-Konzentration im Reservoir von 18.2 g/l auf 58 g/l heraufgesetzt. Hiermit sollte eine höhere Bakteriendichte gegenüber einer kontinuierlichen Kultur mit der Standardkonzentration von 18.2 g/l erzielt werden. Die Kultur ist auch bei 58 g/l noch als C-limitiert anzusehen, da die Bakteriendichte bei einer noch höheren Glucose-Reservoirkonzentration von 72.7 g/l bei $D = 0.3 - 0.5 \text{ h}^{-1}$ um etwa ein Drittel größer war. Und auch die Erniedrigung der

Reservoirkonzentration von 58 g/l auf 18.2 g/l setzte die Bakteriendichte bei $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$ um 2/3 herab. Insofern entspricht das Wachstumsverhalten den Kriterien für das Vorliegen einer Limitierung in kontinuierlicher Kultur.

Für die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ war in Kap 4.2.1.2 ein Wert von 1.09 h^{-1} bei pH 6.8 festgestellt worden, der bei pH 6.5 eventuell noch etwas niedriger liegt (Abb. 22). Die minimale spezifische Wachstumsrate liegt bei optimalen Kulturbedingungen noch unter $0.05 \times \mu_{\max}$ (Tempest et al., 1967). Daher wurde die Durchflußrate zwischen 0.05 und, um ein Auswaschen zu vermeiden, nur bis 0.8 h^{-1} variiert.

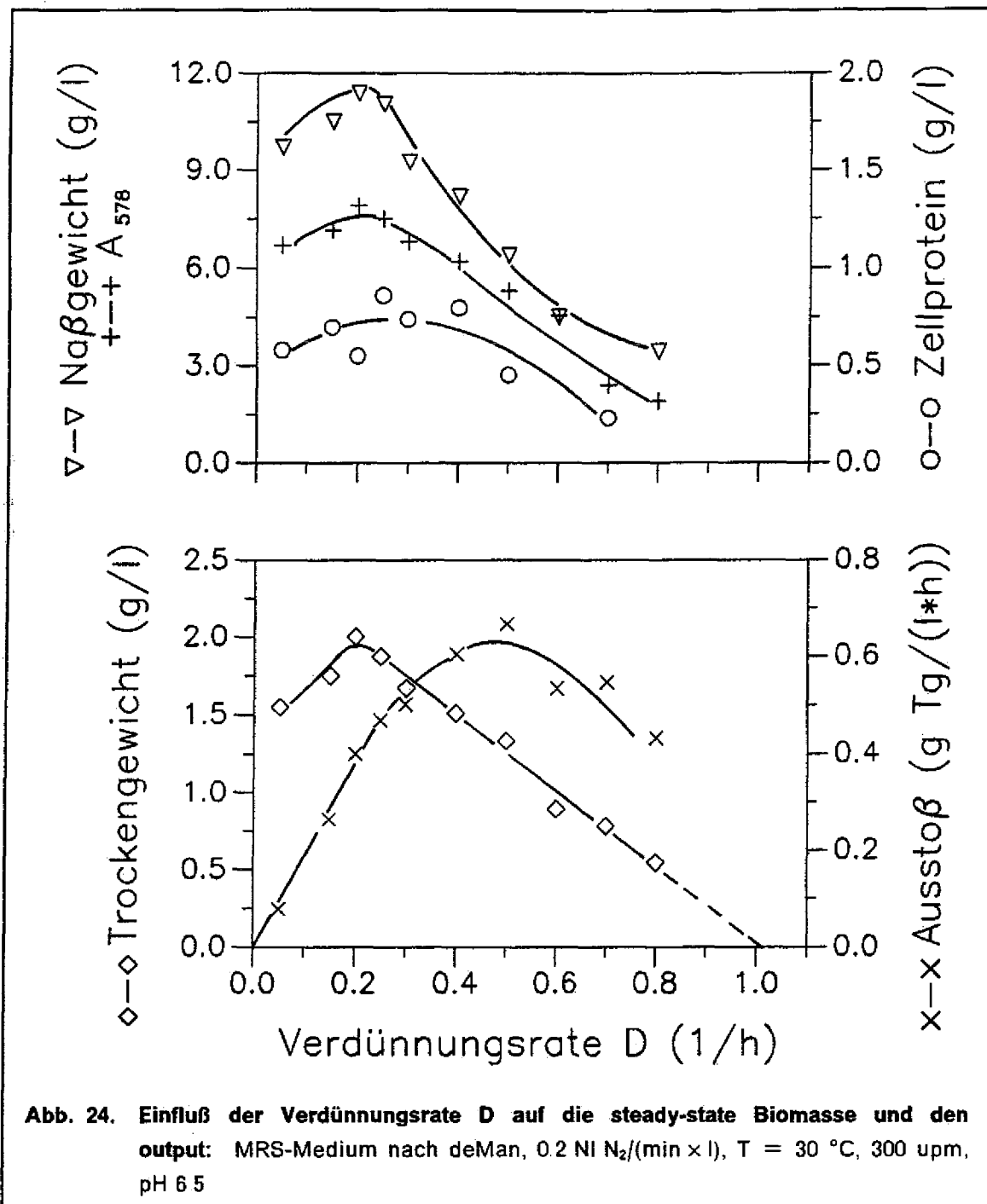
Das Verhalten der Biomasse bei verschiedenen Verdünnungsraten wurde anhand der Messung des Trocken-, Naßgewichts, der A_{578} und des Gesamtzellproteins bestimmt (Abb. 24). Alle Wachstumsparameter zeigen ausgehend von niedrigen Verdünnungsraten einen starken Anstieg zu höheren Raten hin. Sie erreichen ihre Maximalwerte von 11.4 g Naßgewicht, 2 g Trockengewicht, 0.83 g Gesamtzellprotein pro l Kultur und einer $A_{578} = 7.9$ bei $D = 0.2 - 0.25 \text{ h}^{-1}$. Bei weiter zunehmenden Verdünnungsraten fällt die Biomasse langsam ab. Dies steht im Gegensatz zur Theorie der kontinuierlichen Kultur (Herbert et al., 1956), nach der die Biomasse über einen weiten Bereich konstant bleibt, um dann bei einer kritischen Verdünnungsrate stark abzunehmen. Das Naßgewicht nimmt hier stärker als die A_{578} und diese wiederum stärker als das Trockengewicht ab. Abb. 24 weist bei Extrapolation des Trockengewichts auf eine maximale Verdünnungsrate für das Wachstum von $D = 1.0 \text{ h}^{-1}$ hin. Im Gegensatz zur Verdünnungsrate von $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ mit maximalem Trockengewicht erreicht der Bakterienausstoß, also die pro Zeiteinheit gebildete Biomasse, ihr Maximum bei $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$.

Der Anteil des Zellproteins an der Gesamtzellmasse, dem Trockengewicht, bleibt nicht über alle Verdünnungsraten konstant. Allerdings weist der Zellproteinanteil an der Gesamtbiomasse nicht den leichten Abfall von 2 - 3 % mit steigenden Verdünnungsraten wie von Herbert et al. (1958) beschrieben auf. Der Anteil des Zellproteins an der Biomasse ändert sich in Form einer ansteigenden und wieder abfallenden Kurve wie die Wachstumsparameter selbst. Also kommt es vor allem beim Maximum der Biomasse zu einem erhöhten Anteil des Zellproteins an der Biomasse.

Betrachtet man den Verlauf der L-Hic-DH-Volumenaktivität, kann man einen ähnlichen Verlauf wie beim Trockengewicht beobachten (Abb. 25).

Den maximalen Wert von 391 U/l zeigen die Bakterien jedoch bei einer etwas höheren Verdünnungsrate von $D = 0.25 - 0.3 \text{ h}^{-1}$ als im Vergleich zum Trockengewicht (bei $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$). Parallelfementationen wichen zum Teil stark voneinander ab.

Pro Stunde können maximal 143 U bei $D = 0.4 - 0.5 \text{ h}^{-1}$ produziert werden. Bei der maximalen Produktivität für die Volumenaktivität werden nur 60 % der Glucose verbraucht (Abb. 27).



Die auf das Protein im Rohextrakt bezogenen Aktivitäten schwankten so stark, daß sie nicht für eine Beurteilung des Verhaltens der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate D herangezogen werden konnten.

Abb. 25 zeigt im unteren Teil auch die auf das Trockengewicht bezogene spezifische Aktivität (U/g Tg). Zwischen $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0.8 \text{ h}^{-1}$ bleibt diese weitgehend konstant, während sie bei niedrigen Verdünnungsraten von dem mittleren Wert von 221 U/g Tg abweicht. Offensichtlich steigt die Biomasse von $D = 0.05 - 0.3 \text{ h}^{-1}$ stär-

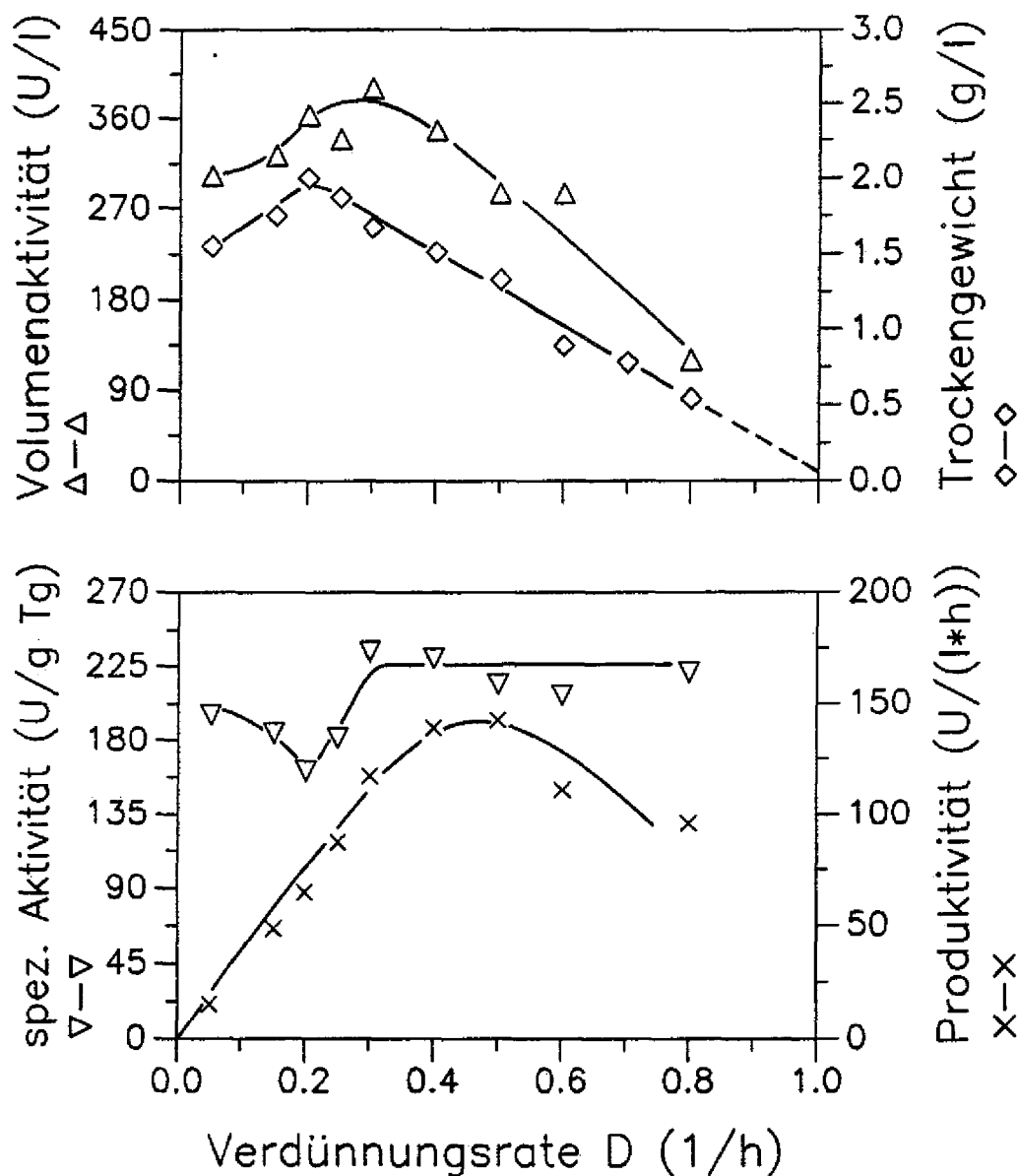


Abb. 25. Einfluß der Verdünnungsrate D auf die L-Hic-DH-Aktivität: MRS-Medium nach deMan, $0.2 \text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$, $T = 30^\circ \text{C}$, 300 upm, pH 6.5

ker als die Volumenaktivität an, was sich in einer abnehmenden spezifischen Aktivität (U/g TG) bemerkbar macht. Dieses Verhalten ist im Zusammenhang mit der Frage, ob das Enzym wachstumsgekoppelt auftritt, besonders interessant. Die Korrelation der Trockengewichts- mit den Volumenaktivitätswerten (Einzelwerte) in Abb. 26 bestätigt wie auch Abb. 25, daß die L-Hic-DH-Aktivität sehr gut mit dem Wachstum gekoppelt ist, solange die Verdünnungsraten mehr als $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ betragen. Der Korrelationskoeffizient für diese Werte, die mit Kreisen in der Abbildung symbolisiert sind, beträgt $r = 0.9877$. Alle übrigen, bei $D \leq 0.3 \text{ h}^{-1}$ gemessenen Aktivitäten (qua-

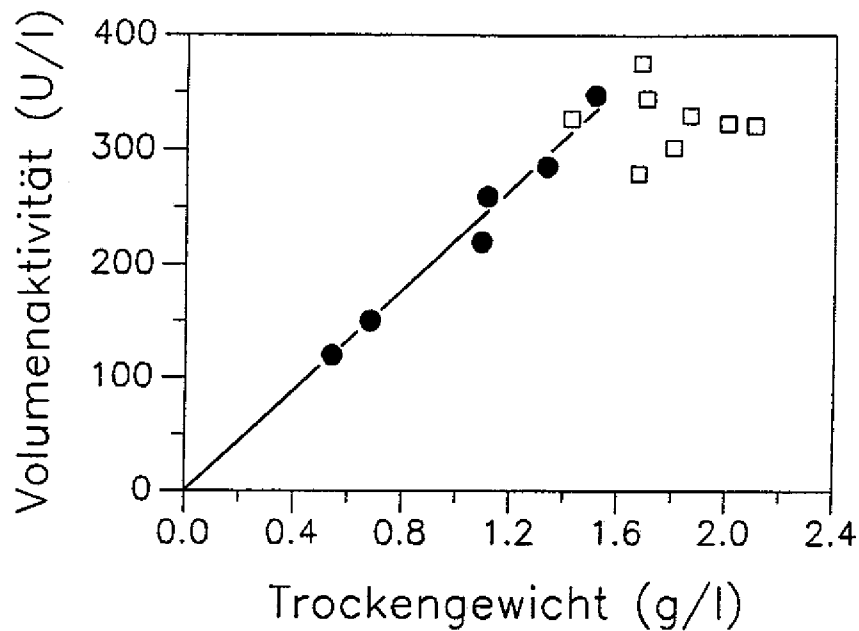


Abb. 26. Korrelation von L-Hic-DH-Aktivität und Trockengewicht in kontinuierlicher Kultur: MRS-Medium nach deMan, $T = 30^\circ \text{C}$, 300 upm, $0.2 \text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$, pH 6.5; $\bullet$: Aktivitäten bei $D > 0.3 \text{ h}^{-1}$; $\square$: Aktivitäten bei $D \leq 0.3 \text{ h}^{-1}$

drastische Symbole), weichen von dieser Beziehung ab. Ein gleiches Verhalten ergab sich auch für die A_{578} .

4.2.2.4 Einfluß der Verdünnungsrate D auf Zuckeraufnahme und Produktbildung

Lactobacillus confusus bildet im MRS-Medium bei leichter Stickstoffbegasung zusätzlich zu dem im Medium vorhandenen Acetat (61 mmol/l) kein weiteres Acetat. Ethanol entsteht genausoviel wie Lactat. Abb. 27 zeigt die steady state Konzentrationen von Lactat und Glucose im Kulturüberstand.

Ab Verdünnungsraten von 0.25 h^{-1} beginnt die Rest-Glucose-Konzentration $\bar{s}$ im Kulturüberstand zu steigen. Dies steht wiederum im Gegensatz zur Theorie der kontinuierlichen Kultur (Abb. 3), nach der die Rest-Glucose-Konzentration im Überstand erst nahe der Verdünnungsrate mit maximalem Bakterienausstoß zu steigen beginnt. Diese Rate wäre hier 0.5 h^{-1} .

Bei $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ wird die gesamte Glucose (58 g/l) zu Lactat (28.3 g/l) umgewandelt. Die Produktionsraten (g Lactat pro g gebildetem Trockengewicht) erreichen wie die Raten für die L-Hic-DH-Volumenaktivität bei $D = 0.4 - 0.5 \text{ h}^{-1}$ ihr Maximum von $10.4 \text{ g}/(\text{l} \times \text{h})$.

Orientiert man sich an dem in Abb. 24 für die maximale Wachstumsrate extrapolierten Wert von circa 1.0 h^{-1} , so müßte die Substratkonzentration K_s , bei der die halbmaxi-

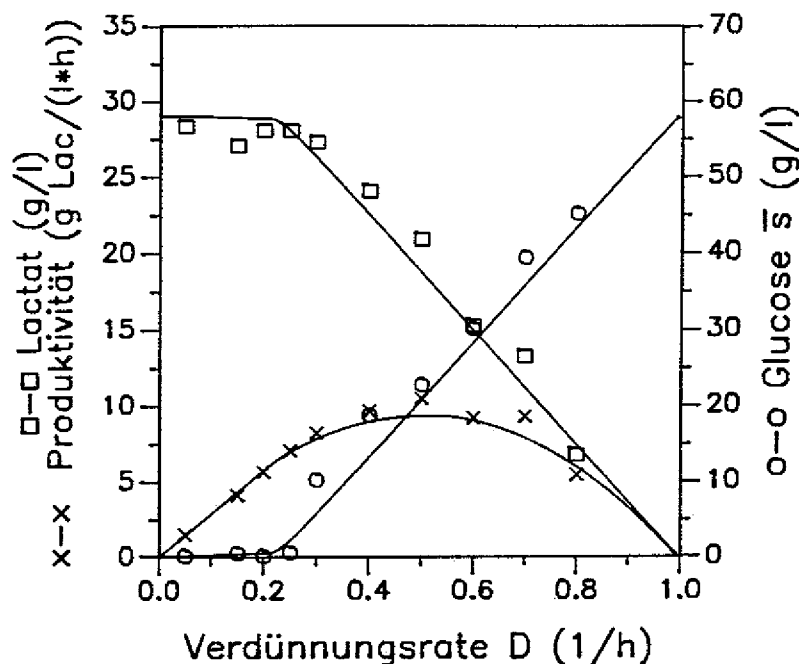


Abb. 27. Einfluß der Verdünnungsrate D auf steady-state- Konzentrationen von Glucose, Lactat und den Lactat-Output: MRS-Medium nach deMan, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6.5, 300 upm, $0.2\text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$; Die Kurven entsprechen den im nächsten Kapitel errechneten Werten.

male Wachstumsrate erreicht wird, bei circa 25 g/l, entsprechend 125 mM liegen. Dieser Wert liegt entscheidend höher als die für K_s -Werte im Bereich von $10^{-5} - 10^{-8}\text{ M}$ (1.82 - 18.2 mg Glc/l) geforderten Substratkonzentrationen (Fiechter, 1981).

4.2.2.5 Wachstumskinetik von Lactobacillus confusus (Optimieren nach einem mathematischen Modell)

Abb. 24 und Abb. 27 belegen ein von der herkömmlichen Monod-Kinetik (Gl. 2.6) abweichendes Verhalten von Lactobacillus confusus in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate. Laut Herbert et al. (1956; vergl. Abb. 3) wird der Anstieg des Restsubstrates erst nach Erreichen des maximalen Bakterienausstoßes und eine weitgehende Biomassekonstanz bei höheren Verdünnungsraten erwartet. Daher wurde nach einem veränderten Kinetikmodell gesucht, welches das Verhalten des Organismus in kontinuierlicher Kultur korrekt beschreibt. Ein solches mathematisches Modell ist wichtig für die Prozeßoptimierung, da organismen- und medien-spezifische Modellparameter mit seiner Hilfe bestimmt werden können. Zu diesen Parametern gehören in Gl. 2.6 z.B. die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$ (1/h) und die Sättigungskonstante K_s (g/l), bei der die halbmaximale Wachstumsgeschwindigkeit

erreicht wird. K_s -Werte entscheiden beispielsweise in kontinuierlicher Kultur weitgehend über die Menge des limitierenden Substrates, die unverbraucht im Kulturüberstand verbleibt (Owens, 1987). Bei der Optimierung von Starterkulturen, die häufig Mischkulturen sind, kann die Kenntnis der individuellen Modellparameter für die Auswahl geeigneter Kulturbedingungen hilfreich sein.

Die Wachstumsrate μ eines Organismus kann durch verschiedene Einflüsse wie eine Substrataufnahme für den zellinternen Erhaltungsstoffwechsel oder Inhibitionen durch zu hohe Substratkonzentrationen oder zu hohe Produktkonzentrationen im Kulturüberstand herabgesetzt sein. Nachfolgend werden diese Einflüsse näher besprochen. Die herkömmliche Monod-Kinetik, in der die Wachstumsrate nur von der Konzentration des limitierenden Substrates $\bar{s}$ im Überstand abhängt, wurde um Terme erweitert, die einige der eben genannten Einflüsse umfassen (Gl. 4.3, 4.4, 4.6). Die Modellparameter in diesen veränderten Kinetiken wurden mit Hilfe des Simplex-Algorithmus nach Nelder und Mead (1965) in der Ausführung nach Caceci und Cacheris (1984) an die steady-state-Meßwerte für Substrat und Produkt im Überstand angepaßt. Die Zielfunktion war die minimale Fehlerquadratsumme zwischen den gemessenen und den nach den Modellen errechneten Werten.

Das von Pirt (1965) entwickelte Konzept der "maintenance energy" trägt wesentlich zum Verständnis der Energiebedürfnisse für das Wachstum eines Mikroorganismus bei. Die spezifische Aufnahmerate q_s für die Energiequelle setzt sich aus zwei Teilen zusammen: erstens der Aufnahmerate für wachstumsgebundene Prozesse und zweitens dem Energieverbrauch für wachstumsunabhängige Prozesse (Pirt, 1975). Dabei dient der auch bei Nullwachstum aufgenommene Betrag der Energiequelle m_s zur Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten gegenüber dem Außenmilieu, von zellinternen turn-over-Vorgängen und von Bewegungsvorgängen (Pirt, 1975). Der übrige Betrag wird für die Biomassebildung benötigt. Dieser Zusammenhang ist in der folgenden Gleichung (Pirt, 1975) ausgedrückt.

$$q_s = \frac{1}{Y_{0(s)}} \mu + m_s \quad (4.1)$$

In dieser Gleichung stellt μ die Wachstumsrate in 1/h und m_s den Erhaltungsstoffwechselkoeffizienten für das Substrat in g Glc_{aufg}/(g Tg_{geb} × h) dar. $Y_{0(s)}$ ist als der maximale Ertragskoeffizient in g Tg_{geb}/g Glc_{aufg} zu verstehen, der erreicht würde, wenn die Zellen keinen Energieaufwand für den Erhaltungsstoffwechsel hätten. Im Kehrwert dieses Ertragskoeffizienten drückt sich gewissermaßen die Proportionalitätskonstante der Beziehung zwischen Aufnahme- und Wachstumsrate aus, wenn kein Erhaltungsstoffwechsel bestünde. q_s ist die spezifische Aufnahmerate für die Energiequelle in g Glc_{aufg}/(g Tg_{geb} × h). Sie wurde für die jeweiligen Verdünnungsraten aus den Meßwerten für Biomasse und Glucose im Kulturüberstand

berechnet. In C-limitierten Kulturen von Milchsäurebakterien dienen 97 - 99 % des aufgenommenen Zuckers als Energiequelle (Stouthamer, 1965).

In analoger Weise läßt sich auch die Produktbildungsrate beschreiben, da die Produktbildung laut Luedeking und Piret (1959) auch aus einem wachstumsgebundenem und einem wachstumsunabhängigen Teil zusammengesetzt ist.

$$q_P = \frac{1}{Y_{O(P)}} \mu + m_P \quad (4.2)$$

Hier stehen q_P für die spezifische Produktbildungsrate in $\text{g Lac}_{\text{geb}}/(\text{h} \times \text{Tg}_{\text{geb}})$, $Y_{O(P)}$ für den maximalen Ertragskoeffizienten, bezogen auf das Produkt in $\text{g Tg}_{\text{geb}}/\text{g Lac}_{\text{geb}}$, und m_P für den Erhaltungsstoffwechselkoeffizienten, bezogen auf das Produkt in $\text{g Lac}_{\text{geb}}/(\text{g Tg}_{\text{geb}} \times \text{h})$. q_P wurde aus den Meßwerten für Biomasse und Lactat berechnet. Die Auftragung der spezifischen Substrataufnahmeraten und Produktbildungs-raten gegen die Wachstumsrate - im steady state der kontinuierlichen Kultur der Verdünnungsrate entsprechend - folgt einer Gerade. Aus deren Steigung geht der Kehrwert des maximalen Ertragskoeffizienten y_0 und aus dem y-Achsenabschnitt der Erhaltungsstoffwechselkoeffizient m hervor. Wenn der Anteil für Maintenance-Zwecke hoch ist, so kann dies besonders bei niedrigen Wachstumsraten im Fermenter zu einer Verminderung des Substratanteils, der für die Biomassebildung zur Verfügung steht, führen und somit ein Absinken der Biomasse zu niedrigen Verdünnungsraten hin bewirken. Hier könnte eine Ursache einer Herabsetzung der theoretisch möglichen Wachstumsrate zu suchen sein. Aus den Einzeldaten aller Parallelfementationen ergaben sich durch die erwähnte Auftragung der Produktbildungs- und der Substrataufnahmeraten folgende Koeffizienten durch lineare Regression erster Ordnung:

$$Y_{O(S)} = 3.9 \times 10^{-2} \text{ g Tg}_{\text{geb}}/\text{g Glc}_{\text{aufg}} \text{ (maximaler Ertragskoeffizient für Glucose)}$$

$$Y_{O(P)} = 6.82 \times 10^{-2} \text{ g Tg}_{\text{geb}}/\text{g Lac}_{\text{geb}} \text{ (maximaler Ertragskoeffizient für Lactat)}$$

$$m_S = 0.796 \pm 0.623 \text{ g Glc}_{\text{aufg}}/(\text{g Tg}_{\text{geb}} \times \text{h}) \text{ (Erhaltungsstoffwechselkoeffizient für Glucose)}$$

$$m_P = 0.164 \pm 0.21 \text{ g Lac}_{\text{geb}}/(\text{g Tg}_{\text{geb}} \times \text{h}) \text{ (Erhaltungsstoffwechselkoeffizient für Lactat)}$$

Wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, kann der Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt werden, da die Abweichungen der Koeffizienten m_S und m_P sehr groß, im Falle von m_P sogar größer als der eigentliche Wert sind. Trotz guter Korrelationskoeffizienten für die Substrataufnahmeraten bzw. die Produktbildungs-raten ($r = 0.9727$ bzw. $r = 0.9709$ für Glucose bzw. für Lactat) wirken sich hier offensichtlich große Abweichungen in Glucose-, Lactat- und Trockengewichtswerten zwischen Parallelfementationen aus.

Gleichung 4.1 und 4.2 vereinfachen sich damit zu

$$q_S = \frac{1}{y_{O(S)}} \mu \quad (4.1b)$$

$$q_P = \frac{1}{y_{O(P)}} \mu \quad (4.2b)$$

Eine andere Ursache einer Verminderung der theoretisch möglichen Wachstumsrate könnten zu hohe Substratkonzentrationen im Kulturüberstand sein, die vor allem bei hohen Verdünnungsraten infolge des Anstieges des Restsubstrates auftreten und dadurch zu einem Absinken der Biomasse zu höheren Verdünnungsraten hin beitragen. Die Einführung eines Substratinhibierungstermes analog zur Substratinhibierung enzymatischer Reaktionen nach Haldane, so wie sie von Andrews (1968) beschrieben wurde, führte jedoch nicht zu einer verbesserten Anpassung der Modellparameter an die Glucose-Meßwerte im Modell Gl. 4.3.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\bar{s}}{\bar{s} + K_s + \frac{\bar{s}^2}{K_i}} \quad (4.3)$$

Für die Substratinhibierungskonstante K_i wurden vom Fitalgorithmus immer so große Werte vorgeschlagen, daß das Modell in die übliche Monod-Kinetik (Gl. 2.6) übergeht, da $\bar{s}^2/K_i$ gegen 0 strebt. Von einer Substratinhibierung ist also nicht auszugehen. Die Wachstumsrate μ (entsprechend D), gegen die Restsubstratkonzentration aufgetragen (Abb. 29), hätte im Falle einer Substratinhibition zunächst ansteigen und dann zu hohen Verdünnungsraten hin wieder absinken müssen.

Zu hohe Produktkonzentrationen kommen als dritte Ursache einer Wachstumsratenverminderung in Frage. Da das Vorkommen einer Produktinhibition durch die Endprodukte des Gärungsstoffwechsels bei Milchsäurebakterien bekannt ist (Luedecking und Piret, 1959; Friedmann und Gaden, 1970; Pirt, 1975; Herrero, 1983 usw.), wurde ein Produktinhibitionsterm in Gl. 2.6 eingeführt (Gl. 4.4). Dieser Inhibitionsterm nach Levenspiel (1980) kann im Gegensatz zum Hemmterm einer nicht kompetitiven Hemmung, wie er von Aiba et al. (1968), Novak et al. (1981) bzw. Rogers et al. (1978) und de Raucourt et al. (1989a,b) auf die alkoholische bzw. Milchsäuregärung angewendet wurde, verschiedenste Verläufe des Produktes in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate ausdrücken (Luong, 1985). Park et al. (1990) und von Eysmond et al. (1990) verwendeten den nachstehenden Hemmterm nach Levenspiel, um eine Inhibition durch Acetat zu erfassen.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\bar{s}}{K_s + \bar{s}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \quad (4.4)$$

In dieser Gleichung bedeutet P die aktuelle Produktkonzentration. Hier wurde die Konzentration des Lactats, welches in gleichgroßen Mengen wie Ethanol gebildet wurde, eingesetzt. $P_{\max}$ ist demzufolge nicht als die maximale Produktkonzentration zu verstehen, ab der kein Wachstum mehr möglich ist sondern als die Lactat-Konzentration, die in Zusammenwirken mit der gleichen Ethanol-Konzentration das Wachstum unterbindet. Der Hemmkoeffizient n ist dementsprechend ein Mischkoeffizient, der die Hemmwirkung von Lactat und Ethanol erfaßt. Eine Acetat-Bildung alternativ zur Ethanol-Bildung war nicht aufgetreten. Für $n > 1$ nimmt der Verlauf der Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate D eine konvexe, nach oben gebogene Kurve und bei $n = 1$ eine Gerade an. Für $n < 1$ geht die Gerade in eine nach unten geöffnete, konkave Kurve in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate D über (Luong, 1985).

Abb. 28 zeigt, daß aus der aufgenommenen Glucose in äquimolaren Mengen Lactat gebildet wird.

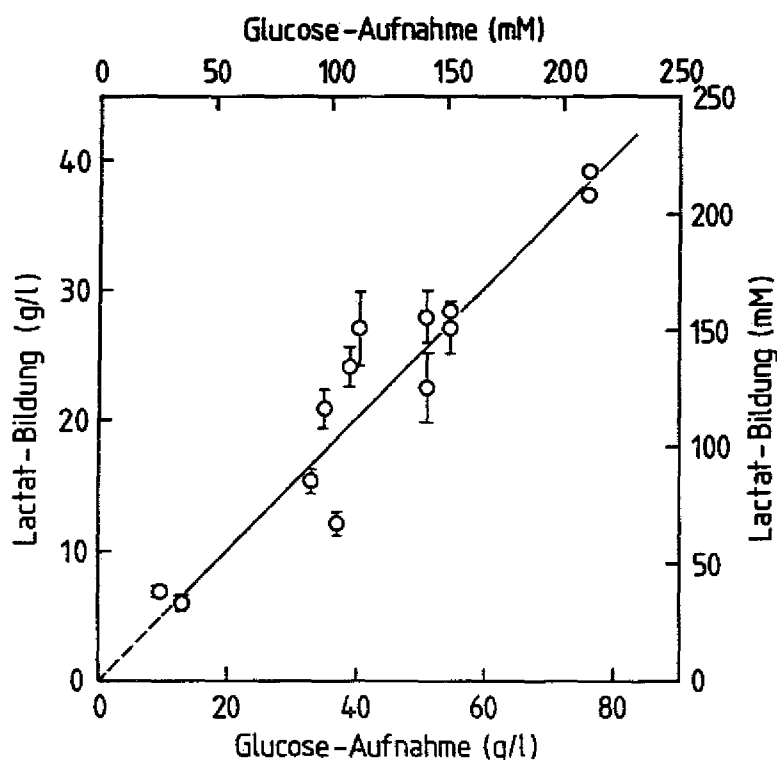


Abb. 28. Korrelation der Lactat-Bildung mit der Glucose-Aufnahme: MRS-Medium nach deMan, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 upm, pH 6.5, $0.2\text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$; Einzelwerte aus Parallel-Fermentationen mit verschiedenen Reservoir-Glucose-Konzentrationen; Korrelationskoeffizient $r = 0.9506$

Bezieht man Aufnahme und Bildung auf g/l so gilt aufgrund dieser Korrelation:

$$2P = (S_R - \bar{s}) \quad \text{in g/l} \quad (4.5)$$

Diese Beziehung läßt eine wesentliche Vereinfachung von Gl. 4.4 zu, denn die Produktwerte können nun durch Substratwerte ausgedrückt werden, und die Wachstumsrate μ hängt nur noch von einer Variablen ($\bar{s}$) und nicht mehr von zwei Variablen ab:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\bar{s}}{K_s + \bar{s}} \left(1 - \frac{(S_R - \bar{s})}{S_{\max}} \right)^n \quad (4.6)$$

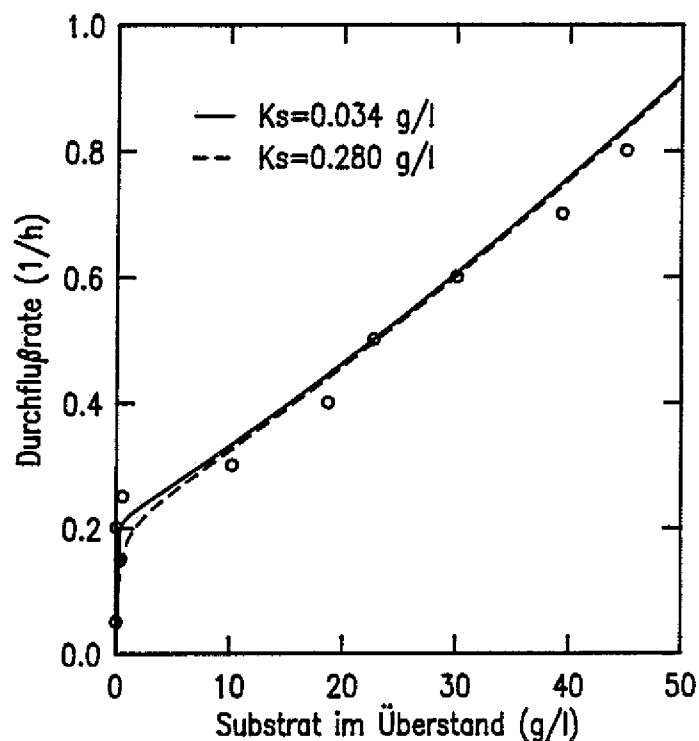


Abb. 29. Wachstumsrate in Abhängigkeit vom Restsubstrat (a): Kreise: Meßwerte für Glucose im Überstand, Kurve: nach Modell 4.6 mit zwei verschiedenen K_s -Werten errechnet; Die Verdünnungsrate entspricht der Wachstumsrate des Organismus in kontinuierlicher Kultur unter steady-state-Bedingungen; MRS-Medium nach deMan, $T = 30^\circ\text{C}$, 300 upm, pH 6.5, 0.2 NI $\text{N}_2/(\text{min} \times \text{l})$

Unter allen gefitteten Gleichungen (2.6, 4.3, 4.4, 4.6) ergab die Anpassung der Modellparameter in Gl. 4.6 die geringste Abweichung der errechneten Werte von den gemessenen. Die ermittelten Modellparameter $\mu_{\max}$, n , S_R und $S_{\max}$ waren denen mit Hilfe von Gl. 4.4 bestimmten annähernd gleich. $S_{\max}$ wies, wie erwartet, einen doppelt so großen Wert (in g/l) auf. Diese Substratkonzentration entspricht nun der Konzen-

tration an Glucose, die zu Lactat und Ethanol umgesetzt, das Wachstum unterbindet. Der einzige Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Modelle bestand in den K_s -Werten, bei Gl. 4.4: 0.28 g Glc/l und bei Gl. 4.6: 0.035 g Glc/l.

Trägt man die Verdünnungsraten gegen die gemessenen Restsubstratwerte einschließlich der nach Gl. 4.6 mit den Modellparametern errechneten Kurven auf, so erkennt man, daß die Meßwerte sehr gut durch das Modell beschrieben werden (Abb. 29). Die beiden unterschiedlichen K_s -Werte beeinflussen den Verlauf des Restsubstrates bei hohen Verdünnungsraten nicht. Die Auswirkung des K_s -Wertes zeigt sich erst bei niedrigen Verdünnungsraten (Abb. 29).

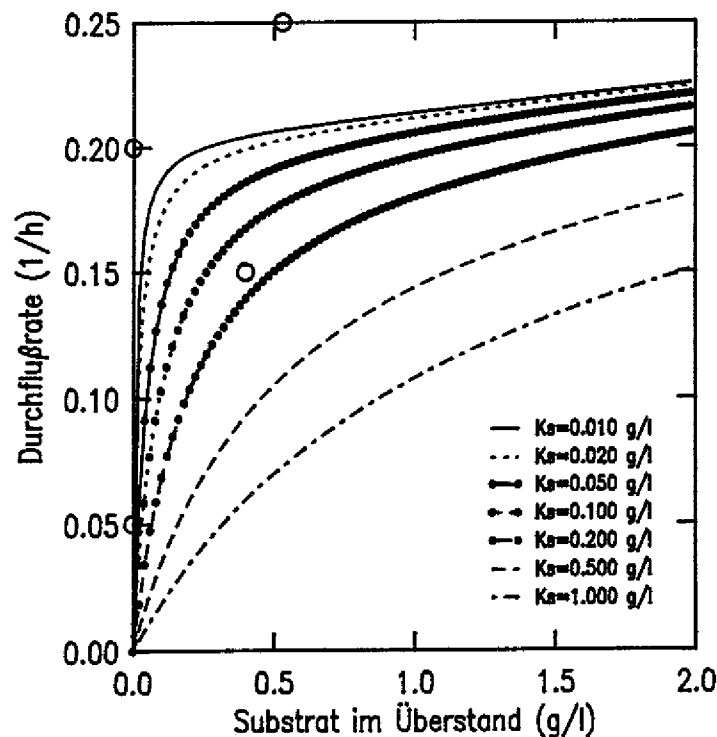


Abb. 30. Wachstumsrate in Abhängigkeit vom Restsubstrat (b): Ausschnitt für niedrige Verdünnungsraten; Kreise: Meßwerte für Glucose im Überstand, Kurve: nach Modell 4.6 mit verschiedenen K_s -Werten errechnet; MRS-Medium nach deMan, $T = 30^\circ \text{C}$, 300 upm, pH 6.5, 0.2 NI $\text{N}_2/(\text{min} \times \text{l})$;

Eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 29 in Abb. 30 zeigt den Effekt unterschiedlicher K_s -Werte bei niedrigen Verdünnungsraten. In dieser Abbildung sind die Verläufe der Wachstumsrate (Verdünnungsrate) mit den gleichen Meßwerten wie in Abb. 29 für verschiedene K_s -Werte simuliert. Im Bereich niedriger Glucose-Konzentrationen entscheidet der K_s -Wert über die Verdünnungsrate, ab der das Restsubstrat zu steigen beginnt. Ebenfalls aus dieser Abbildung geht hervor, daß die Höhe der Sättigungskonstante vor allem durch Glucose-Werte unterhalb von 0.1 g/l

bestimmt wird. Hier ist aber nicht mehr mit einer ausreichenden Meßgenauigkeit des Glucose-UV-Bestimmungstestes zu rechnen. Zusätzlich weist der Zuckergehalt von Parallelproben aus dem Fermenter Schwankungen oberhalb von 10 % auf. Diese beiden Tatsachen mögen zu den unterschiedlichen nach Gl. 4.4 und 4.6 ermittelten K_s -Werten beitragen. Für die Beschreibung der Substratwerte schon ab Verdünnungsraten oberhalb von $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ ist dieser Unterschied jedoch unerheblich.

Da aber durch ein Kinetikmodell (Gl. 4.6) sowohl die Substrat- als auch die Produktwerte gut beschrieben werden müssen, um dem Modell eine Allgemeingültigkeit zu verleihen, wurde eine erneute Kurvenanpassung durchgeführt, diesmal sowohl an die Substrat-Werte als auch an die Produktwerte. Dabei wurden die Lactat-Werte über Gl. 4.5 als Substratwerte ausgedrückt. Wie erwartet blieben die Modellparameter außer dem K_s -Wert gleich, dieser lag nun mit 0.049 g/l zwischen den beiden zuvor ermittelten Werten. Die mit dieser Substratsättigungskonstante errechneten Verläufe für die Rest-Glucose und das gebildete Lactat im Überstand sowie die Lactat-Produktivität beschreiben die Meßwerte, wie in Abb. 27 ersichtlich, gut. Abb. 27 verdeutlicht also den "besten Fit" für Substrat- und Produktwerte. In Abb. 29, mit dem "besten Fit" nur für die Substratwerte, sind die Glucose-Werte natürlich etwas besser getroffen als im "Gesamt-Fit" in Abb. 27.

Abschließend ist das Modell mit den zugehörigen Bilanzgleichungen und den Modellparametern aus der besten Anpassung an Substrat- und Produktwerte dargestellt. Das Modell ist unter der Voraussetzung gültig, daß Lactat und Ethanol in äquimolaren Mengen und kein Acetat entstehen und daß die Konzentration der aufgenommenen Glucose der des gebildeten Lactats entspricht (mM). Beim Übergang zu anderen Kulturbedingungen und Nährmedien müßten die Modellparameter neu bestimmt werden.

Kinetik-Modell für Lactobacillus confusus

$$\frac{dx}{dt} = -Dx + \mu x \quad (4.7)$$

$$\frac{d\bar{s}}{dt} = D(S_R - \bar{s}) - q_s x \quad (4.8)$$

$$\frac{dP}{dt} = -0.5 D(S_R - \bar{s}) + q_p x \quad (4.9)$$

$$\text{mit } \mu = \mu_{\max} \frac{\bar{s}}{K_s + \bar{s}} \left(1 - \frac{(S_R - \bar{s})}{S_{\max}}\right)^n \quad (4.6)$$

$$\text{und } 2P = (S_R - \bar{s}) \quad \text{in g/l} \quad (4.5)$$

$$\text{und } q_s = \frac{1}{y_{0(S)}} \mu; \quad q_p = \frac{1}{y_{0(P)}} \mu \quad (4.1a,b)$$

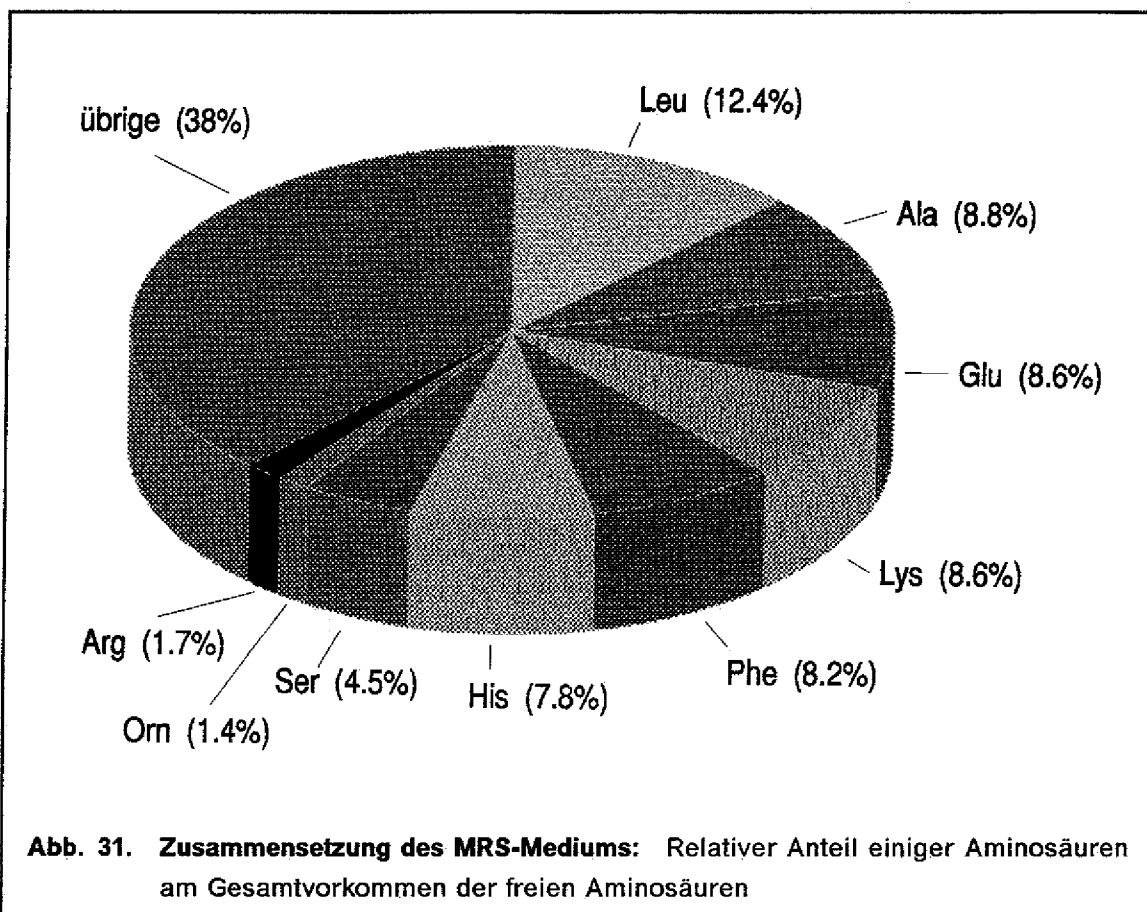
mit Modellparametern

$\mu_{\max}$	0.996 h ⁻¹	maximale Wachstumsrate
K_s	0.049 g/l	Sättigungskonstante für Glucose
S_R	58 g/l	Substratkonzentration im Reservoir
$S_{\max}$	74.91 g/l	maximal umsetzbare Substratkonzentration
n	0.995 g/l	Hemmkoeffizient
$Y_{0(S)}$	3.9×10^{-2} g Tg _{geb} /g Glc _{aufg}	max. Ertragskoeffizient für Glucose
$Y_{0(P)}$	6.82×10^{-2} g Tg _{geb} /g Lac _{geb}	max. Ertragskoeffizient für Lactat

Die steady-state-Werte für x (Trockengewicht), P (Lactat) und $\bar{s}$ (Glucose) wurden gemessen, die Werte für q_s und q_p hieraus berechnet, die Werte für y_0 durch lineare Regression erster Ordnung und die Modellparameter $\mu_{\max}$, K_s , S_R , $S_{\max}$ und n durch nichtlineare Regression der Gl. 4.6 nach Nelder und Mead ermittelt. P steht für Produkt (g/l), D für die Verdünnungsrate (h⁻¹), μ für die Wachstumsrate (h⁻¹). Im steady state ist $dx/dt = 0$ und daher $D = \mu$.

4.2.2.6 Einfluß der Verdünnungsrate D auf die Aminosäureaufnahme

Die typische Zusammensetzung des MRS-Mediums bei Einsatz von 25 g Proteinstickstoff pro l als Mittelwert mehrerer Analysen zeigt Abb. 31. Hierbei fällt besonders der große Anteil der Aminosäure Leucin mit 13 % an der Gesamtmenge der freien Aminosäuren auf.



Betrachtet man die relative Aminosäureaufnahme in kontinuierlicher Kultur bei geringem Glucose-Gehalt im Reservoir (18.2 g Glucose/l), so werden besonders Arginin und aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin aufgenommen (Abb. 32a). Auch in der Batchkultur mit vergleichbarer Zuckerkonzentration (Kap. 4.2.1.1) findet man aromatische Aminosäuren (Histidin und Tryptophan) unter den am meisten aufgenommenen Aminosäuren. Das auf die absoluten Konzentrationen bezogene Aufnahmemuster weist Leucin vor Phenylalanin und Arginin in Übereinstimmung mit den Batch-Ergebnissen als am stärksten aufgenommene Aminosäure aus (Abb. 32b). Die Summe der gebildeten Aminosäuren Citrullin (0.14 mM) und Ornithin (0.1 mM) entspricht in etwa der aufgenommenen Argininmenge (0.25 mM). 56 % des Arginins finden sich in Citrullin wieder und 40 % in Ornithin.

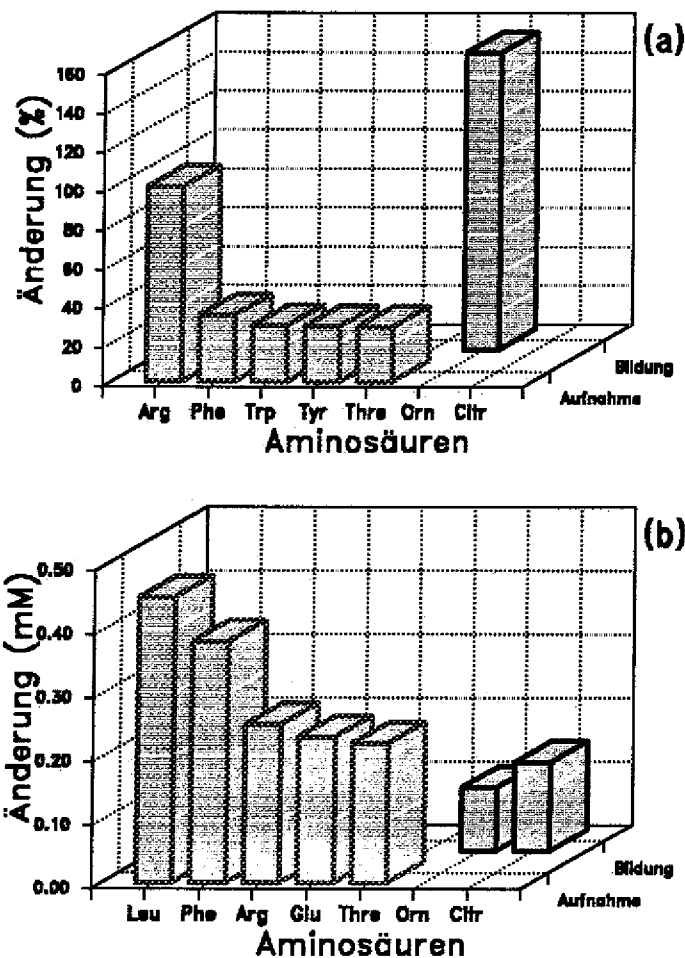


Abb. 32. Veränderung freier Aminosäuren in kontinuierlicher Kultur bei niedriger Glucose-Konzentration: MRS-Medium nach deMan mit 18.2 g Glucose/l, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 upm, pH 6.5, $0.2\text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$; $D = 0.2\text{ h}^{-1}$; Aufnahme: vorderer Balken, Bildung: hinterer Balken; Darstellung der am stärksten veränderten Aminosäuren ;
 (a) relative Aufnahme (100 % = Konzentration im Reservoir)
 (b) absolute Aufnahme (mM)

Beim Übergang vom niedrigen zum hohen Glucose-Gehalt im Reservoir (58 g/l) bei gleicher Verdünnungsrate $D = 0.2\text{ h}^{-1}$ kommt es zu einer um den Faktor 2 - 3 höheren Aufnahme, die sich sowohl in der relativen als auch in der absoluten Aufnahme niederschlägt. Die am stärksten veränderten Aminosäuren werden dabei zwischen 0.4 - 1.6 mM gegenüber 0.2 - 0.5 mM bei niedrigem Glucose-Gehalt aufgenommen. Histidin gefolgt von Phenylalanin steht an der Spitze der absoluten Aufnahme.

Abb. 33 vergleicht die relative Aminosäureaufnahme bei hohem Glucose-Gehalt (hintere Balken) mit der Aufnahme bei niedrigem Glucose-Gehalt (vordere Balken). Phenylalanin wird, obwohl sein Vorkommen erst an 5. Stelle der freien Aminosäuren im MRS-Medium steht (Abb. 31), sowohl bei niedrigem als auch bei hohem Glucose-Gehalt am zweitstärksten aufgenommen.

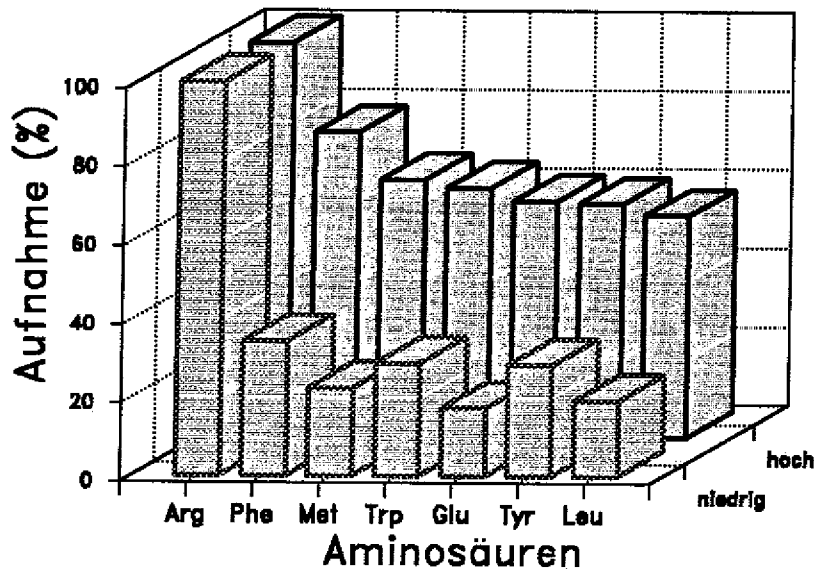
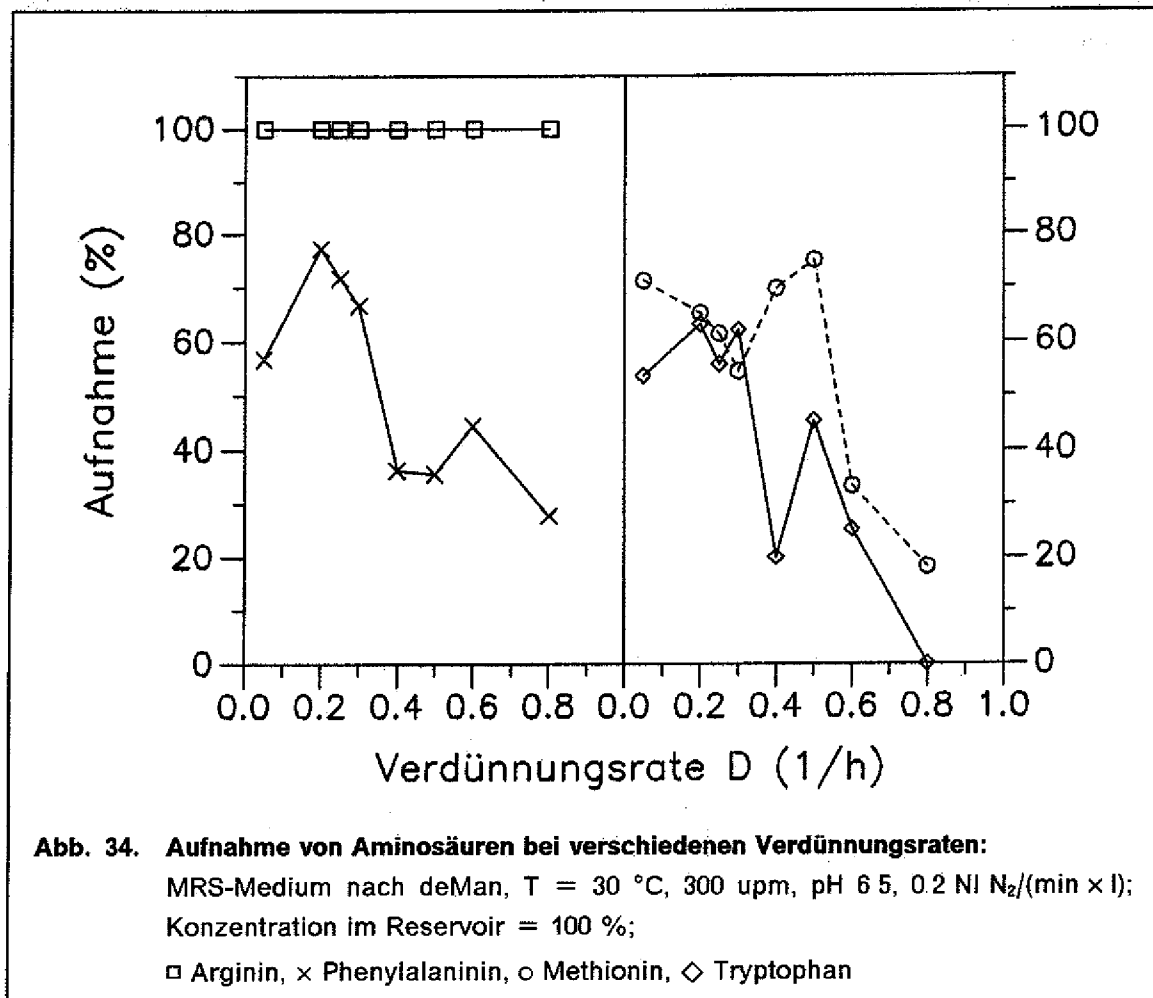


Abb. 33. Vergleich der Aufnahme freier Aminosäuren in kontinuierlicher Kultur bei verschiedenen Glucose-Anfangskonzentrationen: MRS-Medium nach deMan, $T = 30^\circ\text{C}$, 300 upm, pH 6.5, $0.2 \text{ NI N}_2/(\text{min} \times \text{l})$, $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$; Aufnahme (oben), Bildung (unten); prozentuale Aufnahme (100 % = Konzentration im Reservoir); hinten: 58 g Glucose/l, vorne: 18.2 g Glucose/l

Die Aufnahmepräferenz für Arginin, Phenylalanin, Methionin und Tryptophan bei hohem Glucose-Gehalt bleibt im wesentlichen auch erhalten, wenn die Verdünnungsrate geändert wird. Es zeigt sich für diese Aminosäuren eine Verdünnungsratenabhängige Aufnahme.

Bei niedrigen Verdünnungsraten kommt es zur Ornithin-Bildung. Bei höheren Verdünnungsraten wird Ornithin aus dem Kulturmedium aufgenommen. Diese Aufnahme nimmt mit weiter steigenden Verdünnungsraten wieder ab. Die Isoleucin-Aufnahme zeigt keine mit der Verdünnungsrate in Zusammenhang stehende Tendenz.

Allen Untersuchungen in kontinuierlicher Kultur ist die 100 %-tige Aufnahme von Arginin und die besonders starke Aufnahme aromatischer Aminosäuren (bei hoher



Glucose-Konzentration bis zu 80 % des Reservoir-Angebotes) gemeinsam. Phenylalanin, meist gefolgt von Histidin, Gutamat und Leucin in manchmal wechselnder Reihenfolge stehen an der Spitze der mengenmäßigen Aufnahme.

4.3 Optimieren durch simultane Faktorenvariation (Simplex-Verfahren)

Im Gegensatz zum Vorgängerkapitel wird wegen des zu erwartenden komplexen Zusammenhangs zwischen Einflußparametern und der Enzymaktivität beim Ändern der Standardbedingungen eine Methode zur simultanen statt zur sukzessiven Parametervariation gewählt. Durch diese simultane Variation wird eine deutliche Herabsetzung der Versuchszahl zum Erreichen einer hohen Volumenaktivität gegenüber sukzessiven Verfahren garantiert (siehe Kap.2.5). Wegen der in Kap. 2.5 beschriebenen Vorteile, unter anderem wegen der Fähigkeit zur besonders starken Herabsetzung der Experimentezahl wurde das Simplex-Verfahren gewählt. Da sich die Bakterien zur Einstellung der erforderlichen Kulturbedingungen unter konstanten Bedingungen befinden müssen, wurden sie in kontinuierlicher Kultur herangezogen. Zielgröße der Optimierung bleibt auch in diesem Kapitel die Volumenaktivität (U/I) im steady state der kontinuierlichen Kultur. Eine Optimierung der Produktivität ($U/(I \times h)$) würde mit einem unvollständigen Glucoseverbrauch einhergehen (siehe Abb. 25 und 27). Einflußparameter aus dem Bereich der Kulturbedingungen und den Nährmediumskomponenten wurden in Höhe und Zusammenstellung **gleichzeitig** variiert. Die Faktorenwahl ist im nächsten Kapitel beschrieben.

4.3.1 Faktorenwahl

Kulturbedingungen

Die Temperatur hatte einen Einfluß auf die Wachstumsrate des Organismus (Abb. 23), die Verdünnungsrate D (Abb. 24, 25) und der pH-Wert einen Einfluß (Kap. 4.2.2.1, Abb. 22) sowohl auf die Enzymaktivität als auch auf das Wachstum gezeigt.

Unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten sollten für verschiedene Durchmischungen sorgen.

Die N_2 -Begasung diente zur Schaffung eines definierten anaeroben Milieus und damit zur Vermeidung von Nebenprodukten: Acetat wird z.B. laut Winter (1974) bei Anwesenheit von O_2 gebildet.

Komplexe Extrakte

Verschiedene komplexe Extrakte sollten gegeneinander ausgetestet werden. Eine unterschiedliche Wirkung komplexer Extrakte auf das Wachstum von Lactobacillen war bereits von deMan et al. 1960 festgestellt worden. Die Lactat-Dehydrogenase von Lactobacillus confusus variierte stark nach je nach der Menge von Fleischextrakt und Casein im Kulturmedium (Hummel et al., 1983). Ein wachstumsfördernder Effekt von corn steep (Maisquellwasser) war bei Streptococcus lactis (Johnson, 1971), Lactobacillus casei (Heimbuch et al., 1956) aufgetreten. Malzextrakt als wachstumsstoffreiche Zucker-Quelle (Brocks, 1990), als Alternative zu reinen Zuckern wurde ebenfalls zugesetzt.

Amino- und Ketosäuren

Wegen des eventuellen Zusammenhangs der L-Hic-DH mit dem Aminosäurestoffwechsel wurden den Kulturmedien auch Aminosäuren zusätzlich zu bereits in den komplexen Extrakten vorhandenen beigelegt. Arginin, Aspartat, Methionin, Tryptophan und Valin waren im Laufe des Glucose-limitierten Batch-Wachstums (Abb. 11) mit mehr als 15 % des Ausgangswertes stark aufgenommen worden. Obwohl keine der Amino- und Ketosäuren bis auf Arginin einen wachstumssteigernden Effekt (Kolbenversuche in Kap. 4.2.4) gezeigt hatten, mußte der Effekt auf die Enzymaktivität noch überprüft werden. Da Leucin, Isoleucin und Valin im Aminosäurestoffwechsel wegen der Zugehörigkeit zur "Pyruvatfamilie" in enger Verbindung stehen und Leucin auch mengenmäßig stark aufgenommen worden war (Abb. 11, 32), wurden diese drei Aminosäuren ebenfalls zugesetzt.

Ketoleucin und Ketovalin als am besten umgesetzte Substrate der L-Hic-DH sollten in ihrer Wirkung auf die Enzymaktivität überprüft werden. Auf einen Einsatz von L-2-Hydroxyisocaproat in der Fermentation wurde aus Kostengründen verzichtet. 0.5 g/l würden mindestens benötigt, und der Preis betrug 1991 57.34 DM/g. Stattdessen wurde als 32. Faktor eine Mischung von Vitaminen (siehe Tab. 7, 8, 9) in konstantem Verhältnis zu einer Spurenelementlösung variiert.

Sonstige

Mangan wurde als eigener Faktor in der Optimierung einbezogen, da Mangan bei der Entfernung des toxischen Sauerstoffs mitwirkt. Zum einen ist Mangan an dem Spontanzerfall von Sauerstoffradikalen beteiligt (Goetz et al., 1980) und zum anderen bei manchen Milchsäurebakterien für die Funktion der Superoxiddismutase (Hanson und Haggström, 1984) notwendig.

Auch für Tween 80 liegen Berichte über eine wachstumsfördernde Wirkung vor (Ledesma et al., 1977).

Mit dem externen Zusatz von Vitaminen sollte überprüft werden, ob die komplexen Extrakte bereits das Vitaminbedürfnis ausreichend decken. Das Vorhandensein von Folsäure, Riboflavin und Thiamin ist laut Buchanan und Ribbons (1974) unerlässlich für das Wachstum von Lactobacillus confusus. Diese drei Vitamine wurden getrennt von der übrigen Vitaminmischung einzeln in die Optimierung miteinbezogen. Thiamin ist als Cosubstrat der Phosphoketolase im Glucose-Abbau-Weg (Abb. 1) erforderlich.

Verschiedene Kalium-Phosphat-Zusätze sollten eine unterschiedliche Versorgung mit einer anorganischen P-Quelle und einen unterschiedlichen Pufferungsgrad des Mediums erreichen. Ammoniumchlorid kam statt Ammoniumacetat als anorganische N-Quelle zum Einsatz, da eine Beeinflussung der Gärbilanz durch Acetat als eine der mögliche Endprodukte des Glucose-Abbaus vermieden werden sollte.

Citrat sollte einer Zellcluster-Bildung vorbeugen (Ledesma et al., 1977). Ascorbat diente zur Unterstützung eines anaeroben Milieus.

4.3.2 Ergebnisse der Anfangssimplex

In der Anfangssimplex, in der 33 verschiedene Faktorenkombinationen (Vertices) mit jeweils 32 verschiedenen Faktoren in Fermentationen eingestellt wurden, ergaben sich die Enzymaktivitäten und die Zellmasse wie in Tab. 19 aufgeführt.

Da die Startvertex insgesamt niedrigere Werte als alle übrigen Vertices aufweist, wurde statt ihrer eine Kontrolle fermentiert, in der alle Faktoren ihr Normalniveau (Tab. 5) ohne Erhöhung irgendeines Faktors innehielten. Diese Kontrolle (90.5 U/l) wurde als Vergleichswert für die Volumenaktivitäten bei Erhöhung von Einzelfaktoren in den übrigen 32 Vertices verwendet. Sie gehört nicht zur eigentlichen Simplex. Die Änderung der Aktivität gegenüber diesem Wert stellt also ein Maß für den Effekt der Addition der p-Werte zu den Koordinaten der Startvertex im Vergleich zur Addition der q-Werte, also im Vergleich zum Normalniveau der Faktoren (Tab. 6) dar.

Die Anfangssimplex ist durch eine minimale Volumenaktivität von 0 U/l, eine maximale Volumenaktivität von 151 U/l, eine mittlere Volumenaktivität von $55.2 \text{ U/l} \pm 20$ (Mittelwert der Enzymaktivitäten aller 33 gemessenen Vertices) gekennzeichnet.

Die Startvertex (Tab. 5) selbst erzielt bereits eine hohe Aktivität von 114 U/l im Vergleich zur Kontrolle (91 U/l) und zum Mittelwert aller Enzymaktivitäten. Die stärkste Steigerung der Volumenaktivität tritt bei Erhöhung der Vitamin-Konzentrationen (Folsäure, Riboflavin und Thiamin) auf. Ein Zusatz von $75 \mu\text{g}$ Thiaminpro I Kultur, entsprechend einer 4.1-fachen Erhöhung gegenüber dem "Normalniveau" (Tab. 5) erzielt eine Aktivität von 151 U/l. Diese maximale Aktivität wird allerdings noch von der Aktivität im käuflichen MRS-Medium nach Merck mit 18.2 g Glucose/l bei gleichen Kulturbedingungen übertroffen (198.2 U/l). Die Erhöhung von Maltose und der Temperatur wirken sich ebenfalls vorteilhaft aus.

Aminosäuren außer Arginin und Isoleucin, der Glucose-Gehalt und komplexe Extrakte erwiesen sich in der Anfangssimplex als nicht aktivitätssteigernd.

Besonders niedrige Ergebnisse traten infolge der Erhöhung des Ammoniumchlorid-Gehaltes, der Kaliumphosphat-Konzentration, dem Citrat-Gehalt und der Verdünnungsrate um das 2.5 - 3-fache des Normalwertes sowie der Erhöhung von Ketovalin, Tryptophan, Methionin und Valin um das circa 8-fache des Normalwertes auf. Bei den Vertices mit einem pH-Wert von 8.8 oder einer Ammoniumchlorid-Konzentration von 4.3 g/l wurden die Bakterien aus dem Fermenter ausgewaschen.

Da die meisten Vertices niedrigere Enzymaktivitäten als die Kontrolle und die Startvertex aufwiesen, ergibt sich ein ziemlich geringer Durchschnittswert aller Enzymaktivitäten der Anfangssimplex.

Während sich der Thiamin-, Folsäure-, Riboflavin- und Maltose-Gehalt (in dieser Reihenfolge) sowie die Temperatur günstig auf alle Aktivitäten, einschließlich der spezifischen, teilweise in unterschiedlicher Reihenfolge auswirken, verursacht die Erhöhung ganz anderer Faktoren eine Steigerung des Trockengewichts. Der Gehalt an

komplexen Extrakten und Arginin, die Rührgeschwindigkeit und die Stickstoff-Begasung beeinflussen die Zellmasse am meisten.

Vertex-Nr.	erhöhter Faktor	Volumen-aktivität			spezifische Aktivität		Trocken-ge-wicht (g/l)
		(U/l)	Ände-rung (%)	$(\frac{U}{l \times h})$	(mU/mg Prot. i. RE)	$(\frac{U}{g \text{ Tg}})$	
1	(Startvertex)	114	+26	19	778	209	0.544
2	Rührerdrehzahl	97	+8	20	413	105	0.929
3	Verdünnungsrate	23	-75	12	205	66	0.350
4	pH-Wert	0.01	-100	-	-	-	-
5	Temperatur	120	+33	25	1077	226	0.533
6	N ₂ -Begasung	61	-33	13	333	92	0.663
7	Glucose × H ₂ O	35	-61	7	372	64	0.550
8	Maltose × H ₂ O	109	+21	22	638	172	0.636
9	Hefeextrakt	85	-6	17	567	103	0.823
10	Corn steep	38	-58	8	354	63	0.606
11	Malzextrakt	84	-8	17	526	88	0.957
12	Pepton (Casein)	54	-40	11	311	96	0.568
13	Fleischextrakt	45	-50	9	345	82	0.551
14	MnSO ₄ × 7 H ₂ O	84	-8	17	360	89	0.939
15	FeSO ₄ × H ₂ O	36	-60	7	231	61	0.588
16	Tween 80	55	-39	11	255	93	0.594
17	Folsäure	128	+42	26	956	266	0.481
18	Riboflavin	124	+37	25	688	189	0.658
19	Thiamin	151	+67	31	976	232	0.650
20	K ₂ HPO ₄	23	-75	5	218	37	0.617
21	NH ₄ Cl	0.0	-100	-	-	-	-
22	Monocitronensäure	20	-71	5	188	50	0.533
23	Ascorbinsäure	27	-71	5	188	50	0.533
24	Leucin	24	-73	5	186	48	0.536
25	Isoleucin	43	-53	9	210	79	0.536
26	Valin	29	-68	6	346	187	0.156
27	Arginin	42	-53	39	295	57	0.748
28	Asparaginsäure	35	-61	7	235	63	0.558
29	Tryptophan	28	-69	6	159	54	0.516
30	Methionin	28	-69	6	159	54	0.588
31	Ketoleucin	30	-66	6	185	62	0.493
32	Ketovalin	11	-88	2	706	18	0.590
33	Mix	38	-58	8	313	82	0.466

Vertex-Nr.	erhöhter Faktor	Volumen-aktivität			spezifische Aktivität		Trocken-ge-wicht (g/l)
		(U/l)	Ände-rung (%)	($\frac{U}{l \times h}$)	(mU/mg Prot. i. RE)	($\frac{U}{g \times Tg}$)	
Mittelwert ± Standardabweichung/2		55 ± 20	11 ± 4	-	367	95 ± 34	0.557
Kontrolle		91	0	19	385	98	0.920
MRS (deMan)		199	+ 120	41	531	161	1.23

Tab. 19. Enzymaktivitäten und Zellmasse in der Anfangssimplex: Erhöhung (+), Erniedrigung (-) gegenüber Kontrolle (alle Faktoren mit Normalniveau, Tab.5)

Bei allen Vertices außer denen mit erhöhtem Vitamingehalt und erhöhter Temperatur treten mindestens 2 g/l oder mehr Rest-Glucose auf. Die Fermentationen sollte in den meisten Fällen C-limitiert und damit durch einen bekannten Faktor begrenzt sein. Die Bildung von Lactat beträgt meist 50 - 130 mM, die von Acetat 10 - 25 mM. Meist wird 3 - 5 mal soviel Lactat wie Acetat gebildet. Nur im Falle der Erhöhung komplexer Extrakte (Casein, Hefe- und Malzextrakt) und Maltose entsteht mehr Acetat (40 - 70 mM). Bei Hefeextrakt und Maltose entsteht sogar 1.7 mal soviel bzw. gleichviel Lactat wie Acetat.

Die Citrataufnahme beträgt meist 10 %, ist aber wegen der Überdeckung durch andere Substanzen im Elutionsprofil schwer quantifizierbar.

Ketovalin und Ketoleucin werden zwischen 40 und 100 % ihrer Reservoirkonzentration aufgenommen, Ketoleucin besonders stark dann, wenn der Hefeextrakt im Medium erhöht ist und beide Ketosäuren völlig, wenn die Temperatur erhöht wird. Dabei beträgt die Aufnahme von Ketoleucin meist 10 - 20 % mehr als die von Ketovalin. Die Vertex mit erhöhter Temperatur fällt durch Bildung von 2.34 mM Hydroxyisocaproat auf, etwa soviel, wie Ketoleucin aufgenommen worden war. Bei den übrigen Vertices ist kein Hydroxyisocaproat im Kulturüberstand identifizierbar.

4.3.3 Enzymaktivitäten im Laufe der Simplex-Optimierung

Der Verlauf der L-Hic-DH-Volumenaktivität über 20 Iterationsschritte ist in Abb. 35 ersichtlich. Es sind nur die Werte dargestellt, die zum nächsten Iterationsschritt führen. Werte im Iterationsschritt 0 entsprechen dem Mittelwert oder Minimalwert der Anfangssimplex.

Die maximale Volumenaktivität von 579 U/l wird bereits nach sechs Schritten erzielt. Sie liegt um den Faktor **3.9** höher als ihr maximaler Wert in der Anfangssimplex und um den Faktor **10.5** höher als der Mittelwert aller Volumenaktivitäten der Anfangssimplex.

In jedem Iterationsschritt bilden 33 Vertices mit ihren Enzymaktivitäten die jeweilige Simplex. Da immer die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis durch eine Vertex

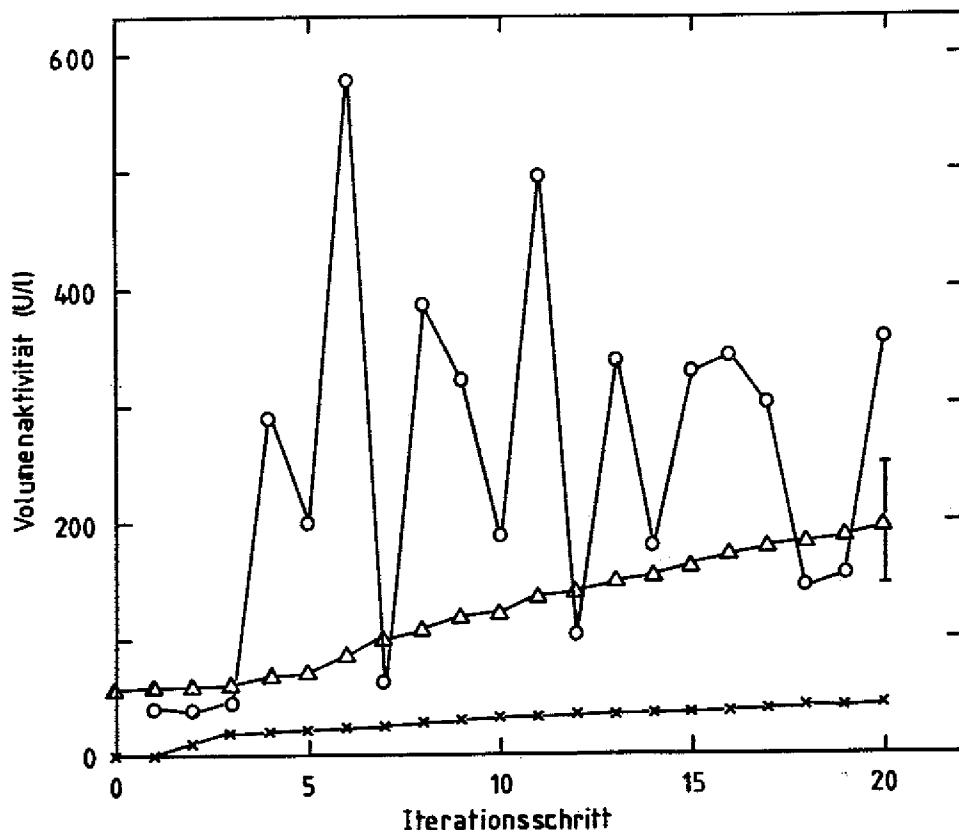


Abb. 35. L-Hic-DH-Volumenaktivität im Laufe der Simplex-Optimierung:

○: Aktivität der weiterführenden Vertex, die die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis ersetzt und damit zum neuen Iterationsschritt und zur neuen Simplex führt

Δ: Mittelwert der Enzymaktivitäten aller 33 Vertices im jeweiligen Iterationsschritt (Standardabweichung ± 55 U/l)

x: Minimalwert

mit einem besseren Ergebnis ersetzt wird, muß zwangsläufig der Mittelwert aller Enzymaktivitäten der Simplex im nächsten Iterationsschritt höher sein als in dem vorausgehenden. Dies erklärt den fortlaufenden Anstieg der mittleren Volumenaktivität (siehe Begriffsdefinitionen in Kap. 3.2.2.1). Diese hat nach 20 Iterationsschritten mit 195 U/l sogar den Maximalwert der Anfangssimplex (150 U/l) übertroffen und die mittlere Enzymaktivität der Anfangssimplex um den Faktor 3.5 verbessert. In jedem Iterationsschritt nimmt die mittlere Enzymaktivität dabei um 10 - 20 U/l zu.

Da die Einzelergebnisse der 33 Vertices in jedem Iterationsschritt noch ziemlich weit auseinanderliegen, kommt eine große Standardabweichung des Mittelwertes zustande. Auch die minimale Aktivität der Simplex in dem jeweiligen Iterationsschritt muß nach jedem Schritt ansteigen, da immer die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis ersetzt wird. Die "weiterführende Vertex", die die "schlechteste" ersetzt,

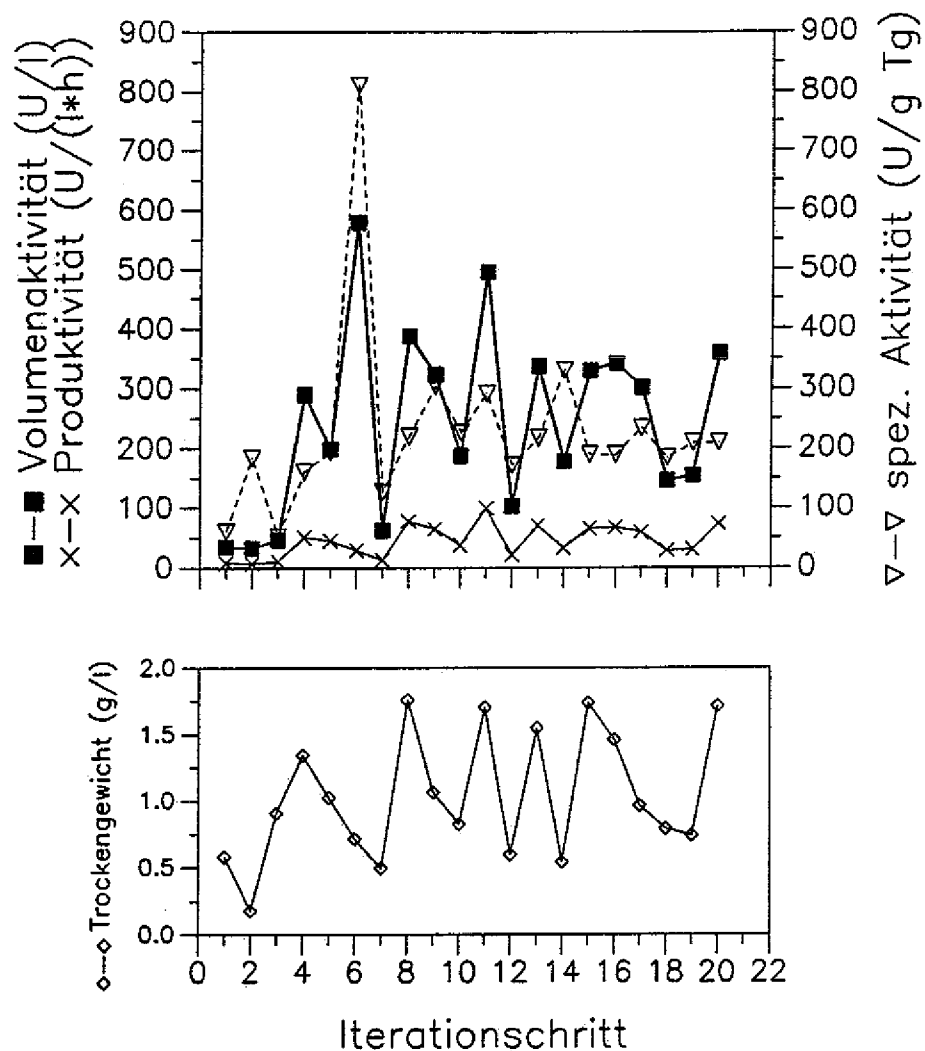


Abb. 36. Vergleich von Enzymaktivitäten und Wachstum während der Simplex-Optimierung

schwankt zu Beginn der Optimierung von einem Iterationsschritt zum nächsten noch stark. Diese Schwankungen nehmen während der Optimierung ab. Auch liegt der überwiegende Teil dieser Volumenaktivitäten dann oberhalb des Mittelwertes. Die Schwankungen der "weiterführenden" Aktivität sind auch für die große Streubreite der Messwerte verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Optimierung aus Zeitgründen nach dem 20. Iterationsschritt beendet. Eine weitere Verbesserung der Volumenaktivität zumindest bis auf einen Wert nahe des bisher festgestellten Maximums, eventuell aber auch über diesen Wert hinaus, ist bei einer Fortsetzung der Optimierung zu erwarten (vergl. Abb. 35).

Trockengewicht und spezifische Aktivitäten ändern sich im Laufe der Optimierung nicht immer in gleicher Weise wie die Volumenaktivität. Die Steigerung des Wachstums fällt schwächer aus als die der Volumenaktivitäten.

Der Vergleich der auf das Trockengewicht bezogenen spezifischen Aktivität mit der Volumenaktivität zeigt in denselben Iterationsschritten für beide Aktivitäten hohe Werte. Allerdings sind Volumenaktivitäten und Trockengewichtswerte über alle Simplex-Messpunkte hin nur schlecht miteinander korreliert (Korrelationskoeffizient $r = 0.7641$). Die auf das Protein im Rohextrakt bezogene spezifische Aktivität folgt der auf das Trockengewicht bezogenen weitgehend, was in einer schwachen Korrelation der beiden Größen zum Ausdruck kommt: Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.8581. Der Fehler dieser Korrelation liegt mit $\pm 6.9\%$ im Bereich der Meßschwankungen. Das Maximum der Produktivität findet sich dort, wo die zweithöchste Volumenaktivität auftritt, 99 U/(lxh) bei $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$.

Hohe Volumenaktivitäten gehen häufig auch mit einem niedrigen Redoxpotential einher.

Die Verbesserungen von Zellmasse und Enzymaktivitäten sind in Tab. 20 zusammengefaßt:

	Volumen- aktivität (U/l)	Produktivi- tät U/(lxh)	spezifische Aktivität		Zellmasse (g Tg/l Kultur)
			(U/mg Prot. i. RE)	(U/g Tg)	
Ergebnis der Anfangssimplex					
Maximum	151	3	1.08	266	0.96
Minimum	0	0	0	0	0
Mittelwert	55 ± 20	11	0.37	95	0.56
Ergebnis der Optimierung nach Iteration 20					
Maximum	579	99	2.55	810	1.76
Minimum	45	10	0.2	51	0.48
Mittelwert	195 ± 71	37	0.77	207	0.96
Steigerung nach 20 Iterationen gegenüber der Anfangssimplex					
Maximum gegenüber Maximum	3.9	3.2	2.4	3.0	2.1
Mittelwert gegenüber Mittelwert	3.5	3.2	2.1	2.2	1.7
Maximum gegenüber Startvertex	5.1	5.5	4.7	3.8	3.2
Maximum gegenüber Mittelwert der Anfangssimplex	10.5	8.7	6.9	8.6	2.1

Tab. 20. L-Hic-DH-Aktivität und Zellmasse im Vergleich zur Anfangssimplex

4.3.4 Veränderungen von Kulturbedingungen und Mediumskomponenten während der Optimierung

Im folgenden steht meist die Veränderung des Faktors in der Vertex, die diejenige mit dem schlechtesten Ergebnis ersetzt, für die Veränderung eines Faktors über die durchgeführten 20 Iterationsschritte.

Unter den Kulturbedingungen ändern sich Verdünnungsrate und pH-Wert kaum. Bis auf zwei bis drei große Abweichungen zwischen $D = 0.05 - 0.23 \text{ h}^{-1}$ tendiert die Verdünnungsrate nur zu einer leichten Abnahme von 0.23 h^{-1} auf 0.19 h^{-1} . Der pH-Wert bewegt sich im wesentlichen um $\text{pH} = 6.5$ mit einigen größeren Schwankungen zwischen $\text{pH} 5.8 - 7.6$.

Die Temperatur, Rührgeschwindigkeit und Stickstoffbegasung ändern sich deutlich. Dabei nimmt die Temperatur in Form einer nach oben geöffneten Parabel von 30.25 auf $33.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zu. Die Rührgeschwindigkeit erhöht sich von 260 auf 330 upm . Die Stickstoffbegasung variiert stark über einen weiten Bereich von $0 - 1.2 \text{ NI}/(\text{min} \times \text{l})$. Auf sie wird in Kap. 4.3.5 noch eingegangen.

Unter den Mediumskomponenten zeichnen sich die komplexen Extrakte, Zucker, Mangan und die Vitamine Riboflavin und v.a. Folsäure und die Aminosäuren Isoleucin, Arginin (vergl. Kap. 4.3.5) durch einen starken Anstieg aus.

Im Laufe der Optimierung kommt es zur Abnahme des Kaliumphosphat-, des Ammoniumchlorid-, Citronensäure-Gehaltes, der Ketosäuren (Ketoleucin, Ketovalin) und aller übrigen Aminosäuren (Leucin, Valin, Tryptophan, Methionin). Die Zellen wachsen auch, wenn das Nährmedium kein externes Phosphat enthält. Ascorbat bleibt in etwa konstant.

Auf einige Faktoren wird nachfolgend näher eingegangen.

4.3.4.1 Änderung komplexer C- und N-Komponenten und Zucker

Diese Komponenten fallen durch ihre fast lineare, mit wenigen Schwankungen behaftete Zunahme im Laufe der Optimierung auf. Abb. 37 zeigt eine vergleichende Betrachtung der komplexen Extrakte im Laufe von 20 Iterationsschritten. Mittels linearer Regression 1. Ordnung konnte ermittelt werden, daß der Hefeextraktzusatz unter den N-haltigen komplexen Extrakten am stärksten mit $0.125 \pm 0.016 \text{ g pro l}$ und Iterationsschritt, der corn-steep-Zusatz auf Festsubstanz umgerechnet, dagegen nur um etwa 5 mg pro l und Iterationsschritt ansteigt.

Die Summe der C-haltigen Komponenten (Glucose, Maltose, Malzextrakt) steigt mit 0.563 g/l pro Iterationsschritt schneller an als die Summe der komplexen N-haltigen Komponenten (Hefe-, Fleischextrakt, Pepton aus Casein, Corn-steep-Festsubstanz) mit 0.343 g/l pro Iterationsschritt. Malzextrakt wird dabei wegen seiner Zusammensetzung aus $90 - 92 \text{ \%}$ Kohlehydraten und nur $4.5 \text{ \%}$ N-haltigen Komponenten

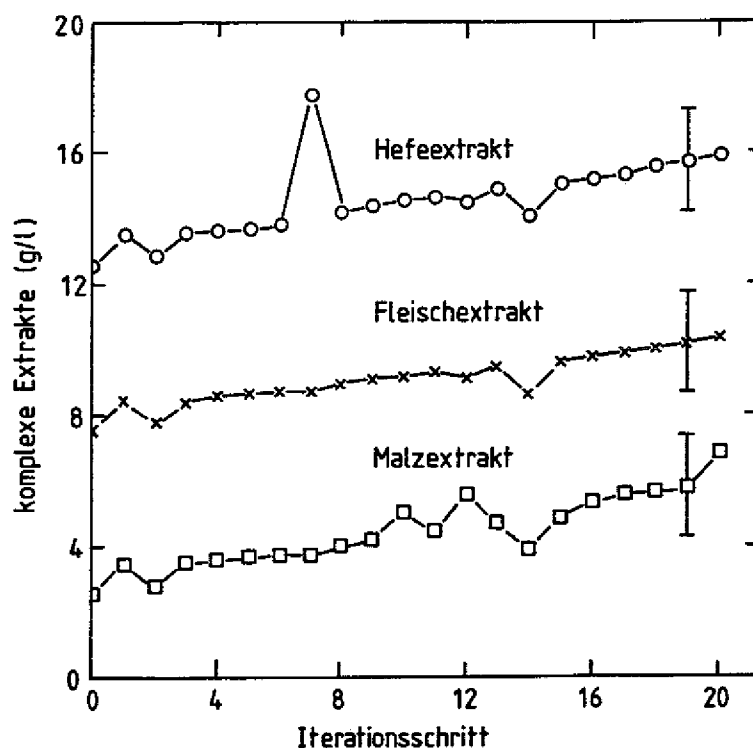


Abb. 37. Komplexe Extrakte im Laufe der Simplex-Optimierung: Wert des Faktors der weiterführenden Vertex, die die Vertex mit dem schlechtesten Ergebnis ersetzt und damit zur neuen Iteration und Simplex führt. Die Balken kennzeichnen die Standardabweichung des Faktors um den Mittelwert der 32 Vertices in dem jeweiligen Iterationsschritt. Der Verlauf von Fleischextrakt entspricht dem von Casein.

(Brocks, 1990) zu den C-Komponenten gerechnet. Selbst wenn man die großen Schwankungen der C-Komponenten von einem Iterationsschritt zum nächsten durch Miteinbezug des Fehlers der Steigung berücksichtigt, ist der Anstieg der C-Komponenten verschieden vom Anstieg der N-Komponenten: Die C-Quellen erhöhen sich um 0.563 ± 0.088 g/l und die N-Quellen um 0.343 ± 0.028 g/l in jeder Iteration. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß bei fast allen Iterationsschritten Restzucker liegenblieb. Die Zuckereinwaage aus Glucose und Maltose findet sich nur beim Iterationsschritt 9, 11 und 16 in der Menge des gebildeten Lactats wieder (circa 110 - 120 mM) und wird nur im 4. Schritt stark übertroffen (175 mM Lactat bei 105 mM Zuckereinwaage).

4.3.4.2 Veränderung von Amino- und Ketosäuren

Zusätzlich zu den bereits in komplexen Extrakten vorhandenen Keto- und Aminosäuren zugegebene Säuren änderten sich Abb. 38 entsprechend.

Häufig geht der Abnahme einer Komponente eine Zunahme bis etwa zum 6.- 9. Iterationsschritt voraus. Während die Leucin- und Valin-Zugabe insgesamt abnimmt, steigt die Isoleucin-Konzentration an (Abb. 38a). Die Arginin-Konzentration erreicht nach 20 Iterationen den höchsten Endwert mit 3 g/l gegenüber 0.8 - 0.9 g Isoleucin oder Aspartat pro l und fällt durch einige große Schwankungen auf (Abb. 38b). Auf Arginin wird im Kap. 4.3.5 noch näher eingegangen. Die Methionin- und Tryptophan-Zugabe geht auf die Hälfte ihres Ausgangswertes zurück. Die Aspartat-Zugabe steigt nur leicht.

Besonders Ketovalin fällt durch seine starke Abnahme auf. Ab Iteration 13 bereits werden nur noch 0 g/l vorgeschlagen. Ketoleucin sinkt auf die Hälfte seines Ausgangswertes (Abb. 38c).

Die auf das Gesamtangebot im Reservoir bezogene Aufnahme der Aminosäuren folgt in keinem Fall der Entwicklung der externen Aminosäure-Zugabe, auch nicht bei Isoleucin. Das Isoleucin-Angebot im Kulturmedium war nicht mit der Enzymaktivität korreliert. Die Aufnahmewerte schwanken sehr stark von einem Iterationsschritt zum nächsten. Bei Tryptophan und Isoleucin tritt eventuell eine hohe Aufnahme bei hohen L-Hic-DH-Volumenaktivitäten auf. Jedoch waren die Kulturüberstände bezüglich dieser Aussage nicht aus allen Iterationsschritten auswertbar. Bei vielen Schritten wurde im Kulturüberstand ein höherer Aminosäure-Gehalt als im Reservoir (besonders im 1., 8., 10. Schritt und in der Anfangssimplex) festgestellt, wenn sich die Konzentrationen von Hefe-, Fleischextrakt, Folsäure und Riboflavin erhöhten. Dieser Effekt ist vermutlich einer Peptidasewirkung zuzuschreiben. Exterkate (1990) z.B. berichtet über deren Vorkommen bei Streptococcus cremoris. Wie bereits in kontinuierlicher Kultur im MRS-Medium bei niedrigem Zuckergehalt beobachtet, werden auch hier Tyrosin, Phenylalanin, Histidin und Tryptophan zu 20 - 45 % und Leucin, Isoleucin, Methionin, Valin und Aspartat nur zu 5 - 25 % ihres Reservoir-Gehaltes verbraucht. Arginin wird immer zu 100 % aufgenommen, sogar bei einer externen Zugabe von 11.65 g/l zusätzlich zu circa 28 g C-Komponenten pro l. Nur circa 0.4 mmol des aufgenommenen Arginins finden sich in diesem Fall in einer Ornithin-Bildung wieder.

4.3.5 Korrelation von Faktoren mit Enzymaktivitäten

Die Zusammensetzung der Nährmedien, Kulturbedingungen und Ergebnis der Vertices mit den höchsten Volumenaktivitäten gibt Tab. 21 wieder.

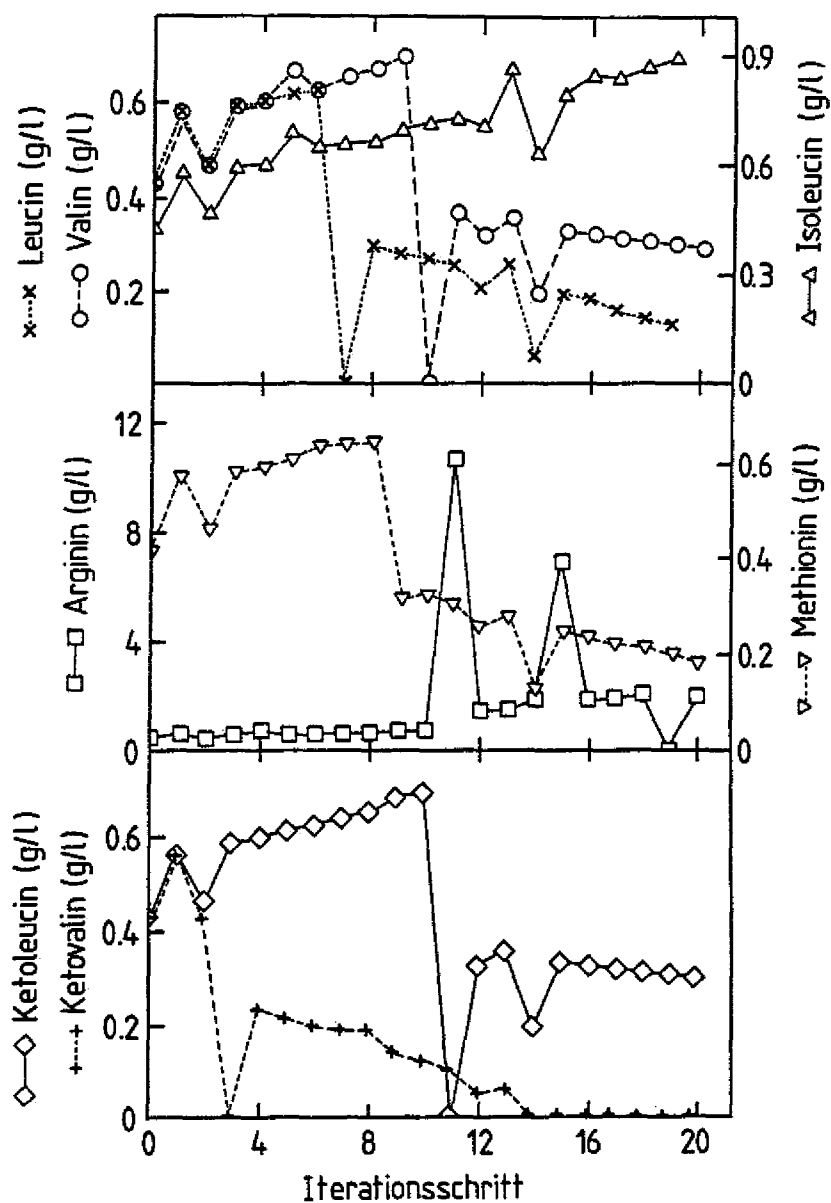


Abb. 38. Amino- und Ketosäure-Zugabe während der Simplex-Optimierung: Werte der weiterführenden Vertex

	Faktor-Nr.	Faktor	Einheit	Iteration 6	Iteration 11
Kulturbedingungen und Mediumskomponenten					
Kulturbedingungen	1	Rührerdrehzahl	upm	290	300
	2	Verdünnungsrate (D)	(1/h)	0.05	0.2
	3	pH-Wert		6.61	6.7
	4	Temperatur	°C	30.7	31
	5	N ₂ -Begasung	NI/l x min	1.2	0.61

	Faktor-Nr.	Faktor	Einheit	Iteration 6	Iteration 11
Zucker	6	Glucose $\times$ H ₂ O	g/l	14.9	16.73
	7	Maltose $\times$ H ₂ O	g/l	8.7	9.4
Komplexe Extrakte	8	Hefeextrakt	g/l	13.72	14.56
	9	Corn steep	ml/l	3.72	4.2
	10	Malzextrakt	g/l	3.93	4.38
	11	Pepton (Casein)	g/l	8.72	8.72
	12	Fleischextrakt	g/l	8.72	8.72
einzelne Spurenelemente	13	MnSO ₄ $\times$ 7 H ₂ O	mg/l	0.149	0.167
	14	FeSO ₄ $\times$ H ₂ O	mg/l	4.48	4.83
Wachstumsverstärker	15	Tween 80	g/l	1.64	3.64
einzelne Vitamine	16	Folsäure	μ g/l	8.2	4.5
	17	Riboflavin	μ g/l	22.4	24.16
	18	Thiamin	μ g/l	22.4	24.16
anorganische P-,N-Quelle, Sonstiges	19	K ₂ HPO ₄	g/l	2.26	2.19
	20	NH ₄ Cl	g/l	1.17	1.19
	21	Monocitronensäure	g/l	1.99	0.98
	22	Ascorbinsäure	g/l	0.75	0.62
Aminosäuren	23	Leucin	g/l	0.62	0.25
	24	Isoleucin	g/l	0.64	0.72
	25	Valin	g/l	0.64	0.36
	26	Arginin	g/l	0.64	10.65
	27	Asparaginsäure	g/l	0.67	0.71
	28	Tryptophan	g/l	0.64	0.32
	29	Methionin	g/l	0.64	0.3
Ketosäuren	30	Ketoleucin	g/l	0.62	0.0
	31	Ketovalin	g/l	0.196	0.1
Mix	32	Mix	-	0.62	0.7
Ergebnisse					
		Volumenaktivität	U/l	579.3	495.7
		Produktivität	U/(l $\times$ h)	29.0	99.14
		spezifische Aktivität	U/mg Prot i. RE	2.55	0.82
		spezifische Aktivität	U/g Tg	810.2	291.1
		Trockengewicht	g/l	0.715	1.7

Tab. 21. Spitzenreiter der Simplex-Optimierung: Kulturbedingungen, Medienzusammensetzung, Ergebnisse

Betrachtet man hierzu auch den Verlauf der Verdünnungsrate und der Stickstoffbegasung im Vergleich zur Volumenaktivität (Abb. 39a), so erkennt man, daß

die höchste Volumenaktivität in Iteration 6 mit einer hohen Stickstoffbegasung und einer sehr niedrigen Verdünnungsrate zusammentrifft. Alle übrigen Faktoren sind nicht extrem gegenüber ihren Mittelwerten in der Simplex der betreffenden Iteration erhöht. Die Auftragung der Volumenaktivität gegen die Stickstoffbegasung ergibt auch eine ansteigende Tendenz der Aktivität mit zunehmender Begasung.

Auch bei der Vertex mit der zweithöchsten Aktivität fallen 2 - 3 bestimmte Faktoren auf; während alle übrigen in der Nähe ihres Mittelwertes liegen. Bei Iteration 11 kommen eine hohe Arginin-Konzentration, das Fehlen von Ketoleucin und ein geringer Aminosäure- und Ketovalin-Gehalt (Tab. 21 und Abb. 39b) zusammen. Die Konzentration von Ketoleucin oder Arginin ist jedoch nicht über alle Iterationen mit der Volumenaktivität korrelierbar.

Außer bei der Temperatur, der Stickstoffbegasung und der Folsäurekonzentration traten bei keinem sonstigen Faktor Tendenzen zu einer Korrelation mit der L-Hic-DH-Aktivität auf.

Die spezifische L-Hic-DH-Aktivität erreicht zwischen 32 ° und 32.5 °C ihren innerhalb des bei der Optimierung durchschrittenen Bereiches maximalen Wert.

Während die Tendenzen zur Zunahme der Aktivität mit steigender Temperatur und Begasung noch undeutlich ausfallen, erscheint die zunehmende Tendenz bei steigenden Folsäurekonzentrationen deutlich (Abb. 40). Während zu Beginn der Optimierung niedrige Folsäurewerte unterhalb von 10 µg/l vorgeschlagen wurden, werden mit fortschreitender Optimierung Vitamingehalte von 20 - 60 µg/l vorgeschlagen. Bei niedrigen Vitaminkonzentrationen kommt es wegen des noch starken Einflusses der übrigen Faktoren zu stark streuenden Meßwerten für die Volumenaktivität. Bei Vitamingehalten oberhalb von 20 µg/l steigt die Volumenaktivität ausgehend von 100 U/l stark an. Oberhalb von 57 µg Folsäure/l Kultur besonders in den letzten Schritten kommt es zur leichten Abnahme der Aktivität.

Da aus Zeitgründen die Optimierung nach 20 Iterationsschritten beendet wurde, kann an dieser Stelle keine endgültige Aussage über die tatsächliche Korrelation der Enzymaktivität mit Einflußfaktoren getroffen werden. Dennoch ist bereits die begrenzte Information aus der Simplex-Optimierung zu einer "Nach-Optimierung" mittels sukzessiver Verfahren heranziehbar. So wurde beispielsweise der Einfluß der Folsäure auf die Volumenaktivität wegen der Hinweise aus der Simplex-Optimierung auf eine aktivitätssteigernde Wirkung sukzessiv in kontinuierlicher Kultur überprüft (vergl. Kap. 4.4.2).

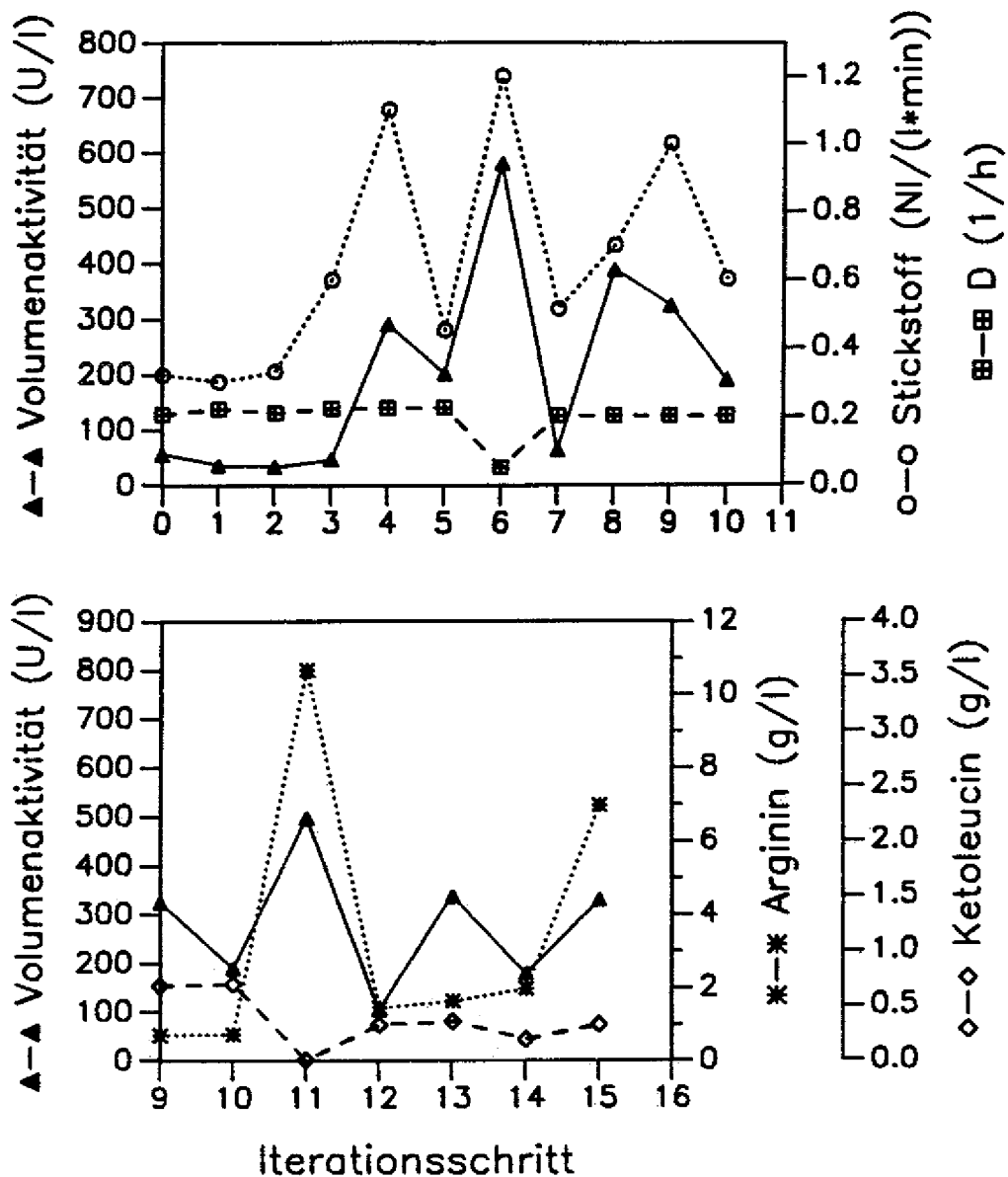
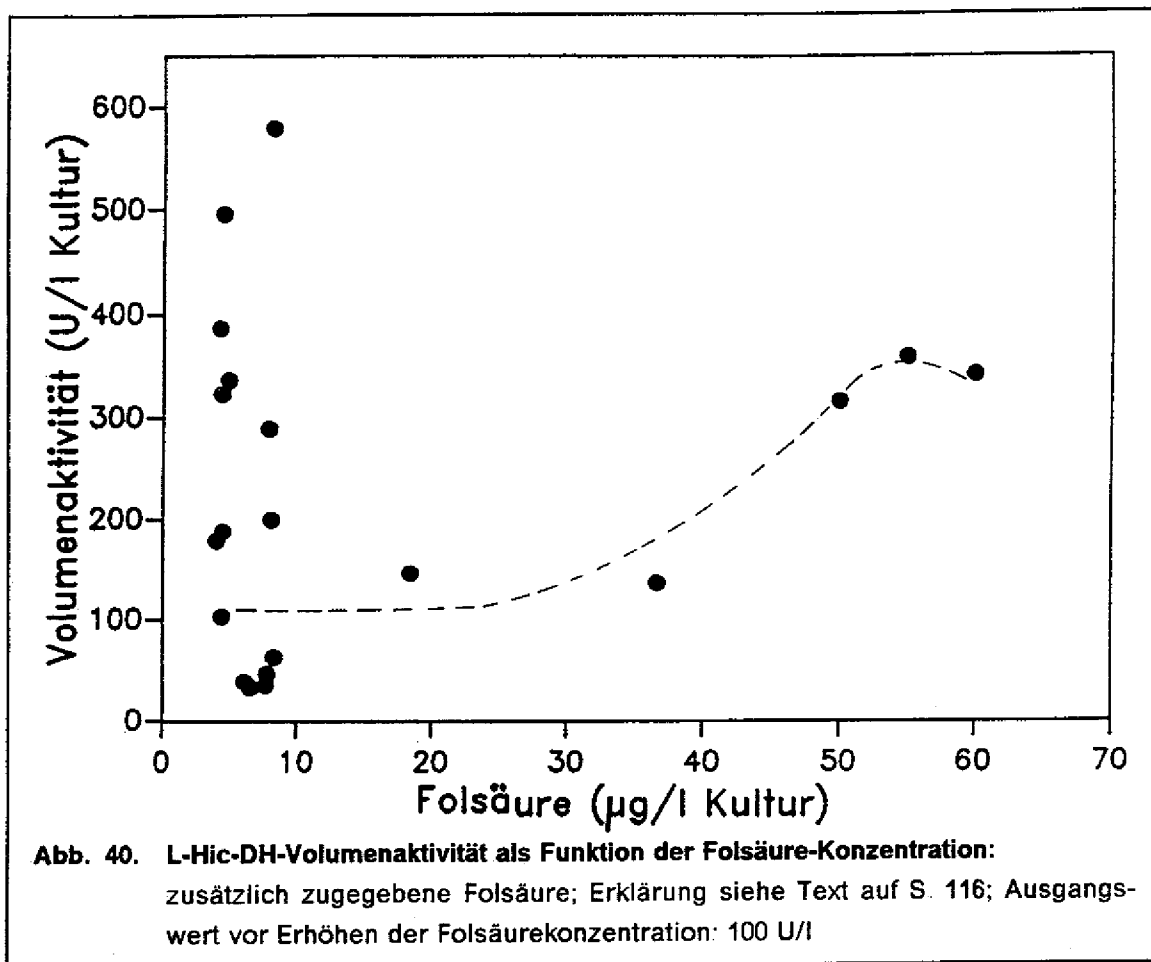


Abb. 39. Verlauf von Faktoren im Vergleich zur Volumenaktivität:
 a): Verlauf von Stickstoffbegasung und Verdünnungsrate D im Vergleich zur Enzymaktivität nahe der Iteration 6
 b): Verlauf von Arginin und Ketoleucin im Vergleich zur Enzymaktivität nahe der Iteration 11

4.3.6 Korrelation verschiedener Zielgrößen

Innerhalb der gemessenen Vertices ergab sich keine deutliche Korrelation zwischen der L-Hic-DH-Volumenaktivität und dem Lactat-, Arginin-Gehalt, dem Redoxpotential



und dem Laugeverbrauch. Gleiches gilt für das Trockengewicht. Dennoch traten die höchsten Volumenaktivitäten immer zusammen mit niedrigen Redox-Werten auf. Solche niedrige Werte können auch mit der Stickstoffbegasung zusammenhängen, denn ohne Begasung stieg das Redoxpotential in Vergleichsfermentationen um 100 - 150 mV.

Unter Miteinbezug der Werte aus kontinuierlichen Kulturen im MRS-Medium ergab sich eine gute Korrelation zwischen der A_{578} und dem Trockengewicht mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9668$. 0.234 g Trockengewicht pro l entsprechen dabei einer A_{578} von 1.

Die auf das Trockengewicht bezogene spezifische Aktivität ist schwach mit der auf das Protein im Rohextrakt bezogenen spezifischen Aktivität korreliert ($r = 0.8581$). 274.7 U/g Trockengewicht entsprechen 1 U/ mg Protein.

Mit dem Wachstumsparameter Trockengewicht ist die Volumenaktivität nur schlecht korreliert: $r = 0.7828$. 1 g Trockengewicht würde 180 U/l entsprechen. Der Zusammenhang mit der A_{578} fällt noch schwächer aus.

4.4 Anwendung der Erkenntnisse aus 3.2 und 3.3, Kostenminimierungsansätze

4.4.1 Mikrofiltration

Die maximale L-Hic-DH-Aktivität im Batch ist im Rahmen einer bestimmten Mediumszusammensetzung wachstumskorreliert: Erhöht man die Zuckerkonzentration im MRS-Medium nicht über 36 - 54 g/l, so erhöht sich die Volumenaktivität zusammen mit dem Trockengewicht (Abb. 17). Daher sollte in diesem Medium eine Methode zur Erhöhung der Zellmasse angewendet werden. Neben der Steigerung der Zelldichte im Fermenter durch Filtration sollte auch das im Überstand befindliche Lactat entfernt werden, um eine Anhäufung des möglicherweise toxischen Endproduktes zu vermeiden.

Nach dem Ende der exponentiellen Phase, erkennbar an der verlangsamten A_{578} -Zunahme, dem verlangsamten Laugeverbrauch und dem stagnierenden Redoxpotential, wurden die Zellen auf circa 1/10 ihres Ausgangsvolumens eingengt und mit frischem, eine Stunde lang autoklaviertem Nährmedium der gleichen Zusammensetzung wie zuvor aufgefüllt. Dabei wurden sie beim ersten Filtrationsschritt von 4.5 l auf 0.5 l eingengt und auf 5.5 l aufgefüllt und beim zweiten Schritt auf 0.7 l eingengt und auf 10.5 l aufgefüllt. Sinn des ersten Filtrationsschrittes war neben der Entfernung des Lactates die Erhöhung der Biomassekonzentration. Ziel des zweiten Filtrationsschrittes war es, die absolute Endmenge an Zellen durch Erhöhen des Fermentationsvolumens zu steigern. Somit wurden bei Einsatz von insgesamt 20 l MRS-Medium und einer Fermentationsdauer von 11 Stunden 121 g Feuchtgewicht herangezogen. Eine Erhöhung der Biomassekonzentration im zweiten Filtrationsschritt wäre nur durch Verwendung eines höher konzentrierten Nährmediums möglich, da aufgrund der nun höheren Zellmasse auch mehr Nährstoffe benötigt werden. Abb. 41 zeigt, daß sich nach der ersten Filtration A_{578} und Volumenaktivität 1.31 bzw. 1.34 fach auf 1016 U/l bzw. $A_{578} = 10.23$ erhöhen lassen, aber nach einem zweiten Filtrationsschritt diesen Wert, wie oben erklärt, nicht mehr überschreiten. Die absinkende A_{578} nach beiden Filtrationsschritten ist durch die Verdünnung mit frischem Nährmedium erklärbar. Die höchste spezifische Aktivität betrug 1.47 U/mg Protein im Rohextrakt. Im Gegensatz zur Aktivität und zum Wachstum stieg die Lactatproduktion nach dem 2. Schritt noch deutlich auf 312 mmol Lactat/l an. Dies hat einen erhöhten Laugeverbrauch zur Folge. Während der gesamten vorliegenden Untersuchungen wurde kaum eine höhere Lactatkonzentration im Kulturüberstand festgesellt (vergl. Tab. 15, Abb. 27).

Trotz Verwendung zweier Filter werden 20 - 25 min für die Filtration und das Auffüllen mit Medium benötigt, da der Filtratstrom schnell absinkt (Abb. 41b). Bei längerer Filtrationsdauer würde die Enzymaktivität absinken. Bei der zweiten Filtration tritt

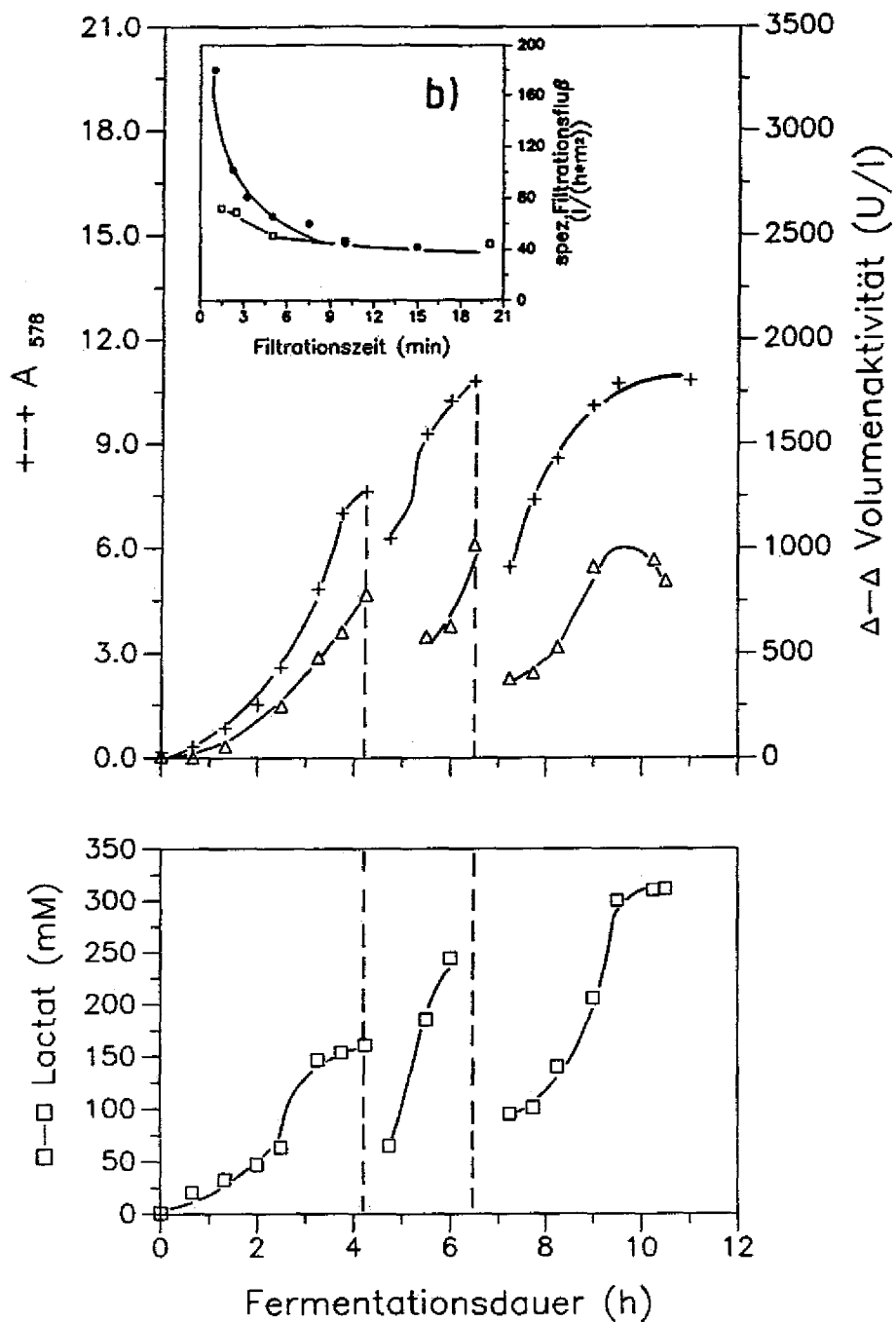


Abb. 41. Repeated Batch mit Mikrofiltration: a): Wachstum in MRS-Medium (deMan), pH 6.5, $T = 30^\circ C$, $0.2 \text{ NI N}_2/(l \times \text{min})$, Anfangsvolumen 4.5 l; unterbrochene Linie Filtrationsschritt; Einengen auf 0.5 bzw 0.7 l; Auffüllen auf 5.5 bzw 10.5 l
b): Filtrationskinetik des Sartocor-Mini-Moduls bei *Lactobacillus confusus*
Filtrationsfläche: 0.2 m^2 , feed: 5 l/min , Überstromgeschwindigkeit: 5 cm/s , Transmembrandruck: 0.4 bar , Filter: Zelluloseacetat-Sartopure PP Mini mit $0.2 \mu\text{m}$ Porengröße; o: erste Filtration, □: zweite Filtration

eine deutliche Verschlechterung der Filtratsleistung ein, obwohl das Filtrationsmodul zwischenzeitlich mit sterilem Wasser gespült worden war. Bei mikroskopischer Kontrolle erschienen die Zellen nicht deformiert.

Im ersten Teil des Versuches vor dem Filtrationsschritt ist die Bildung der L-Hic-DH auch während der Fermentation mit dem Trockengewicht gekoppelt. Dies erklärt sich aus gleichen Anlaufphasen, Enzymbildungs- bzw. spezifischen Wachstumsraten $\mu_{\max} = 0.87 \text{ h}^{-1}$ für beide Parameter. Bei keiner anderen Batch-Fermentation (Kap. 4.2.1.2) war eine solche Kopplung während des Wachstums aufgetreten.

Während die Beziehung zwischen Volumenaktivität und Trockengewicht daher während des Wachstums linear ansteigt, ist der Zusammenhang zwischen spezifischer Aktivität pro mg Protein im Rohextrakt und Trockengewicht nur anfangs linear. Die Ursache hierfür liegt in einem im Vergleich zum Trockengewicht zunächst linear, dann aber schwächer ansteigenden Gesamtzellprotein.

4.4.2 Kostenminimierung in Batch-Kulturen und kontinuierlichen Kulturen

Das Fermentationsmedium kann einen hohen Anteil zu den Gesamtkosten der Enzymproduktion beitragen. Bei manchen Fermentationen verursacht allein die C-Quelle 25 - 75 % der Fermentationskosten (Brock, 1990), und im vorliegenden Fall verteuern besonders die komplexen Extrakte die Produktionskosten. Daher wurde versucht, mittels der zuvor gewonnenen Erkenntnisse ein billigeres Medium zusammenzustellen.

	MRS-Medium	M ₂ -Medium	Verlust (%)
Batchkultur			
$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0.72	0.28	61
$t_d (\text{h})$	0.96	2.5	-
A_{578}	5.54	5.33	4
Trockengewicht (g/l)	1.33	1.26	5.2
Volumenaktivität (U/l)	1256	133	89
spezifische Aktivität (U/mg Prot. i. RE) (U/g Tg)	2.65 940	1.06 106	60 89
Kontinuierliche Kultur ($D = 0.25 \text{ h}^{-1}$)			
Feuchtgewicht (g/l)	11.05	3.98	64
Trockengewicht (g/l)	2.1	0.69	67
Volumenaktivität (U/l)	223	44	80
spezifische Aktivität (U/gTg)	106	64	40

Tab. 22. Vergleich von Wachstum und Enzymaktivität im Voll- und minimierten Medium: MRS-Medium nach deMan, M₂-Medium nach Hummel, beide bei T = 30 °C, pH 6.5, 260 upm und mit 18.2 g Glc/l

Hummel et al. (1983) geben für die Kostenverringerung beim Übergang vom MRS-Medium (nach Hummel) zum M₂-Medium (Tab. 2) einen Faktor von 3.6 laut Bulkpreisen von 1982 an. Diese Kostenverringerung wird weitgehend durch das Herabsetzen der Konzentration an komplexen Extrakten von 25 auf 10.5 g/l (10 g Hefeextrakt und 0.5 g Fleischextrakt pro l) bewirkt. Die von den Autoren untersuchte D-LDH-Aktivität von Lactobacillus confusus nimmt im geänderten Medium nicht ab. Im Gegensatz hierzu ist der Aktivitätsverlust für die L-Hic-DH-Aktivität sowohl im Batch als auch im kontinuierlichen Verfahren beim Übergang vom MRS-Medium (deMan) zum M₂-Medium (Hummel et al, 1983) gravierend (Tab. 22). Dabei wird die Zellmasse weniger als die Enzymaktivität betroffen, wie die gleichbleibende A₅₇₈ im Batch zeigt.

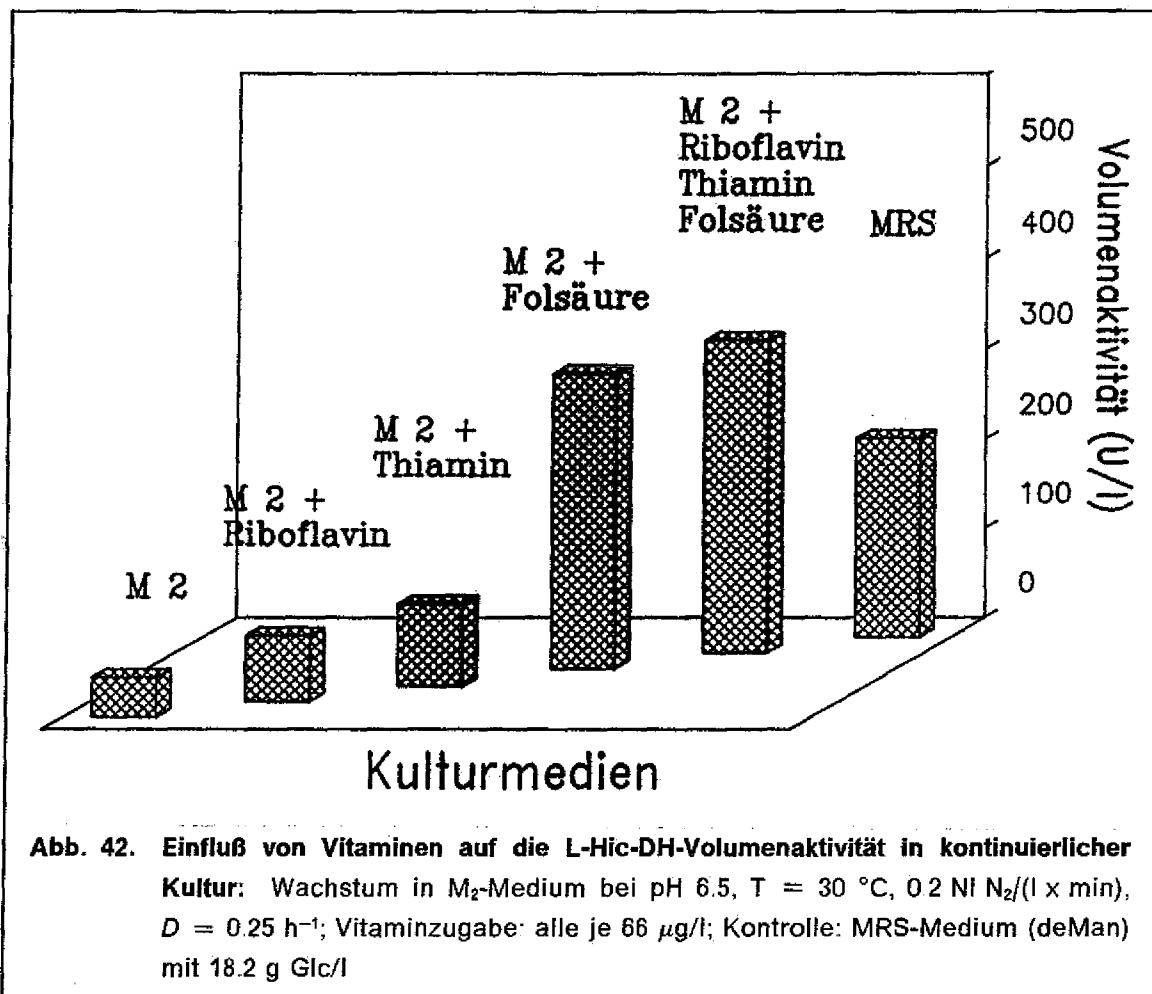
Der drastische Aktivitätsverlust bei in M₂-Medien wachsenden Zellen kann durch Vitaminzugabe ausgeglichen werden. Besonders wirksam war Folsäure, deren aktivitätssteigernder Einfluß bereits während der Simplex-Optimierung erkennbar war und der hier sukzessive nachgetestet wurde. Allein durch Zugabe dieses einen Vitamines steigt also die Volumenaktivität um den Faktor 7.9. Durch die Zugabe von Folsäure bzw. einem Gemisch der drei Vitamine Folsäure, Riboflavin und Thiamin läßt sich sogar die Aktivität im MRS-Medium übertreffen. Die spezifische Aktivität steigt dabei von 0.36 U/mg Protein i. RE auf 1.77 U/mg (4.9-fach) bzw 1.7 U/mg Protein i. RE und das Trockengewicht von 0.69 g/l auf 1.1 g/l (1.6-fach).

Nur im Falle des Wachstums ohne Vitamin oder mit Riboflavin bleiben 1.8 bzw 2.0 g Rest-Gucose im Kulturüberstand liegen.

Die Zugabe von Folsäure (Merck, für biochemische Zwecke, 5 g 17.80 DM, Preis 1988) würde bei einer Konzentration von 66 µg/l Kultur eine 1000 l-Fermentation nur um 0.24 DM verteuern. Die Kosten für die Filter zur sterilen Zugabe des Vitamins müßten noch zugerechnet werden: Diese würden bei einem Liter Vitaminlösung circa 15 DM, also mehr als der eigentliche Vitaminpreis, betragen. Das minimierte Medium mit Folsäure ist 5-fach billiger als das MRS-Medium.

Mit diesem M₂-Medium unter Folsäurezugabe gelang eine kontinuierliche Enzymproduktion bei $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$ und $V = 1 \text{ l}$ mit einer Produktivität von 76 U/(l·h) entsprechend einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1812 U/d. Bei dieser Produktion wurden Zellen aus dem Overflow der kontinuierlichen Kultur im Eisbad über drei Tage gesammelt. Der Lagerverlust betrug nur 6 % der anfangs gemessenen Aktivität von direkt aus dem Fermenter entnommenen Zellen. Für eine Aufarbeitung im Labormaßstab werden circa 4000 U benötigt, so daß selbst bei dem vorliegenden kleinen Fermentationsvolumen nach drei Tagen bereits eine ausreichende Enzymmenge produziert ist. Die Zugabe des obigen Vitamingemisches zu Batchkulturen in MRS-Medium konnte die maximale Volumenaktivität nicht erhöhen.

Alle Ansätze wurden noch hinsichtlich ihrer Aminosäureaufnahme betrachtet, um diese mit der Aufnahme im MRS-Medium und untereinander vergleichen zu können.



Das M₂-Medium enthält 50 % weniger Typtophan und Leucin als das MRS-Medium. Typtophan ist besonders viel in Casein enthalten.

In Batch-Kulturen mit niedrigem Glucose-Gehalt werden in beiden Medien besonders aromatische Aminosäuren sowie Histidin und Methionin mit teilweise unterschiedlicher Aufnahmepräferenz aufgenommen. Im MRS-Medium wird Aspartat am zweitstärksten aufgenommen, während diese Aminosäure im M₂-Medium ausgeschieden wird.

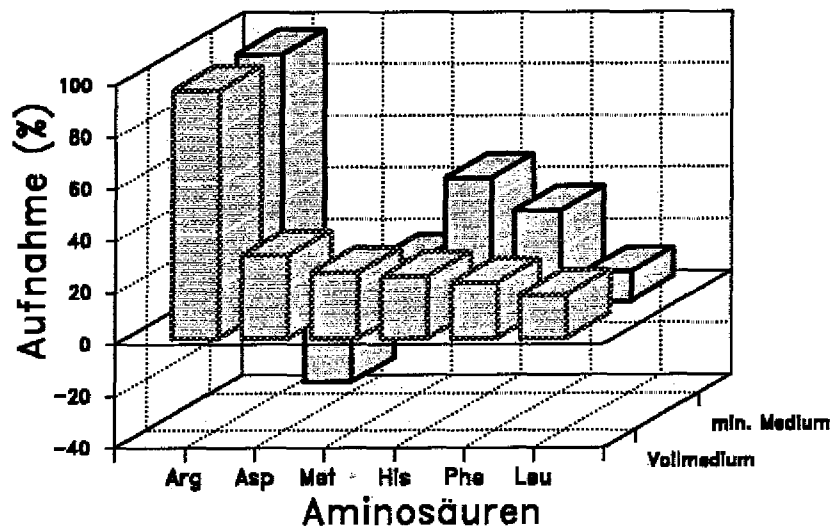


Abb. 43. Vergleich der Aminosäure-Aufnahme im Voll- und minimierten Medium:
 vorderer Balken: Aufnahme in M₂-Medium, hinterer Balken: MRS-Medium (deMan); 100 % = Aminosäurekonzentration zum Animpfzeitpunkt, Aufnahme: nach oben, Bildung nach unten; bei pH 6.5, T = 30 °C, 0.2 l N₂/(l x min), beide Medien mit 18.2 g Glc/l

5. Diskussion

Die Steigerung einer fermentativen Enzymproduktion am Beispiel des intrazellulären Enzyms L-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-Hic-DH) beim heterofermentativen Milchsäurebakterium Lactobacillus confusus gestaltete sich aufgrund der vielseitigen Nährstoffansprüche und der Komplexität des Stoffwechsels als ein Vielfaktorenproblem. Mehr noch als um das eigentliche Erzielen einer maximalen Enzymaktivität selbst ging es in der vorliegenden Arbeit darum, einen Lösungsweg zur Optimierung von Nährmedien und Kulturbedingungen aufzuzeigen, der der Komplexität eines Vielfaktorensystems gerecht wird. Im wesentlichen werden nachfolgend die sukzessive Variation möglicher Einflußfaktoren auf die Enzymaktivität und das Optimieren des Wachstums nach einem mathematischen Modell zusammen diskutiert und mit den Ergebnissen zur simultanen Variation von Einflußfaktoren durch das Simplexverfahren verglichen.

Will man ein solches Problem, wie derzeit in der Biologie allgemein üblich (Mathieu und Phan tan Luu, 1976) und im ersten Teil der Arbeit auch angewendet, mit sukzessiven Optimierverfahren unter Variation eines Parameters und unter weiterführender Variation des nächsten Parameters oder auch durch Optimieren nach einem mathematischen Modell angehen, müssen an erster Stelle neben dem physiologischen Umfeld des Enzyms die möglichen Ursachen der Begrenzung der Enzymaktivität hinterfragt werden.

Die eventuelle physiologische Rolle des Enzyms gibt nur wenig Hinweise auf einen Ansatzpunkt für die Optimierung, da die Rolle der L-Hic-DH wie die von vielen anderen bakteriellen α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen derzeit unbekannt ist (Hummel und Kula, 1989). Eine direkte Beteiligung der L-Hic-DH am Fettsäurestoffwechsel ist unwahrscheinlich, da zu den bevorzugten Substraten der L-Hic-DH C_5 - und C_6 -endständig verzweigte α -Hydroxysäuren und α -Ketosäuren, nicht aber langkettige β -Hydroxysäuren zählen. Die Vermutung, die L-Hic-DH könne mit dem Aminosäurestoffwechsel, speziell dem Leucinstoffwechsel, in Zusammenhang stehen (Kula, 1986), wird durch Befunde gestützt, nach denen sowohl im Leucinaufbau bei Bacteroides ruminicola und bei Peptostreptococcus elsdenii (Allison et al., 1966) als auch im anaeroben Aminosäureabbau bei Clostridien und Milchsäurebakterien (Arbeitsgruppe Buckel, Einzelzitate nachfolgend) die Umsetzungen von α -Hydroxysäuren zu den entsprechenden Ketosäuren bzw. die Umkehrreaktionen vorkommen. So kann der anaerobe Abbau von Aminosäuren mittels Aminosäure- und Hydroxysäure-Dehydrogenasen hin zu kurzkettigen Carbonsäuren, Ammonium und CO_2 führen (Barker, 1981). Dieser Abbau kommt sowohl bei Aminosäure- oder Peptidverwertern als auch bei auf Zucker und Peptid angewiesenen Organismen vor. Beispielsweise ist ein solcher Abbauweg für Glutamat sowohl bei Gram-positiven Bakterien wie bei Peptostreptococcus asaccharolyticus oder Clostridium sphaeroides

(Wohlfahrt und Buckel, 1985; Buckel und Barker, 1974; Buckel 1980), bei Clostridium symbiosum (Buckel und Semmler, 1983) oder bei Acidaminococcus fermentans als auch bei Gram-negativen Bakterien (Beatrix et al., 1990) bekannt. Hinweise, daß manche Bakterien auch Leucin, Serin, Cystein, Threonin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Histidin über diesen Weg abbauen, finden sich bei Schweiger et al. (1987). Der Aminosäureabbau kann dabei über den Aufbau eines elektrochemischen Na^+ -Gradienten zu einem gewissen ATP-Gewinn führen (Buckel und Liedtke, 1986). Beim Gram-negativen Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum wird die für den Zuckertransport erforderliche proton motive force durch die Aminosäurevergärung geschaffen (Robrish und Thomson, 1989).

Für einen Zusammenhang mit dem Leucinstoffwechsel sprechen auch die Befunde aus der simultanen Faktorenvariation. Die Zunahme des vorgeschlagenen Isoleucin-Zusatzes und die Abnahme der vorgeschlagenen Leucin-Zugaben stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen an einem weit verbreiteten Leucin-Synthese-Weg, dem Isopropylmalat-Weg, unter anderem auch bei Streptococcus lactis. Hiernach hemmt Leucin die Synthese und Isoleucin wirkt dieser Hemmung in vivo und in vitro entgegen (Wiegel und Schlegel, 1977; Calvo, 1983). Valin, welches eigentlich auch die Synthese fördern müßte, wird unter Umständen wegen seiner allgemein toxischen Wirkung bei fortschreitender Simplex-Optimierung in immer niedrigeren Konzentrationen vorgeschlagen. Eine Induktion des üblicherweise vorkommenden Leucin-Abbaus durch Isoleucin ist bei Bacillus subtilis bekannt (Poralla, 1971). Eine mit der L-Hic-DH-Aktivität korrelierte Isoleucin-Aufnahme konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ebenso wenig war die Isoleucin-Menge im Außenmedium mit der Aktivität korreliert. Hier könnten aber auch eventuell stärker aktivierende Faktoren die Isoleucinwirkung überdeckt haben, zumal die übrigen Mediumsbestandteile ständig wechselten. ATP-Gewinn, Transportvorgänge (s.o.) oder eine NH_4^+ -Erzeugung könnten also Sinn solcher Abbaureaktionen sein. Auch eine Einschleusung der entstehenden kurzen Carbonsäureeinheiten in die Fettsäuresynthese, so wie sie für den allerdings aeroben Abbau von Leucin bei Bacillus subtilis von Obermeier und Poralla (1976) gefordert wurden, ist vorstellbar. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten von 100 - 2500 mU/mg Protein im Rohextrakt aufgebrochener Zellen sprechen dabei eher für eine Beteiligung an Abbau- als an Aufbaureaktionen. Am Anabolismus beteiligte Enzyme weisen in der Regel Aktivitäten von weniger als 1 mU/mg Protein auf.

Eventuell trägt die L-Hic-DH statt zum Aminosäureabbau ganz generell zur Regeneration von NADH aus dem Zuckerabbau bei, besonders dann, wenn dessen Regeneration durch die Lactat-Dehydrogenase nicht mehr gewährleistet ist. Solch ein Fall tritt in Batch-Kulturen beispielsweise ein, wenn trotz noch vorhandenen Zuckers die durch die Gärungsprodukte verursachte Endprodukthemmung (Pirt, 1975) eine Regeneration via Lactat physiologisch unsinnig erscheinen läßt. In einem solchen Zusammenhang könnte die Ausscheidung von Hydroxyisocaproat nach Aufnahme

extern beigefügten Ketoisocaproats bei hohen Temperaturen in kontinuierlicher Kultur gesehen werden.

In jedem Fall scheint die L-Hic-DH-Aktivität zusammen mit einem funktionierenden Glucose-Stoffwechsel vorzukommen, worauf die 100-fach höhere Aktivität bei Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Xylose hinweist. Die Verwertung von C₅-Zuckern ist bei heterofermentativen Lactobacillen bekannt (Kandler, 1982). Der hohe Aktivitätsverlust beim Übergang zur Xylose als C-Quelle könnte auf dem Verlust der Zellmasse und zusätzlich auf der verschlechterten L-Hic-DH-Bildung auf Xylose oder einer Gesamtverringerung aller Enzyme der Zelle beruhen. Auch bei dem Lactobacillus confusus ähnlichen Organismus Leuconostoc mesenteroides kommt es beim Wachstum auf Xylose statt auf Glucose zu einer Verringerung der physiologischen Aktivität, die sich in einer etwa 8-fach niedrigeren Aktivität der Ethanol-bildenden Enzyme äußert (Ito et al., 1974). Über ähnlich niedrige optische Dichten wie bei Lactobacillus confusus berichtet auch Schepers (1985), wenn die heterofermentativen Milchsäurebakterien Lactobacillus brevis, Leuconostoc mesenteroides auf Xylose wachsen. Bacillus macerans dagegen ist hinsichtlich der Ethanol-Bildung aus Xylose, die zur Verwertung pflanzlicher Rückstände erwünscht ist (Clausen und Gaddy, 1983), den erwähnten Milchsäurebakterien deutlich überlegen (Schepers, 1985). Das geringe Wachstum auf Xylose, das zusätzlich zum Ethanol entstehende Lactat und die mangelnde Arabinoseverwertung - im Gegensatz zu anderen Lactobacillus confusus-Stämmen (Sharpe et al., 1972) - machen Lactobacillus confusus DSM 20196 nicht für den direkten Einsatz bei der Ethanol-Produktion aus Abwässern der Holzindustrie interessant. Allenfalls könnte die den Pentoseabbau codierende Gensequenz für Klonierungen in Ethanol-Produzenten von Interesse sein, denen damit die Fähigkeit zur Verwertung ihnen sonst nicht zugänglicher C-Quellen verliehen würde.

Versuche zur Förderung der Enzymaktivität mußten also weitgehend unabhängig von der Frage des physiologischen Umfeldes des Enzymes durchgeführt werden. Als mögliche Ursachen der begrenzten Enzymaktivität sind Limitierungen im Nährmedium, Produkt- oder Substratinhibitionen oder Proteasewirkungen vorstellbar. Im Laufe der vorliegenden Arbeit erschienen eine Wachstumsinhibition durch zu große Substrat-, hier Glucose-Konzentrationen, und eine schädigende Einwirkung von Proteasen weniger wahrscheinlich. Die zum Teil hochdosierten Glucose-Gaben (bis zu 80 g Glucose $\times$ H₂O/l) führten z.B. nicht zu einer Inhibierung des Wachstums, denn im Falle einer Substratinhibierung hätten sich steigende Zuckeranfangskonzentrationen auf eine Verlängerung der Anlaufphasen in Batch-Kulturen ausgewirkt (Andrews, 1968). Ebenso wenig ergibt die Einführung eines Substratinhibitionstermes bei der Modellierung des Wachstumsverhaltens in kontinuierlicher Kultur eine bessere Anpassung der mit dem Modell errechneten Werte an die Meßwerte. Die experimentellen Daten bestätigen die fehlende

Substratinhibierung: Die Wachstumsrate μ , die im steady state der kontinuierlichen Kultur der Verdünnungsrate D entspricht, fiel in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei sehr hohen Zuckerkonzentrationen nicht wieder ab, wie bei einer Substratinhibition zu erwarten gewesen wäre (Andrews, 1968).

Die Untersuchung der anderen genannten Ursachen der niedrigen Enzymaktivität kann stark vereinfacht werden, wenn erstens bei einem Vergleich der Aktivität mit der Zellmasse eine Wachstumskopplung des Enzyms auftritt. Dann nämlich muß nur noch die Wachstumslimitierung aufgehoben werden. Bleibt zusätzlich zweitens die Zellgröße konstant und überdecken drittens Produktinhibitionen nicht Mediumslimitierungen (von Eysmond, 1990), so erlauben diese Voraussetzungen eine turbidostatische Medien-Optimierung - wie z.B. bei Corynebacterium glutamicum (Büchs, 1988) - mit anschließender Zellmasseerhöhung durch Zellrückhaltungsmethoden. Für diese gibt es mittlerweile auch bei Milchsäurebakterien (Major und Bull, 1985; Vick Roy, 1983; Ohleyer et al., 1985) oder bei Essigsäurebildnern (von Eysmond et al., 1990; de Raucourt et al., 1989b) etliche Beispiele.

Von diesen drei Bedingungen waren zunächst keine erfüllt, auch wenn der parallele Verlauf der L-Hic-DH-Volumenaktivität mit den Wachstumsparametern in der Batch-Kultur und das Vorhandensein des Enzyms bereits zum Animpfzeitpunkt auf eine Wachstumskopplung des Enzyms hingedeutet hatten. Solange man die Volumenaktivität unter den verschiedensten Kultur- und Nährmedienbedingungen der Gesamtheit aller weit über 100 steady-state-Einstellungen in kontinuierlicher Kultur mit dem Trockengewicht, dem Naßgewicht, dem Gesamtzellprotein oder der Adsorption bei 578 nm vergleicht, ergibt sich keine eindeutige Korrelation. Dies liegt zum einen daran, daß sich neben der Volumenaktivität bei den meisten Meßpunkten der Optimierung auch die spezifische Aktivität bei wenig gesteigerter Zellmasse erhöhte, woraus eine höhere Aktivität pro Trockengewicht resultieren kann. Zum andern ist es möglich, daß L. confusus bei einigen Gleichgewichtseinstellungen auch aufgenommenen Zucker als Dextran gespeichert hat, wie für viele Stämme dieser Gattung beschrieben wird (Sharpe et al., 1972). Hierdurch würde eine zu geringe Volumenaktivität pro Trockengewicht vorgetäuscht. Von einer solchen Reservestoffbildung ist bei den im Standard-Lactobacillen-Medium MRS nach deMan (1961) durchgeführten Versuchen nicht auszugehen. Die aufgenommene Glucose fand sich immer gleichmolar im gebildeten Lactat wieder. Der heterofermentative Stoffwechsel setzt im allgemeinen Glucose zu einem Mol Lactat, CO₂ und Ethanol um, wobei die Ethanol-Bildung auch teilweise durch eine Acetat-Bildung ersetzt sein kann. In diesem Medium geht die Enzymaktivität nicht konform mit dem Wachstum einher, denn die Enzymbildungsraten ändern sich je nach Glucose-Anfangskonzentrationen im Batch, die Wachstumsraten aber, wie nach Monod (1942) erwartet, bleiben gleich. Dennoch zeigt sich in diesem zur sukzessiven Faktorenvariation und zum Optimieren

nach einem mathematischen Modell eingesetzten Medium in gewissen Bereichen eine beschränkte Wachstumskopplung der L-Hic-DH, nämlich unterhalb bestimmter Zuckeranfangskonzentrationen in der Batch-Kultur und oberhalb einer bestimmten Verdünnungsrate in kontinuierlicher Kultur. In gewissen Bereichen können also Steigerungen der Zellmasse auch zur Verbesserung der Enzymaktivität führen, wie auch das Beispiel des durchgeführten repeated Batch mit Mikrofiltration bestätigt.

Bei der Suche nach Limitierungen fiel als erstes auf, daß das Wachstum des Organismus durch die C-Quellenunterbilanz des Nährmediums begrenzt wird. Deutlich wurde diese Tatsache bei der Erhöhung der Anfangs-Glucose im Verhältnis zum Proteinstickstoff (komplexe Extrakte) bei im Standardmedium wachsenden Batch-Kulturen.

Vergegenwärtigt man sich die stoffliche Zusammensetzung eines Einzellers (Schlegel, 1985), nach der die Zelle zu circa 50% aus Kohlenstoff und nur zu 14% aus Stickstoff besteht, so verwundert der geringe Glucose-Gehalt (18.2 g/l) im Vergleich zum Proteinstickstoff (25 g/l) des MRS-Mediums nach deMan. Selbst wenn man bedenkt, daß die Milchsäurebakterien die komplexen Extrakte auch zur Deckung ihrer Supplement-Bedürfnisse benötigen, kann der niedrige Zuckergehalt, der sich selbst in der Nährmedienempfehlung für Lacobacillus confusus im DSM-Katalog findet, nur erstaunen, zumal der Organismus bekannt für sein Vorkommen an zuckerreichen Standorten ist (Sharpe et al., 1972). Nur wenige Autoren setzen bisher das MRS-Medium mit im Verhältnis zu den komplexen Extrakten erhöhtem Gehalt an Zucker ein. Tilbury (1975) z.B. verwendet sogar 210 g (auf Glucose umgerechnete) C-Quelle im Verhältnis zu 15 g Proteinstickstoff. Im käuflichen MRS-Fertigmedium, welches die Glucose mitenthält, mag der geringe Zuckergehalt vielleicht zur Eindämmung von Maillardreaktionen (Brock, 1990) dienen, bei denen Aminogruppen mit reduzierenden Zuckern zu toxischen Produkten reagieren.

Oberhalb eines etwa zweifachen C-Überschusses weicht die maximal im Batch-Wachstum erreichbare Volumenaktivität von ihrer Wachstumskopplung ab und zeigt einen sprunghaften Anstieg. Auch in kontinuierlicher Kultur treten hohe Aktivitäten pro g Trockengewicht ab der Verdünnungsrate auf, ab der die Glucose nicht völlig aufgebraucht wird. Der Übergangsbereich, in dem die Glucose beginnt, im Medium liegenzubleiben, in der Batch-Kultur zwischen 54 - 72 g Anfangs-Glucose/l und in der kontinuierlichen Kultur oberhalb einer Verdünnungsrate von 0.3 h^{-1} , ist für die Optimierung des Enzyms interessant. Hier treffen hohe Volumenaktivitäten auf gleichzeitig hohe, auf das Zellprotein bezogene, spezifische Aktivitäten, die für eine Aufreinigung des Enzyms wichtig sind. Eine Erhöhung der C-Quellen-Konzentration über diesen Bereich hinaus, also über einen dreifachen C-Überschuß, ist jedoch wegen des unvollständigen Zuckerverbrauches im Sinne einer vollständigen Medienausnutzung nicht anzustreben.

Weitere mögliche Ursachen der Aktivitätsbegrenzung werden genau an dieser Stelle deutlich, an der die Glucose nicht mehr aufgenommen wird. Daß das Wachstum und infolgedessen die maximale Aktivität der Batch-Kultur sich hier über den 3-fachen C-Überschuß hinaus nicht weiter steigern läßt, kann zum Beispiel einerseits auf der einsetzenden Limitierung des nächsten ins Minimum geratenden Nährstoffes oder andererseits auf einer Produktinhibition beruhen. Die Annahme einer Produktinhibition liegt dabei nahe. Sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung selbst werden in anaeroben Fermentationen durch die Anhäufung der aus dem Zuckerabbau entstehenden organischen Säuren oder Alkohole herabgesetzt. Zum Beispiel sind Hefen, Milchsäurebakterien, Clostridien oder Enterobakterien usw. von einer solchen Endproduktinhibition betroffen (Herrero et al., 1983). Die inhibitorische Wirkung des im Gärungsstoffwechsel beim Abbau der Zucker produzierten Lactats auf das Wachstum von Milchsäurebakterien erkannten schon Luedeking und Piret (1959). Daß die Milchsäure tatsächlich einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum hat, wiesen Friedman und Gaden (1970) anhand der Erhöhung des Wachstums und der Säurebildung nach, wenn das entstehende Lactat durch Dialyse entfernt wurde. Die im vorliegenden Fall bei der höchsten Zuckerkonzentration im Laufe der Fermentation entwickelte Lactatkonzentration erreicht mit 28 g/l durchaus schon eine Konzentration, bei der bei anderen Milchsäurebakterien bereits eine Hemmung des Wachstums auftritt (Bibal et al., 1988).

An dieser Stelle sei zum Verständnis der Endproduktinhibition als möglicher Ursache der Wachstumsbegrenzung ein Seitenblick auf den Stoffwechsel und die Energetik des anaeroben, acidophilen Metabolismus der Milchsäurebakterien geworfen. Im Gärungsstoffwechsel beim Zuckerabbau produziertes ATP wird einerseits zum Aufbau einer proton motive force (PMF) (Kashket, 1985) genutzt. Dabei entsteht durch den über die ATPase vermittelten und ATP-verbrauchenden Protonenexport ein im Vergleich zum Außenmedium alkalischeres und negativ geladenes Cytosol. Protonen können im Antiport gegen K^+ -Ionen wieder in die Zelle gelangen, eine Voraussetzung zur Umwandlung des entstandenen Protonengradienten (ΔpH) in einen chemischen Gradienten ($\Delta \psi$) und zur Aufrechterhaltung von ΔpH (Mitchell, 1973). Andererseits wird das aus dem Zuckerabbau stammende ATP auch für zum Wachstum führende Biosynthesen benötigt. Bei Milchsäurebakterien wird noch zusätzlich zum oben beschriebenen Protonenexport über die ATPase ein Carriergebundener Symport von Protonen mit Lactat gefordert (Michels et al., 1979), der bei Streptococcus cremoris (ten Brink et al., 1982; Konings, 1985; Otto et al., 1982) zumindest bei hohen pH-Werten und niedrigen Lactat-Außenkonzentrationen nachgewiesen wurde. Dieser Lactatexport kann bei manchen Stämmen der Arten Streptococcus cremoris und Streptococcus faecalis zur Aufrechterhaltung der PMF beitragen (ten Brink et al., 1985). Alle Prozesse, die nun zu einer Verminderung der PMF (s.o.) oder zur Herabsetzung des von innen nach außen gerichteten Lactat-

Konzentrationsgradienten (ten Brink et al., 1982, 1985) führen, müssen zwangsläufig eine Verminderung des für das Wachstum zur Verfügung stehenden ATP nach sich ziehen und daher geringere Zellerträge zur Folge haben. Hierzu zählt z.B. eine Absenkung des pH-Wertes im Außenmedium durch die vom Stoffwechsel produzierten Säuren. Diese kann die PMF schädigen (Otto et al., 1983). Die mit sinkendem pH-Wert zunehmend undissoziiert vorliegenden organischen Säuren können frei in die Zelle diffundieren (Herrero, 1983) und dort wegen des alkalischeren Inneren dissoziieren. Wegen der hierbei freiwerdenden Protonen wird das Innere stark angesäuert. Es existiert eine artspezifische Grenze für die zellinterne pH-Wert-Absenkung (Kashket, 1987). Die Lactobacillen bzw. die Streptococcen tolerieren die extrem starke Erniedrigung ihres zellinternen pH-Wertes auf 4.4 bzw. 5.7. Diese Erniedrigung befähigt die Milchsäurebakterien zur Aufrechterhaltung des pH-Gradienten gegenüber dem Außenmedium, über den sie die Erhaltung ihrer für Transportvorgänge so wichtigen PMF garantieren (Kashket, 1987). Somit ist ein Wachstum auch noch bei niedrigen pH-Werten, wie z.B. in den durchgeführten Kolbenversuchen bei einem pH-Wert von 5.0 und im Laufe der Fermentation bis zu einem pH-Wert-Abfall auf einen pH-Wert von 4.3 möglich. Um das Zellinnere jedoch oberhalb eines physiologisch sinnvollen pH-Wertes zu halten und gewissermaßen der protonophoren Wirkung der entstehenden organischen Säuren zu entgehen, müssen unter Energieaufwand Protonen nach außen geschleust werden. Dies erklärt den niedrigeren Zellertrag von Fermentationen bei einem pH-Wert von 6.5 gegenüber 6.8 und den mit sinkendem pH-Wert abnehmenden Zellertrag im Kolben.

Auch im Falle der Erhöhung der Anfangs-Glucose in Batch-Kulturen sinkt der Ertragskoeffizient (Biomassebildung pro aufgenommener Glucose) in Übereinstimmung mit Befunden bei Streptococcus cremoris (Bibal et al., 1988), wenn die Glucose am Ende des Wachstums bei sehr hohen Glucose-Anfangskonzentrationen im Medium liegenbleibt, möglicherweise als Folge der Produktinhibition. Wegen der pH-Konstanthaltung scheidet jedoch der pH-Wert selbst als Schädiger der PMF, wie von Otto et al. (1983) gefordert, aus. Ebenso konnte durch die pH-Konstanthaltung auf einem hohen pH-Wert oberhalb von pH 6.5 der Anteil an undissoziierter Milchsäure im Kulturmedium sehr gering gehalten werden, so daß auch diese nicht als Ursache der Produktinhibition in Frage kommt. So traten in der Batch-Serie maximal 33 mg/l, im Batch mit Mikrofiltration und in kontinuierlicher Kultur bei niedrigen Verdünnungsraten maximal 62 - 65 mg undissoziierte Milchsäure/l auf. Über ähnlich niedrige Konzentrationen von maximal 150 mg undissoziierter Milchsäure/l berichten Bibal et al. (1988), wenn der pH-Wert bei einer Batch-Kultur von Streptococcus cremoris konstant gehalten wird. Diese Autoren wiesen nach, daß für die Herabsetzung der Wachstumsrate die undissoziierte Milchsäure nicht verantwortlich sein kann, auch nicht, wenn der pH-Wert auf einem niedrigen pH 5.3 festgehalten wird. Gätje und Gottschalk (1990) dagegen berichten im Falle nicht pH-statisierter Batch-Fermentationen von Lactobacillus helveticus über wesentlich höhere Konzentra-

tionen an undissoziierter Milchsäure zwischen 4.5 - 5.4 g/l (40 - 45 mM), wenn der Wachstumsstopp eintritt. Auch bei der Fermentation von Clostridium acetobutylicum im nicht-pH-statisierten Ansatz ist das Ende der Säureproduktion dann erreicht, wenn die Summe der undissoziierten Säuren (Essig- und Buttersäure) ähnlich hohe Werte von 50 - 60 mM erreicht hat (Terraciano und Kashket, 1986). Die undissoziierte Milchsäure und der pH-Wert sind also vermutlich nicht für die Wachstumsbegrenzung bei der höchsten Zuckeranfangskonzentration im Batch verantwortlich. Eventuell kommt es jedoch zu einem Rückstau des Lactates im Zellinneren wegen der sehr großen im Batch und repeated Batch gebildeten Mengen von 28.8 g/l (320 mM) im Außenmedium. Hier reicht möglicherweise der zum Transport erforderliche Lactatgradient nicht mehr aus. Auch wenn Milchsäurebakterien große intrazelluläre Lactat-Konzentrationen tolerieren können - bei Streptococcus cremoris wurden z.B. zu Beginn des Wachstums bis zu 200 mM Lactat in der Zelle festgestellt (ten Brink und Konings, 1982) - ist die Entfernung des Endproduktes nicht mehr gewährleistet. Über eine ähnliche Angleichung des Endproduktes Ethanol, infolgedessen das Wachstum von Hefen eingestellt wurde, berichtet Novak et al. (1981). Zur Wirkung des Lactats auf die Zellen von Lactobacillus confusus wird dann außerdem noch eine etwa gleich große Ethanol-Konzentration hinzutreten und die für Alkohole bekannte chaotrope Wirkung (Kashket, 1987; Herrero, 1983; Ingram und Buttke, 1984) auf die Zellmembran ausüben.

Gerade bei der Batch-Fermentation mit hoher Zuckeranfangskonzentration ist eine Wachstumsbegrenzung am Ende der exponentiellen Phase außer durch die soeben diskutierte Produktinhibition auch durch die Limitierung durch einen anderen Mediumsbestandteil als die C-Quelle möglich. Jedoch kann aufgrund der Batch-Versuche nicht zwischen einer Produktinhibition und einer Nährmedienlimitierung entschieden werden, zumal diese beiden Effekte nicht getrennt voneinander auftreten, sondern mit einer Verstärkung des inhibitorischen Effektes bei einer Nährmedienlimitierung zu rechnen ist (Bibal et al., 1988; Bibal et al., 1989a). In sehr "reichen" Medien mit hohem Gehalt an Proteinstickstoff und gleichzeitig hohem Zuckergehalt, entsprechend den hier vorliegenden Versuchen, wird jedoch die Wachstumsrate nur durch die Produktinhibition herabgesetzt (Bibal et al., 1989a). Im Zusammenhang mit der liegenbleibenden Glucose könnte eventuell die Ursache dafür zu suchen sein, daß die maximale L-Hic-DH-Aktivität bei hohen Glucose-Anfangskonzentrationen in Batch-Kulturen erst nach Erreichen der maximalen Zellmasse auftritt. Der mit dem Restzucker gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase noch mögliche Erhaltungsstoffwechsel (Pirt, 1975) entledigt sich seiner im Zuckerabbau entstehenden Reduktionsäquivalente statt über die Entstehung des schädlichen Lactats über die Reduktion von Ketosäuren. Oder, und dies entspräche der zweiten eingangs beschriebenen Hypothese zur physiologischen Rolle der L-Hic-DH, an die Stelle der Zuckervergärung tritt die der

Aminosäurevergärung, gewissermaßen als alternative Energiegewinnung. Hierauf könnte der nicht weiter abnehmende Zuckergehalt in der stationären Phase deuten. Im Falle einer Nährmedienlimitierung könnte der Aminosäureabbau analog zu oben für eine weitere ATP-Lieferung sorgen.

Im Gegensatz zu den für Batch-Kulturen diskutierten beiden möglichen Ursachen der niedrigen Enzymaktivität, der Produktinhibition oder der Limitierung durch eine andere Komponente als der C-Quelle, ist in chemostatischer Kultur die Produktinhibition klar die Ursache der abnehmenden Bakteriendichte x von $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ zu niedrigeren Verdünnungsraten hin (vergl. auch Abb. 25, 27). Im Chemostaten wird die Biomasse durch das limitierende Substrat bestimmt. In der vorliegenden Arbeit war die C-Quelle und nicht eine andere Komponente als der limitierende Faktor identifiziert worden. Bei niedrigen Verdünnungsraten wird der gesamte zur Verfügung stehende Zucker aufgenommen, und die hieraus produzierten Säuren und Alkohole können ihre volle Hemmwirkung entfalten. Eine Simulation der Bakteriendichte nur mittels der herkömmlichen Monod-Kinetik (Gl. 2.6) durch die alleinige Beschreibung über das limitierende Substrat, würde keine Abnahme der Bakteriendichte im erwähnten Bereich vorsehen. Ein Glucose-Verbrauch für Erhaltungsstoffwechselzwecke (Pirt, 1975), der bei niedrigen Verdünnungsraten ebenfalls zur Verminderung der Biomasse führen kann, ist wie in Kap 4.2.2.5 dargestellt, vernachlässigbar. Pirt (1975) definiert den Energieverbrauch für Maintenance-Zwecke als den im Ruhezustand für Zellen aufgenommenen Energieanteil, der für zellinterne turn-over-Vorgänge und zur Aufrechterhaltung von Gradienten benötigt wird. Diese Definition ist bei Säurebildnern ohnehin kritisch, da selbst bei nicht wachsenden, in Puffer befindlichen Zellen, die nur Zucker zu ihrer Erhaltung bekommen, schädliches Lactat entsteht und somit in die Maintenance-Energie auch ein beträchtlicher Anteil zum Verhindern der Produktinhibition einfließt.

Betrachtet man das Wachstum zu höheren Verdünnungsraten hin, so ist dieser Bereich von einem zunehmenden Substratüberschuß gekennzeichnet, da die Organismen die Glucose nicht schnell genug aufnehmen können. Gleichzeitig nimmt die Produktinhibition ab, da wegen der geringeren Aufnahme weniger Substrat umgesetzt wird. Auffällig erscheint dabei erstens der frühe Anstieg des im Kulturüberstand liegenbleibenden Restsubstrates bereits vor Erreichen des maximalen Bakterienausstoßes - eine Beobachtung, die im Gegensatz zur Theorie des Chemostaten (Herbert et al., 1958; Tempest und Herbert, 1965) steht. Hiernach beginnt das Substrat im Überstand erst bei Verdünnungsraten oberhalb des maximalen Bakterien-Outputs und damit kurz vor dem Auswaschpunkt zu steigen. Zweitens ergibt sich ein scharfes Biomassemaximum, obwohl die Biomasse laut Theorie des Chemostaten über einen großen Verdünnungsratenbereich konstant bleiben müßte. Dieses Phänomen des schleichenden Auswaschens der Kultur, welches bei Milchsäurebakterien, wie z.B. Streptococcus cremoris (Bibal et al., 1989b) oder auch bei

Essigsäurebildnern wie Acetogenium kivui (von Eysmond et al., 1990) immer wieder in kontinuierlicher Kultur vorkommt, und welches meist von einem früh ansteigendem Restsubstrat begleitet wird, kann mehrere Ursachen haben:

- Wandwachstum (Fiechter, 1981): Diese nicht nur für Säurebildner typische Ursache des frühen Auswaschens scheidet für die vorliegende Kultur aus, da alle steady-state-Meßpunkte mit neugestarteten Kulturen spätestens 3 - 5 Tage nach dem Animpfen aufgenommen wurden. Diese Zeitspanne reicht für eine Gleichgewichtseinstellung, nicht jedoch zur Bildung eines Zellwandbelages aus.
- Versteckte Limitierungen (Fiechter, 1981): Solche Limitierungen, die die Biomasse ebenfalls mindern würden, waren ausgeschlossen, da die C-Limitierung deutlich nachgewiesen war.
- Substratinhibition (van den Heuvel und Beeftink, 1983; Andrews, 1968): Die bei steigenden Verdünnungsraten hohen Substratkonzentrationen im Kulturüberstand sind häufig Ursache einer Wachstumsminderung, hier wie oben diskutiert, aber nicht.
- Produktinhibition (Pirt, 1975): Während bei niedrigen Verdünnungsraten die Produktinhibition klar für das Abknicken der Biomasse verantwortlich war, ist bei mittleren Verdünnungsraten etwas oberhalb des Biomassemaximums ebenfalls eine, wenn auch geringere Produktinhibition eine mögliche Ursache der theoretisch erreichbaren Biomasse. Schwer verstehen kann man jedoch den langsamen, fast linearen Abfall der Biomasse bei noch höheren Verdünnungsraten. Bei diesen wäre infolge der abnehmenden Inhibitor-Konzentrationen keine stärkere Abweichung vom Biomassemaximum zu erwarten. Unter Umständen besteht bei höheren Verdünnungsraten wegen der dort herrschenden Streßsituation, in der die Organismen gegen das Ausgewaschenwerden anwachsen müssen, ein erhöhter Energiebedarf für die durch das konzentrierte Medium stimulierte Substrataufnahme und Produktausscheidung. Zucker würde dann abgebaut, aber in geringem Maße in Zellmasse umgesetzt, ähnlich, wie man sich eine Substrataufnahme für Maintenance Zwecke vorstellt. Bibal, Kapp et al. (1989) vermuten einen solchen Zusammenhang für Streptococcus cremoris in Medien mit hohem Proteinstickstoff- und Kohlenstoffgehalt in kontinuierlicher Kultur. Tatsächlich tritt dieser schleichende Biomasseabfall nicht mehr auf, wenn beim gleichen Organismus weniger konzentrierte Medien mit geringerem Proteinstickstoffgehalt (< 5 - 10 g/l) und C-Gehalt eingesetzt werden (Jørgensen und Nikolajsen, 1987; Rogers et al., 1978).
- hohe K_s -Werte (Fiechter, 1981): Die infolge hoher K_s -Werte verschlechterte Substrataufnahme kann zu einer geringeren Biomassebildung als bei einer vollständigen Substrataufnahme führen (vergl. auch Tempest, 1970). Daß hohe K_s -Werte tatsächlich den Anstieg des Restsubstrates, welches nicht aufgenommen wird, deutlich zu niedrigeren Verdünnungsraten hin verschieben können,

zeigt die Simulation des Substratanstieges im Ergebnisteil. Eine hundertfache Erhöhung des K_s -Wertes von 0.01 g/l (0.055 mM) auf 1.0 g/l (0.55 mM) läßt die Glucose bereits um $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ früher steigen. Der K_s -Wert 0.049 g/l ($2.72 \times 10^{-4} \text{ M}$), liegt also immer noch deutlich über dem üblichen Bereich von $10^{-5} - 10^{-6} \text{ M}$ (Fiechter, 1981). Da Lactobacillus confusus im natürlichen Habitat (Zuckerrohrsäfte) im Zuckerüberschuß lebt, ist er nicht auf einen rasche Aufnahme und Verwertung des Zuckers, zu der ein niedriger K_s -Wert erforderlich wäre, angewiesen. Bei höheren Verdünnungsraten hat der K_s -Wert jedoch keinen Einfluß auf das Verhalten des Restsubstrates im Überstand (vergl. Simulation in Abb. 30).

Ähnlich hohe K_s -Werte werden für Streptococcus sanguis bzw. Streptococcus mutans mit $1.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ bzw. $2.17 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Kemp et al., 1983), Lactobacillus helveticus und Streptococcus thermophilus mit $1.94 \times 10^{-3} \text{ M}$ (de Reaucourt et al., 1989a) und für den Homoacetatgärer Acetogenium kivui mit $9.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ (von Eysmond et al., 1990) angegeben.

Die bisher im Zusammenhang mit der Variation eines Parameters unter Konstanthaltung der übrigen Parameter diskutierten Ergebnisse, wie z.B. der Verdünnungsrate in kontinuierlicher Kultur bzw. der Anfangs-Glucose in Batch-Kulturen, zeigen, daß das Problem der Optimierung der Enzymaktivität von Lactobacillus confusus im Standardmedium im wesentlichen in der Beseitigung der Wachstumslimitierung durch Aufhebung der C-Limitierung und der Vermeidung starker Produktinhibitionen liegt. Hohe L-Hic-DH-Aktivitäten bei gleichzeitig hohen spezifischen Aktivitäten finden sich hingegen gerade im Übergangsbereich zur leichten Produktinhibition. Aus den Meßdaten für Glucose, Lactat und Trockengewicht im Überstand der kontinuierlichen Kultur konnte eine erweiterte Monod-Kinetik zur Beschreibung der Substrataufnahme, der Produktbildung und des Wachstums entwickelt werden, welche genau dieses Spannungsfeld zwischen C-Limitierung und Produktinhibition aufgreift (vergl. Gl. 4.6). Die Herleitung des Modells wurde im Ergebnisteil diskutiert (Kap. 4.2.2.5).

Dieser Ansatz ist ein Beispiel für das Optimieren nach einem mathematischen Modell. Denn erstens können bei Kenntnis des mathematischen Zusammenhangs zwischen Substrat, Produkt, Biomasse und der Wachstumsrate μ , die im steady state der Verdünnungsrate D entspricht, die für den jeweiligen Organismus und die jeweiligen Kulturbedingungen und Nährmedienzusammensetzung typischen Modellparameter ermittelt werden. Diese Modellparameter sind mit herkömmlichen Methoden, wie bei Fiechter (1981) oder Owens und Legan (1981) beschrieben, nicht direkt zugänglich. Zweitens können mit Hilfe der bestimmten Modellparameter z.B. der maximale Zellertrag oder die maximale Produktausbeute und die hierzu erforderliche Verdünnungsrate auch bei Änderung der Substratkonzentration im Vorratsgefäß vorausge-

sagt werden. Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Abschätzung der für eine bestimmte Biomasse erforderlichen Zuckerkonzentration.

Die Optimierung der Wachstumsbedingungen durch Einstellen der geeigneten Verdünnungsrate nach dem entwickelten Modell stellt eine vielversprechende Alternative zum rein sukzessiven Variieren von Faktoren dar: Lassen sich doch im vorliegenden Fall gleichzeitig vier artspezifische Parameter für Standardbedingungen allein aus den Meßwerten für das aufgenommene Substrat Glucose und den entsprechenden Verdünnungsraten ermitteln. Zu diesen Modellparametern gehören die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max}$, der Hemmkoeffizient n , die maximale Produkt- bzw. Substratkonzentration $P_{\max}$ bzw. $S_{\max}$, ab dessen Bildung bzw. dessen Umsatz kein Wachstum mehr möglich ist, sowie die halbmaximale Substratsättigungskonzentration K_s .

Die gleichzeitige Ermittlung der Modellparameter wird durch die iterative Anpassung von Meßwerten an das Modell nach dem Simplex-Algorithmus erreicht. Somit ist ein wichtiges Kriterium zur Brauchbarkeit eines kinetischen Modells erfüllt: die leichte Bestimmbarkeit der Modellparameter (Lam und Ollis, 1981). Der gleiche Algorithmus wurde übrigens später auch als Suchalgorithmus zum Erzielen einer maximalen Enzymaktivität eingesetzt.

Daß die Modellparameter nur aus den Glucose-Meßwerten im Überstand und Reservoir bestimmbar waren, liegt daran, daß im vorliegenden Fall günstige Voraussetzungen zur Vereinfachung der komplexen Stoffwechsellage des heterofermentativen Milchsäurebakteriums gegeben waren:

- Das Gärungsendprodukt Lactat wird äquimolar zum zweiten Endprodukt Ethanol gebildet, und eine Acetat-Bildung findet nicht statt. Damit ließ sich die Produktbildung vereinfachend durch ein Produkt, nämlich nur durch Lactat, beschreiben.
- Die Lactat-Bildung verhielt sich linear zur Aufnahme des limitierenden Substrates Glucose. Gewichtsmäßig entsteht etwa halb soviel und auf das Molekulargewicht bezogen etwa gleichviel Lactat, wie Glucose aufgenommen wurde. Somit konnte das gebildete Produkt durch das aufgenommene Substrat ausgedrückt werden.

Infolge dieser Vereinfachungen hängt erstens die Wachstumsrate μ (entsprechend D) in dem Modell nur noch von der Substratkonzentration ab. Zweitens wird die komplexe heterofermentative Stoffwechselsituation, in der normalerweise viele Endprodukte berücksichtigt werden müssen, auf eine "quasi-homofermentative" Situation begrenzt. Im homofermentativen Stoffwechsel entsteht nur Lactat.

Die Tatsache, daß kein Acetat gebildet wird, erstaunt um so mehr, als die Acetat-Bildung eine zusätzliche Energiequelle darstellt, wenn Acetylphosphat statt zu Ethanol zu Acetat über Substratstufenphosphorylierung umgebaut wird (Kandler, 1982). Ein erhöhter Energiebedarf kann gerade bei langsamen Verdünnungsraten auftreten, wenn sämtliche Glucose aufgenommen ist und dadurch einerseits ein

Energiequellenmangel besteht und andererseits infolge der hohen Lactat-Außenkonzentration mehr Energie zur Aufrechterhaltung der PMF nötig ist. Eventuell besteht nun hier noch kein zusätzlicher Energiebedarf, was bei den hohen Glucose-Konzentrationen im Reservoir plausibel wäre. In diesen Zusammenhang paßt die Beobachtung, daß mit zunehmender Glucose-Anfangskonzentration die Acetat-Bildung in Batch-Kulturen abnimmt. Möglicherweise tritt aber die Acetat-Bildung bei den exponentiell wachsenden Organismen in kontinuierlicher Kultur nicht zum Vorschein, weil sie auch in Batch-Kulturen nicht inmitten sondern erst ganz gegen Ende der exponentiellen Phase auftritt. Zu einem Shift zu mehr Nebenprodukten, wie er bei den fakultativ heterofermentativen Bakterien Streptococcus lactis bei Glucose-Limitierung (Thomas et al., 1979) und Streptococcus cremoris (Jørgensen und Nikolajsen, 1987) bei niedrigen Verdünnungsraten beschrieben ist, kommt es hier also nicht. Ebenfalls denkbar ist, daß aerobe Acetat-Bildungswege (Kandler, 1982) durch die Stickstoffbegasung, die das Redoxpotential im Kulturüberstand um - 100 mV auf unter - 150 mV absenkt, gehemmt waren. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden an Zymomonas mobilis, nach denen unterhalb von -140 mV die Acetat-Bildung herabgesetzt wird, während die Lactat- und Ethanol-Bildung begünstigt ist (Pankova et al., 1988).

Streng genommen müßte natürlich in der Modellierung der Wachstumsrate μ (Gl. 4.6) auch die Hemmwirkung des anderen Endproduktes Ethanol durch einen zweiten Inhibitionsterm berücksichtigt werden. Wie die gefitteten Kurven zeigen, läßt sich die Produktbildung und die Substrataufnahme aber sehr gut beschreiben, wenn nur die Werte für die Lactat-Konzentration bzw. die entsprechende Substrataufnahme herangezogen werden. Gewissermaßen erfüllt sich hier neben der leichten Bestimmbarkeit der Modellparameter eine zweite Forderung an die Qualität eines kinetischen Modells: die Beschreibbarkeit der Meßdaten durch das Modell (Lam und Ollis, 1981). Jedoch muß P_{max} nicht als die maximal tolerierbare Lactatkonzentration verstanden werden sondern erweiternd als die Konzentration, die im Zusammenwirken mit einer gleichgroßen Menge Ethanol kein Wachstum mehr zuläßt ($\mu \rightarrow 0$). Ebenso ist der Hemmkoeffizient n als Mischkoeffizient, der die kombinierte Wirkung zwischen Lactat und Ethanol beschreibt, anzusehen. Dabei kann natürlich keine Aussage über die Wechselwirkung beider Hemmstoffe untereinander gemacht werden. Die Annahme des gleichen Hemmtyps für beide Hemmstoffe scheint gerechtfertigt: Sowohl Aiba et al. (1968) als auch Novak et al. (1981) beschreiben die Wirkung des Ethanols auf das Wachstum von Saccharomyces cerevisiae mit dem gleichen Hemmtyp wie Pirt (1975), Rogers et al. (1978) oder de Raucourt et al. (1989b) die Hemmwirkung des Lactats. Beide Hemmstoffe haben primär zwar verschiedene Wirkorte: Ethanol verursacht eine Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Membranen (Herrero, 1983). Lactat dagegen beeinflußt den elektrochemischen Gradienten entweder durch Herabsetzen des Lactat- oder des pH-Gradienten (s.o.). Dennoch ist im Endeffekt beiden Produkten die Beeinflussung membrangebundener Transportprozesse der

Zelle gemeinsam. Im Falle von Ethanol können z.B. der Ammoniumtransport (Leão und van Uden, 1983) oder der Aminosäuretransport (Leão und van Uden, 1984) beeinflusst werden. Eine Erhöhung des Protoneninfluxes wurde von Kilian et al. (1984) und (Leão und van Uden, 1984) beobachtet. Auch durch Milchsäure kann der Protoneninflux in die Zelle erhöht werden, wodurch der für Transportprozesse wichtige pH-Gradient herabgesetzt wird (Kashket, 1987).

Die Hemmstoffkonzentration $P_{\max}$, ab der kein weiteres Wachstum mehr möglich ist - hier 35 g Lactat/l (390 mM) zusätzlich zur äquimolaren Ethanol-Menge pro l -, liegt in der gleichen Größenordnung wie die maximale Lactatkonzentration von 70 g/l (780 mM), ab der die spezifische Wachstumsrate μ des homofermentativen Streptococcus cremoris gegen Null strebt (Bibal et al., 1988).

Solange die zur Aufstellung des Modells angegebenen Bedingungen, wie definierte Kulturbedingungen einschließlich Stickstoffbegasung und der Fermentation im Lactobacillen-Standardmedium nach deMan (1961), eingehalten werden, beschreibt das vorgeschlagene "Substratlimitierung-Produktinhibierungs-Modell" Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung von Lactobacillus confusus in einfacher Form. Beim Übergang zu anderen Bedingungen müssen die Modellparameter $\mu_{\max}$, K_s , n , $P_{\max}$ (bzw. $S_{\max}$) jedoch neu bestimmt werden. Außerdem müßten durch einen möglichen Shift im Stoffwechsel entstehende Nebenprodukte mit in die Modellbildung einbezogen werden. Ein Beispiel für die Modellierung der Nebenproduktbildung bei Streptococcus cremoris geben Jørgensen und Nikolajsen (1987). Zeng und Deckwer (1991) beschreiben ein Modell für die Inhibierung durch mehrere Endprodukte bei Enterobacter aerogenes. Zur Optimierung der Enzymaktivität stellt das mathematische Modell nur indirekt ein Hilfsmittel dar, weil sich die maximale Enzymaktivität in der Nähe des Biomassemaximums beim Übergang zum einsetzenden Substratüberschuß befindet. Da das Wachstum jedoch nicht generell mit der Enzymaktivität gekoppelt ist, kann ein Wachstumsmodell natürlich nur begrenzt zur Aktivitätssteigerung herangezogen werden.

Von einer solch eindeutigen Stoffwechsellage, wie sie Voraussetzung für das entwickelte Modell war, konnte beim Wechsel zu anderen Nährmedien nicht mehr die Rede sein: die Ethanol- und Lactat-Bildung treten nicht mehr gekoppelt auf, eine ganz unterschiedliche Acetat-Bildung wurde gemessen. Nun gerade hier, wo weder der physiologische Zusammenhang des Enzyms genau bekannt ist noch die Enzymbildung eindeutig in einer mathematischen Funktion formuliert werden kann, erweist sich die Stärke mathematischer Optimierverfahren, die nach einem Suchalgorithmus vorgehen. Ungeachtet der "physiologischen Lage" des Organismus wird auf dem Weg zwischen Limitierung und Produktinhibition eine Verbesserung der Enzymaktivität gesucht. Der Komplexität des Stoffwechsels werden die Suchverfahren durch die Möglichkeit gerecht, viele die Enzymaktivität beeinflussende Parameter in die Variation miteinzubeziehen, Informationen aus vorausgegangenen

Optimierungsschritten bei fortschreitender Optimierung zu berücksichtigen und vor allem die Experimentezahl zum Auffinden der maximalen Enzymaktivität durch *simultane* Faktorenvaryation herabzusetzen. Der Simplex-Algorithmus wurde vor allem wegen seiner Fähigkeit zur besonders starken Herabsetzung der Experimentezahl und zum Miteinbezug vieler Parameter zur Optimierung gewählt. Diese und einige in Kap. 2.5 genannten Vorteile und Schwächen der Simplexmethode gegenüber durchgeführten und anderen Optimierverfahren werden nachstehend anhand der folgenden Kriterien diskutiert: Notwendigkeit zu Vorversuchen, Zahl der gleichzeitig untersuchbaren Einflußparameter unter Berücksichtigung des Steigerungsfaktors, Schnelligkeit des Verfahrens, Fähigkeit zur Erkennung wesentlicher Einflußparameter und Konvergenz.

Zur Diskussion der durchgeführten Optimierverfahren werden nur die Ergebnisse aus kontinuierlichen Kulturen herangezogen, da Ergebnisse aus Batch-Kulturen, wie später erläutert, nicht direkt mit Chemostat-Ergebnissen verglichen werden können. Der Chemostat war zur Gewährleistung konstanter Bedingungen und aussagekräftiger L-Hic-DH-Messungen (vergl. Kap. 4.2.1.4) erforderlich. Zunächst sei kurz an die prinzipielle Funktionsweise der Simplex-Optimierung (Anschauungsbeispiel in Kap. 2.5) erinnert: Zu Beginn der Optimierung werden verschiedene Kombinationen (Vertices) aus Medienkomponenten und Kulturbedingungen auf ihre resultierende Volumen-Enzymaktivität (Zielgröße) in kontinuierlicher Kultur überprüft. Die Summe der Ausgangskombinationen einschließlich ihrer Ergebnisse (hier 33) spannt den mit Anfangssimplex bezeichneten Optimierraum zu Beginn auf. Aus dieser Anfangssimplex wird mit jedem Optimierungsschritt (Iterationsschritt) die Kombination mit dem schlechtesten Ergebnis durch eine neugetestete mit einem besseren Ergebnis ersetzt. Hierdurch bleibt die Summe der Kombinationen in jedem Iterationsschritt gleich, der Mittelwert der Ergebnisse der 32 "besten" Vertices im jeweiligen Iterationsschritt verbessert sich ständig. Während der eigentlichen Optimierung werden *alle* Faktoren simultan variiert, wohingegen die Vertices der Anfangssimplex bis auf jeweils einen stark erhöhten Faktor identisch sind.

- Vorversuche sind nicht unbedingt nötig (Yarbro und Deming, 1974), denn das Verfahren beinhaltet mit der Anfangssimplex bereits eine Serie von Vorversuchen, die analog zu faktoriellen Verfahren (vergl. Kap. 2.5) durchgeführt werden. Liegen nur diese Versuche aus der Anfangssimplex vor oder ist, wie im vorliegenden Fall, die ungefähre Lage des Maximums gänzlich unbekannt, so empfiehlt sich die Wahl eines großen Bereiches und einer großen Schrittweite zur Variation der Faktoren in der Anfangssimplex. Hierdurch wird ein größerer Informationsgehalt zu Beginn erzielt. Zusätzliche Vorversuche, und als solche können alle im Rahmen der sukzessiven Faktorenvaryation gestalteten Versuche betrachtet werden, können aber helfen, einerseits einen physiologisch relevanten Bereich für die Anfangssimplex abzustecken und andererseits den Weg zur ma-

ximalen Enzymaktivität zu verkürzen, indem bereits eine Startkombination (Startvertex) mit hoher Enzymaktivität (wie im vorliegenden Fall) gewählt wird.

- Besonders eindrucksvoll ist die Fähigkeit des Algorithmus, mit einer hohen Zahl von Parametern eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität zu erzielen: Unter gleichzeitiger Variation von 32 Parametern in insgesamt ca. 65 Messungen liegt die beste Volumenaktivität nach dem letzten Iterationsschritt 5.1-fach höher als die Aktivität der allerersten der Berechnung der Anfangssimplex zugrunde liegenden Startvertex. Um den Faktor 10.5 liegt die beste Volumenaktivität über dem Mittelwert der 32 "besten" Enzymaktivitäten der Anfangssimplex. Daß man mit der "quasi-faktoriellen" Variation der Anfangssimplex zur Optimierung der Aktivität nicht auskommt, zeigt die Tatsache, daß die maximale Enzymaktivität der Anfangssimplex durch die simultane Variation noch um den Faktor 3.9 übertroffen wird. Die hohe Zahl der Parameter ist hier zwangsläufig durch die Vielzahl an Nährkomponenten bedingt, die die Milchsäurebakterien für ihr Wachstum benötigen (Sharpe, 1981).

Im Gegensatz hierzu war in der sukzessiven Faktorenvariation nur ein Faktor, die Verdünnungsrate D , in 15 Schritten variiert worden. In keiner der bislang veröffentlichten Untersuchungen mittels faktorieller Verfahren wurden mehr als 4 Parameter verändert (Dumenil, Combet et al., 1975; Famelart et al., 1987; Dumenil et al., 1988; Béal et al., 1989).

- Die Schnelligkeit der Optimierung ist angesichts der Tatsache, daß bei 32 Faktoren bereits nach 20 Schritten die mittlere Enzymaktivität um den Faktor 3.5 angestiegen ist, als gut einzustufen. Die bereits nach 6 Optimierungsschritten erzielte maximale Enzymaktivität kann zufällig zu diesem Zeitpunkt aufgetreten sein und ist deshalb nicht unbedingt ein Maß für die Geschwindigkeit des Verfahrens. Selbstverständlich muß man beachten, daß die Zeitdauer, die Suchstrategien zum Erreichen des Optimums brauchen, auch davon abhängt, wie schnell die Entscheidung über den Erfolg eines Optimierungsschrittes getroffen werden kann. Gerade in diesem Punkt wirkte sich das Untersuchungssystem des Chemostaten, bei dem zur Probennahme das steady state der Kultur abgewartet werden muß, verlangsamen auf den Optimierungsprozeß aus. Aus technischen Gründen wie langen Autoklavier-, Abkühlzeiten und Medienvorbereitungen verlängerte sich die Zeit bis zur Ergebnisfindung um 2 - 3 Tage. In diesem Punkt ist die Lösung physikalischer, chemischer, oder mathematischer Suchprobleme, bei denen Suchalgorithmen traditionsgemäß angewendet werden, der Lösung biologischer Probleme natürlich überlegen. Die Meßgeräteinstellung eines Photometers läßt sich beispielsweise wegen der Meßzeiten im Minutenbereich mit Hilfe des Simplex-Algorithmus schnell optimieren (Phan tan Luu et al., 1979). Meßsysteme, die Ergebnisse schneller anzeigen, können die Optimierungsprozesse beschleunigen. Hierzu zählt z.B. die turbidostatische Optimierung in kontinuierlicher Kultur, bei der Mediumslimitierungen sofort nach Zusatz der limitierenden

Komponente im Reservoir sichtbar werden (Büchs, 1990). Diese Meßanordnung kam im vorliegenden Fall, wie zuvor und eingangs in Kap. 4 diskutiert, nicht in Frage. Eine andere Alternative wäre, statt auf steady state-Meßpunkte zu warten, das Übergangsverhalten der Kultur auf neue Bedingungen hin zu beobachten (Fiechter, 1981; Cooney et al., 1981; Goochee et al., 1985). Dieses Verhalten ist jedoch viel schwerer interpretierbar, komplizierter in seiner mathematischen Formulierung und hängt unter Umständen von den zuvor eingestellten Kulturbedingungen ab. Um so wichtiger ist es, im Falle biologischer Fragestellungen die Zahl der Experimente zu begrenzen. Hier ist das Simplexverfahren, wie in Kap. 2.5 besprochen, anderen Suchstrategien (Hooke Jeeves, 1981; Rosenbrock, 1970) und faktoriellen Verfahren (Yarbro et al., 1974) deutlich überlegen.

So bliebe zur Beschleunigung des Optimierprozesses die Möglichkeit, statt der Simplex-Methode ein "schnelleres" Verfahren zu wählen. Die Simplex-Methode orientiert sich bei ihrem Vorschlag der im nächsten Iterationsschritt zu testenden Vertex am Mittelpunkt aller in dem gerade aktuellen Iterationsschritt im "Rennen" befindlichen Kombinationen. Da sie - um im Bild für die Besteigung eines Berges, dessen Gipfel die höchste Aktivität darstellt, für die Optimierung zu bleiben - die Form des Berges nicht kennt, benötigt sie eine längere Zeit zum Auffinden der maximalen Enzymaktivität als sogenannte Gradientenmethoden. Diese können nämlich nach jedem Iterationsschritt die Steilheit des Berges an ihrer momentanen Position bestimmen und daher schneller zum Gipfel gelangen. Hier nicht gegebene Voraussetzungen für die Anwendung solcher Gradientenmethoden wie z.B. der Gauss-Newton-Methode bzw., der Newton-Raphson-Methode oder der sehr effizienten Marquardt-Methode (Kattanek, 1985) sind die Kenntnis einer analytischen Funktion für den Zusammenhang zwischen Einflußparametern und Zielgröße. Das im Rahmen der Kinetikbetrachtungen aufgestellte Wachstumsmodell ist aber nicht auf die Enzymaktivität übertragbar und bei andern als den Standardbedingungen nicht gültig.

- Außer dem positiven Einfluß der C-Quellen-Erhöhung auf die Enzymaktivität, der auch während der Simplex-Optimierung durch eine stärkere Zunahme der C-Quellen im Vergleich zum Proteinstickstoff aufgegriffen wurde, konnte das Verfahren auch auf andere wichtige Einflußparameter hinweisen. Abhängig davon, wie stark sich die anderen Parameter gerade ändern, wird über einige Iterationsschritte auch eine Korrelationen zwischen der Aktivität und einem bestimmten Einflußfaktor sichtbar, wie z.B. bei der Folsäure in den letzten Schritten der Optimierung. Im erwähnten Bild gesprochen, hängt die Erkennung natürlich von der Stelle am Berg ab, an der man sich gerade befindet. Nur völlig von den übrigen Faktoren unabhängige Parameter würden über die gesamte Optimierung eine Korrelation mit der Enzymaktivität ergeben. Möchte man den Einfluß auf die Zielgröße aber quantitativ erfassen, sind faktorielle Verfahren geeigneter als Suchstrategien. Jedoch wäre die Wirkung der Folsäure unter Umständen wegen

der geringen Anzahl der erlaubten Parameter beim Anwenden faktorieller Experimente vermutlich nicht aufgefallen. Außerdem bestand nicht die Möglichkeit zu sehr vielen Parallelversuchen, wie für faktorielle Verfahren benötigt, da man bei der L-Hic-DH-Messung auf Fermenter angewiesen war. Die Hinweise aus der Simplex-Optimierung wurden durch das sukzessive Nachtesten der Folsäurewirkung bestätigt. Folsäure bewirkt im minimierten M₂-Medium einen starken Anstieg der L-Hic-DH-Volumenaktivität um den Faktor 7.9. Dabei tolerieren die Organismen große Folsäurekonzentrationen: 60 - 70 µg zusätzlich zur bereits in den komplexen Extrakten enthaltenen Folsäure, also insgesamt über 100 µg/l. Die in der Anfangssimplex im Schnitt eingesetzten Extraktmengen brachten z.B. circa 32 µg Folsäure/l in das Kulturmedium ein (Merck, Datenblatt), besonders durch den stark folsäurehaltigen Hefeextrakt. Lactobacillus bulgaricus wurde jedoch bereits durch 10 µg Folsäure/l gehemmt (Rogosa et al., 1961). Bei Lactobacillus casei dagegen ist die Möglichkeit zur enorm hohen Anhäufung von bis zu 500 µM Folsäure in der Zelle bekannt (Henderson et al., 1979). Folat gelangt dabei im Zusammenhang mit einer energiereichen Verbindung über einen Carrier in Zellen von Streptococcus faecalis und Lactobacillus casei (Henderson et al., 1979). Folyl-Glutamat-Derivate (Shane und Stokstad, 1975) können ebenfalls transportiert werden, Folyl-Monoglutamate über aktiven Transport (Shane und Stokstad, 1976). In die Zelle aufgenommen bewirken sie dann eine Wachstumsverbesserung. Die zum Teil auch nach dem Transport stattfindende Kopplung von Glutamat-Resten an Folsäure dient der Affinitätssteigerung gegenüber den Folsäure umsetzenden Enzymen und der besseren Rückhaltung in der Zelle (Shane und Stokstad, 1975; Süßman et al., 1986). Folsäure kommt im Stoffwechsel von Säugern und Bakterien eine zentrale Bedeutung bei der CH₃-Gruppenübertragung zu. Beim Methionin-, Serin-, Thymin- und Purinstoffwechsel werden Folsäure-Derivate als Cosubstrate gebraucht. Die Tatsache, daß Lactobacillus casei Methyltetrahydrofolat in Purin und Thymidylat-Derivate einbaut (Shane und Stokstad, 1977a,b) und daß ein Thyminbedürfnis entsteht, wenn Lactobacillus acidophilus ohne Folsäure wächst, spricht eher für eine Rolle im Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel als im Aminosäurestoffwechsel von Lactobacillen.

Bei Lactobacillus confusus steht der ziemlich starke Glutamat-Verbrauch im MRS- und M₂-Medium vielleicht im Zusammenhang mit der Bildung solcher Folyl-Glutamyl-Derivate. Glutamat wird jedoch auch generell von Milchsäurebakterien viel aufgenommen (Ledesma et al., 1977; Strobel et al., 1989). Methionin wird vermutlich kaum vom Organismus gebildet, da diese Aminosäure auch immer sehr stark aus dem Kulturmedium verschwindet. Die hohe Phenylalanin-Aufnahme steht vielleicht in Zusammenhang mit dem Folsäure-Bedürfnis, da Folsäure über Chorismat aus Phenylalanin aufgebaut werden kann.

Im Zusammenhang mit dem im Laufe der Simplex-Optimierung festgestellten Einfluß von Vitaminen auf die L-Hic-DH-Aktivität wird klar, daß eine *simultane* Faktorenvariation zum Abstecken des Einflusses unbedingt nötig war: Je nach Bedingungen zeigt sich ein stärkerer Einfluß von Thiamin und Riboflavin, z.B. in der Anfangssimplex, oder aber ein starker Einfluß der Folsäure z.B. während der fortschreitenden Optimierung oder bei der Verbesserung der Aktivität im minimierten Medium. Die Thiaminwirkung kann dabei im Zusammenhang mit der Phosphoketolase, die Riboflavin-Wirkung im Zusammenhang mit FAD benötigten Enzymen zur Sauerstoffentfernung und Acetat-Bildung (Kandler, 1982) gesehen werden. Ein zweites Beispiel, welches die Bedeutung der simultanen Vorgehensweise unterstreicht, ist die große Verschiedenheit der beiden Spitzenreiter der Simplex-Optimierung bezüglich Nährmedienzusammensetzung und Kulturbedingungen. Einerseits kommt es infolge einer hohen Stickstoffbegasung bei gleichzeitig niedriger Verdünnungsrate zur höchsten Volumenaktivität und zu einer hohen spezifischen Aktivität. Andererseits steht die zweithöchste Volumenaktivität in Zusammenhang mit einem hohen Arginin-Gehalt bei gleichzeitig niedrigem Ketoalanin-Gehalt im Kulturmedium.

Der Trend zur Verlangsamung der Verdünnungsrate, welcher dann auch bei dem Spitzenreiter der Optimierung durch eine niedrige Verdünnungsrate bestätigt wird, kann in Analogie zu steigenden Aktivitäten in Richtung geringer Verdünnungsraten im MRS-Medium gesehen werden. Die Stickstoffbegasung trägt zusätzlich zur starken Durchmischung, Austreibung des Gärungsendproduktes CO₂ und Erniedrigung des Redoxpotentials bei. Sinkende Zellerträge sind die Folge eines hohen Redoxpotentials bei Lactobacillus acidophilus (Soska, 1966). Die große Biomasse zusammen mit einer hohen Volumenaktivität aber einer verhältnismäßig kleinen spezifischen Aktivität bei Erhöhung von Arginin in der zweitbesten Kombination und in der Anfangssimplex deuten auf eine wachstumssteigernde Wirkung dieser Aminosäure hin. Tatsächlich können heterofermentative Milchsäurebakterien Arginin unter ATP-Bildung und NH₃-Gewinnung über Citrullin, Ornithin und Carbamoylphosphat zu CO₂ abbauen (Cunin, 1986; Konings, 1989). Carbamoylphosphat dient als Energielieferant oder als Baustein für die Pyrimidinsynthese, Ornithin kann zur Polyaminherstellung verwendet werden. Der sogenannte Arginindiiminase-Weg existiert bei so verschiedenen Gruppen wie Milchsäurebakterien, Pseudomonaden, Clostridien, Mycoplasmen, Halo- und Cyanobakterien (Cunin, 1986). Die Ansicht, daß im Kulturmedium vorhandene Glucose die Argininverwertung bei oralen Streptococcen unterbinde (Crow et al., 1982), kann so für Lactobacillus confusus nicht bestätigt werden. Denn Arginin wurde auch bei Glucose-Anwesenheit umgesetzt. Eher ist eine Arginin-Verwertung bei Energie-Erschöpfung vorstellbar, wie bei Streptococcus faecalis (Cunin, 1986). Es wurde unabhängig von der verwendeten Arginin-Konzentration niemals mehr als 0.1 -

0.4 mM Ornithin gebildet. Bei niedrigen Arginin-Konzentrationen im Medium entspricht die Ornithin-Menge und das eventuell gebildete Citrullin häufig dem Arginin-Angebot. Dies könnte bedeuten, daß Arginin nur als NH_3 -Quelle benutzt wurde oder die Ornithin-Ausscheidung im Zusammenhang mit einem Arginin-Antiport stand (Konings, 1989). Wäre Arginin ein limitierender Faktor für das Wachstum, wäre Ornithin nicht ausgeschieden worden. Bei hohen Arginin-Konzentrationen im Kulturmedium (3 - 11 g/l), bei denen ebenfalls nur wenig Ornithin und kein Citrullin entsteht, wie in der Anfangssimplex oder im Laufe der Simplex-Optimierung, findet also eine Weiterverarbeitung über die Ornithin-Stufe hinaus statt. Dies schlägt sich in einer gestiegenen Zellmasse nieder. Über eine Stimulation des Wachstums bei den heterofermentativen Milchsäurebakterien Lactobacillus brevis, L. fermentum, L. buchneri und L. pasteurianum durch Arginin berichtet auch Rainbow (1975). Wie die Kolbenversuche zeigten, stimulierte aber auch Citrullin das Wachstum von Lactobacillus confusus im Gegensatz zu Rainbow's Ergebnissen.

Es mag zur hohen Aktivität beitragen, daß in der Vertex mit der zweithöchsten Enzymaktivität gleichzeitig eventuell toxisches Ketovalin fehlt. Von einer induzierenden Wirkung des Ketoleucins ist nicht auszugehen, da die spezifische Aktivität nicht ansteigt. Ebensowenig war im übrigen eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität durch Erhöhung von Aminosäuren in Kulturmedium (z.B. in der Anfangssimplex) aufgetreten. Bakterielle Dehydrogenasen können auch im Komplexmedium induziert werden, wie das Beispiel der Phenylalanindehydrogenase durch Phenylalanin bei Brevibacterium sp. zeigt (Hummel et al., 1984).

- Die Simplex-Methode läßt dem Experimentator viele Freiheiten, so z.B. erstens in Bezug auf das Beurteilungskriterium (Long, 1969). Eine Optimierung nach Kostengründen ist genauso vorstellbar wie eine unter Gesichtspunkten der Produktivität, des Durchsatzes oder der maximalen Aktivität - eine Garantie also für den universellen Einsatz der Methode. Zweitens kann man selbstverständlich auch Grenzen für den Bereich feststecken, den die Parameter im Laufe der Optimierung durchschreiten sollen. Wird zum Beispiel bei der Verbesserung einer enzymatischen Reaktion durch Einstellung von Reaktionsbedingungen und Reagenzienkonzentrationen keine Zunahme der Reaktanden-Konzentration erwünscht, so können alle Vorschläge, die zu einer Konzentrationszunahme führen, mit schlechten Ergebniswerten belegt werden (Deming und Morgan, 1973). Ein derartiger Eingriff in die Optimierung wurde im vorliegenden Fall aber vermieden, um den Prozeß ohne Beeinflussung von außen beobachten zu können. Die geringe Extraktzunahme kann nicht für die Gesamtsteigerung der Volumenaktivität verantwortlich gewesen sein.
- Der von einem Iterationsschritt zum nächsten steigende Mittelwert (Mittelwert aus den Enzymaktivitäten von 32 Nährmediumskompositionen in dem jeweiligen

Iterationsschritt) und der steigende Minimalwert der Kombination mit der niedrigsten L-Hic-DH-Volumenaktivität in dem jeweiligen Iterationsschritt weist auf ein Konvergieren des Verfahrens hin. Eine Divergenz ist laut Caceci und Cacheris, (1984) unmöglich. Selbstverständlich stellt sich das Optimierproblem nicht einfach als das Besteigen eines wie in Abb. 4 ideal geformten Berges sondern in der Praxis eher als das Auffinden des Maximums inmitten einer Hügellandschaft dar. Keine der derzeit bekannten Suchmethoden, auch nicht die Simplex-Strategie, ist in der Lage, das absolute Maximum zu finden. Eine Ausnahme bildet die Evolutionsstrategie, die wegen ihres Zeitaufwandes - man vergegenwärtige sich die Zeitdauer der Evolution - für das vorliegende Optimierproblem nicht geeignet ist. Startet man jedoch die Optimierung von zwei verschiedenen Positionen des Optimierraumes und findet zum selben Maximum, ist dieses mit Wahrscheinlichkeit das gesuchte Maximum. Dieser Absicherung ist bei Verwendung des Simplex-Algorithmus als Suchverfahren in biologischen Optimierproblemen aus Zeitgründen Grenzen gesetzt. Bei der Anpassung von Meßdaten an das mathematische Modell wurde die Absicherung jedoch derart durchgeführt.

Nach der maximalen Volumenaktivität betrachtet, die das Kriterium für die Optimierung war, stellen sich die beiden Kombinationen für Nährmedien und Kulturbedingungen aus der Simplex-Optimierung als die Spitzenreiter heraus (Tab. 23).

	MRS	M ₂ + Fs	Simplex (1.)	Simplex (2.)
Volumenaktivität (U/l)	391	302	598	496
Produktivität (U/(l × h))	117	76	29	99
spezifische Aktivität (U/mg Protein im RE) (U/g Tg)	- 106	1.70 106	2.55 810	0.82 291

Tab. 23. Vergleich von Enzymaktivitäten bei verschiedenen Optimierverfahren:
 sukzessive Faktorenviation (Voll-Medium MRS 54 g Glc/l und minimiertes M₂-Medium mit Folsäure und 18.2 g Glc/l) und simultane Faktorenviation (Ergebnis der besten und zweitbesten Simplex-Kombinationen) in kontinuierlicher Kultur

Im Hinblick auf eine eventuelle Verwendung der Medien im Batch-Verfahren und eine vollständige Glucose-Verwertung war nicht die Produktivität (Enzymbildung pro Zeiteinheit) sondern die Volumenaktivität (U/l Kultur) als Kriterium gewählt worden. Dennoch ist auch die Produktivität natürlich Grundlage einer vergleichenden Betrachtung der erhaltenen Kulturmedien. Die Simplex-Kombination mit dem besten Ergebnis weist zwar trotz einer sehr hohen Volumenaktivität eine im Vergleich zu den anderen Kombinationen zwei bis dreimal niedrigere Produktivität auf. Dafür liegt aber die spezifische Aktivität (auf das Zellprotein bezogen) um das 2 - 3-fache höher, wodurch bei der Aufreinigung auch weniger Fremdprotein von der L-Hic-DH entfernt werden muß. Die Kombination mit der zweithöchsten Aktivität der Simplex-Optimierung dagegen ist sowohl in Bezug auf gleichzeitig hohe Volumenaktivität bei

noch guter Produktivität allen anderen Medien überlegen, so daß man diese für die Produktion empfehlen kann, auch wenn die spezifische, auf das Protein bezogene Aktivität - im Gegensatz zur trockengewichtsbezogenen Aktivität - eher durchschnittlich ist. Kommen noch Kostenkriterien zur Überlegung für die "beste" Kombination hinzu, sollte man wegen der (gegenüber den übrigen im Ergebnisteil dargestellten Kombinationen) noch guten Aktivität, Produktivität und hohen spezifischen Aktivität das minimierte M_2 -Medium verwenden. Die Kostenreduktion gegenüber dem MRS-Medium nach deMan (1960) kommt dabei vor allem durch die weitgehende Eliminierung des teuren Fleischextraktes und den vollständigen Verzicht auf Casein aus Pepton zugunsten des billigeren Hefeextraktes im M_2 -Medium nach Hummel (1983) zustande. Die zum Aktivitätserhalt erforderliche Folsäure verteuert das Medium nur unwesentlich, wenn Folsäure für biochemische Zwecke (Merck) verwendet wird. Eher fallen die Kosten für die Sterilfiltration der Vitaminlösung ins Gewicht. Beim Zugrundelegen von Preisen 1990 (50 kg-Gebinde) für eine 1000 l-Fermentation erniedrigt sich der Preis vom selbsthergestellten MRS-Medium nach deMan (3102 DM) zum minimierten M_2 -Medium mit Folsäure (615 DM) um das 5-fache. Die vorausgegangene Diskussionsion der Optimierverfahren und die in Tab. 23 dargestellten besten Ergebnisse der sukzessiven und simultanen Faktorenvariation machen die Überlegenheit der Simplex-Methode für das vorliegende komplexe Untersuchungsproblem deutlich. Als Empfehlung für ein Vorgehen kann man festhalten: in komplexen Situationen eine Optimierung durch simultane Parametervariation durchführen, gefolgt von einer Nachoptimierung durch faktorielle Verfahren in Optimumsnähe, um Einflüsse auf die Zielgröße quantitativ zu erfassen - hingegen sukzessive Parametervariation in begrenzten Optimierproblemen anwenden, wenn nur ein Faktor z.B. in einem Standardmedium verändert werden soll oder auch zur gezielten, begrenzten Nachvariation (vergl. Folsäure) nach dem Simplex-Verfahren - faktorielle Verfahren einsetzen, wenn die Möglichkeit zu parallelen Ansätzen besteht, eine geringe Parameterzahl untersucht werden soll und Einflüsse quantitativ hinterfragt werden.

Der Entscheidung für die geeignete Kombination von Nährmedien und Kulturbedingungen sei noch die Diskussion des geeigneten Kulturverfahrens für die Produktion nachgestellt. Der erste Blick weist für die Batch-Produktionsweise ein deutlich höheres Ergebnis (1356 U/l) als für die kontinuierliche Kultur (siehe Tab. 23) aus. Prinzipiell kann man Batch- und kontinuierliche Kulturen nicht direkt vergleichen, zumindest nicht, wenn teilweise oder ganz wachstumsgekoppelte Enzyme produziert werden. Im Chemostaten können die Organismen niemals mit der maximalen Wachstumsrate μ_{max} wachsen. Sie sind immer limitiert, zumeist C-limitiert, so daß auch Ertragswerte niemals so hoch wie in Batch-Kulturen sein können. In diesen kann das Medium bis zur Erschöpfung der C-Quelle aufgebraucht werden.

Will man dennoch einen Vergleich anstellen, relativieren sich die Volumenaktivitäten etwas, wenn man die Produktivität in der Batch-Kultur um die Vor- und Nachbereitungszeiten für die Fermentation korrigiert, die ja bei kontinuierlichen Kulturen entfallen (Brocks, 1990). Hier wäre ein Zeitraum von mindestens drei Stunden für das Autoklavieren, Säubern und Präparieren der 10 l-Anlage einzuplanen. Die eigentliche Produktivität von 286 U/(l × h) reduziert sich daher auf 175 U/(l × h). Bei Verwendung vergleichbarer Zuckerkonzentrationen im MRS-Medium vermindert sie sich von 237 auf 139 U/(l × h), liegt aber immer noch deutlich über den Produktivitäten der kontinuierlichen Kultur (99 U/(l × h)). Benötigt man eine große Menge Zellen für die Aufreinigung, sollte man zur Batch-Produktion mit dem hinsichtlich der C-Quellen ausbalanzierten Nährmedium greifen. Möchte man dagegen ständig Enzym zur Verfügung haben und die schwere Reproduzierbarkeit von Batch-Kulturen umgehen, sei die kontinuierliche Kultur mit dem verbilligten M₂-Medium unter Folsäurezusatz empfohlen.

Eine generelle Alternative zur in dieser Arbeit durchgeführten Optimierung von Nährmedien und Kulturbedingungen mit dem Ziel, die Produktivität eines speziellen Enzymes durch Beeinflussung des Stoffwechsels zu steigern, stellt die Beeinflussung des Organismus durch genetische Manipulationen dar. Unter Umständen erfordert dieser Weg von der Lokalisierung und Sequenzierung bis hin zur Transformation des entsprechenden Wirtes wie der Weg zur Medienoptimierung eine größere Zeitspanne, führt aber in der Regel zu höheren Ausbeuten. Beispielsweise gelangen Lerch et al. (1989) die Sequenzierung, Klonierung und Expression der D- und L-Hic-DH-Gene in Escherichia coli. Auch im Falle einer gelungenen Expression der für die Enzymproduktion verantwortlichen Gene werden Medienoptimierungen nicht überflüssig. Die Einführung von Cellulase- und Xylanase-Genen in Lactobacillus plantarum (Scheirlinck et al., 1990), die dem Organismus die Erschließung zusätzlicher C-Quellen und damit ein besseres Wachstum ermöglichen sollen, erübrigt die Optimierung der Kulturbedingungen natürlich nicht. Auch können sich die Bedingungen, die zu einer maximalen Enzymproduktion führen, nach einer Mutation oder nach einer gentechnologischen Veränderung eines Organismus verschieben, so daß eine Nachoptimierung erforderlich wird. Nicht zuletzt gibt es Fälle, in denen die Verwendung genetisch veränderter Organismen nicht erlaubt ist. Man denke dabei an Starterkulturen, bei denen beispielsweise die Produktionssteigerung der Lactose abbauenden Enzyme neben der Verbesserung der Zellmasse von großem Interesse ist. Die Expression einiger dieser Gene in Milchsäurebakterien ist zumindest in vitro zwischenzeitlich gelungen (Yu et al., 1990; Chassy, 1987), der Einsatz derart veränderter Organismen als Starter ist aber in der Bundesrepublik wegen des momentan gültigen Gentechnik-Gesetzes nicht gestattet. Das starke Interesse an solchen Kulturen wird vor dem Hintergrund ihres hohen ökonomischen Wertes von weltweit 100 Billionen Dollar (Strobel et al., 1989) verständlich.

Somit ergibt sich folgender Ausblick aufgrund der diskutierten Ergebnisse:

Zur Anwendung einer intelligenten, wenige Schritte benötigenden Suchstrategie zur Medienoptimierung wird dort geraten, wo die Steigerung eines Enzymes im komplexen Zusammenhang durch gentechnologische Methoden nicht möglich ist.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Produktion des intrazellulären Enzyms L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-Hic-DH) des heterofermentativen Milchsäurebakteriums Lactobacillus confusus durch Suche nach geeigneten Nährmediumskompositionen und Fermentationsbedingungen zu steigern. Dabei sollte ein geeignetes Verfahren gewählt werden, welches die Komplexität des vorliegenden Vielfaktorenproblems berücksichtigt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Aufnahme von Zuckern und verschiedenen Aminosäuren in Batch- und kontinuierlichen Kulturen betrachtet, um Aufschluß über eventuell limitierende Substrate zu erhalten. Dann wurden verschiedene Einflußparameter sukzessiv, also unter Variation eines Parameters und Konstanthaltung aller übrigen, verändert und der Effekt auf Enzymaktivität und Wachstum untersucht.

Da wegen der vielseitigen Nährstoffansprüche und Stoffwechseleigenschaften von Milchsäurebakterien eine umfassende Optimierungsstrategie zur Herabsetzung der Experimentezahl benötigt wird, erfolgte die weitere Variation von Einflußparametern nach einem mathematischen Algorithmus, dem Simplex-Verfahren. Diese Methode ist aus Chemie und Verfahrenstechnik bekannt.

Beurteilungskriterium für die Optimierung war dabei die erzielte Volumenaktivität (U/l). Die Ausgangssituation war durch eine batchweise Fermentation des Organismus mit einer L-Hic-DH-Aktivität von 200 U/l bzw. 1 U/mg Protein im Rohextrakt, 7,5 g Feuchtgewicht/l Kultur und einer optischen Dichte von $A_{578} = 4.5$ gegeben (Schütte et al. 1984).

1. Einfluß von organischen Säuren

- L. confusus wächst im verdünnten Komplexmedium auf organischen Säuren nur, wenn Glucose als C-Quelle zugegeben wird.
- Der Zusatz von Keto-, Hydroxy- und Aminosäuren zum Glucose-haltigen Nährmedium steigert das Wachstum von Kolbenkulturen nicht. In kontinuierlichen Kulturen (Anfangssimplex) lagen die Volumenaktivitäten bei Zusatz dieser Säuren außer bei Isoleucin und Arginin deutlich unter den durchschnittlichen Enzymaktivitäten. Besonders Ketovalin hemmt Wachstum und Enzymaktivität.

2. Zuckerspektrum

L. confusus zeigt deutliche Präferenzen für Zucker, die der Glucose in ihrer Struktur ähneln (Maltose, Xylose, Gluconsäure). Auf der gegenüber der Glucose billigeren Dextrose wächst der Organismus etwa 30 % schlechter, so daß Dextrose für großtechnische Fermentationen nicht in Frage kommt.

3. Aufnahmespektrum für Aminosäuren und Zucker

- Bei allen Versuchen wurde eine mindestens 95 %-tige Aufnahme von Arginin aus den zugesetzten komplexen Extrakten oder der extern zugesetzten Aminosäure beobachtet. Bei externem Zusatz wurden höhere Volumenaktivitäten und ein höheres Wachstum bewirkt. Möglicherweise dient Arginin als zusätzliche Energiequelle.
- Methionin und aromatische Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) werden im Lactobacillen-Nährmedium MRS zu 30 - 70 % ihrer Vorlage stärker als andere Aminosäuren verbraucht. Mengenmäßig gesehen wird Leucin bei niedrigem Zuckergehalt und Phenylalanin bei hohem Zuckergehalt am stärksten aufgenommen.
- Das käufliche Lactobacillen-Medium (MRS nach Merck) und das MRS-Medium nach deMan sind Glucose-unterbilanziert: Allein durch Erhöhung des Verhältnisses von Glucose zu Proteinstickstoff auf einen circa 3-fachen C-Überschuß (71.7 g Glucose pro 25 g komplexe Extrakte) läßt sich die L-Hic-DH-Volumenaktivität um den Faktor 3 steigern. Dabei liegt die Volumenaktivität mit **1356 U/l** um den Faktor 6.8, die spezifische Aktivität mit 2.24 U/mg Protein im Rohextrakt um den Faktor 2.1 höher als der Ausgangswert. Zur Produktion großer Mengen Enzym ergab das Batch-Verfahren mit dem ausbalanzierten MRS-Medium bessere Ergebnisse als die kontinuierliche Kultur, da im Chemostaten eine C-Limitierung bestand.

4. Kulturbedingungen

- Das Wachstumsoptimum im pH-statisierten Kolben lag bei pH-Werten von 6.8 - 7.0 und bei Temperaturen zwischen 33 -35 ° Celsius.
- Durch die sukzessive Variation der Verdünnungsrate wurden maximale Volumenaktivitäten von **391 U/l**, bzw. maximale Enzymproduktivitäten von **117 U/(l·h)** in kontinuierlicher Kultur im Lactobacillen-Nährmedium (MRS nach deMan) mit erhöhtem Zuckergehalt bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ erreicht.
- Der Erntezeitpunkt ist für die Produktion des Enzyms in Batchkulturen besonders wichtig: bereits 30 Minuten nach Erreichen der maximalen Enzymaktivität in der späten exponentiellen Phase kann die Volumenaktivität um 1/3 ihres Maximalwertes abgenommen haben. Als Signal zur Ernte für maximale Zellmasse wird das Ende des Laugeverbrauches vorgeschlagen. Der Zeitpunkt der maximalen Volumenaktivität verschiebt sich je nach Zuckerkonzentration und fällt nur bei 36 g Glucose/l mit dem Ende des Laugeverbrauches zusammen.

5. Wachstumskinetik

- Statt der Monod-Kinetik wurde ein Wachstumsmodell für die kontinuierliche Kultur entwickelt, welches die Verminderung der Wachstumsrate durch Produktinhibierung berücksichtigt. Die Substrataufnahme und Produktbildung werden vereinfachend nur mit Hilfe der Meßwerte für das aufgenommene Substrat Glucose beschrieben. Der Hemmeffekt des Erhaltungsstoffwechsels auf die Wachstumsrate erwies sich als vernachlässigbar. Eine Substratinhibierung wurde nicht festgestellt. Dieser Ansatz ist ein Beispiel für das **Optimieren** nach einem **mathematischen Modell**.
- Durch Kurvenanpassung der Modellfunktion an die Meßdaten mit dem Simplex-Algorithmus konnten die Parameter der kontinuierlichen Kultur für Lactobacillus confusus erstmals bestimmt werden: der maximale Ertragskoeffizient $Y_e = 0.039 \text{ g Tg/g Glc}$, die maximale Wachstumsrate $\mu_{\max} = 0.996 \text{ h}^{-1}$, die maximale Lactat-Konzentration $P_{\max} = 37.46 \text{ g/l}$ sowie der Hemmkoeffizient $n = 0.995$, der die Hemmwirkung von Lactat und Ethanol erfaßt und die Substratsättigungskonstante $K_s = 0.049 \text{ g/l}$.
- Dieses Modell ist nur für das Wachstum in MRS-Medium bei einem pH-Wert von 6.5, einer Temperatur von 30 °C und leichter Stickstoffbegasung im MRS-Medium gültig. Auf die Optimierung der L-Hic-DH-Volumenaktivität läßt sich das Modell nicht anwenden, da die Volumenaktivität weder im Batch noch in kontinuierlicher Kultur streng mit dem Wachstum gekoppelt ist.

6. Simplex-Optimierung

- Die L-Hic-DH-Produktion wurde als Beispiel für die Optimierung einer Enzymproduktion mit Hilfe der **Simplex-Suchstrategie**, für die ein Programm erstellt wurde, unter **simultaner Variation** der Fermentationsparameter und hoher Parameterzahl gesteigert.
- Durch die Anwendung des Simplex-Algorithmus war die gleichzeitige Variation von 32 Parametern (Kulturbedingungen: Rührergeschwindigkeit, pH-Wert, Temperatur, Verdünnungsrate, Stickstoff-Begasungsrate usw. und Mediumskomponenten: Vitamingehalt, Menge an zusätzlichen Aminosäuren, Ketosäuren, C-, P-Quellen, komplexe Extrakte, Mangan- und Eisen-Gehalt) möglich.
- Der Algorithmus war bereits nach 20 Optimierschritten in der Lage, ein verbessertes Nährmedium und Fermentationsbedingungen vorzuschlagen, die eine hohe Volumenaktivität von **598 U/l** mit gleichzeitig hoher spezifischer Aktivität bewirkten. Die besten Ergebnisse der Simplex-Optimierung waren den übrigen Ergebnissen in kontinuierlicher Kultur hinsichtlich maximaler Volumenaktivität und spezifischer Aktivität oder gleichzeitig hoher Volumenaktivität und Produktivität überlegen.

- Somit wurde eine Erhöhung um den Faktor Faktor 10.5 gegenüber der mittleren Aktivität der Ausgangsvorschläge und um den Faktor 3.9 gegenüber der maximalen Aktivität des besten Anfangsvorschlages erreicht.
- Im Laufe der Optimierung trat eine Zunahme des Folsäure-Gehaltes, der Malzextrakt-Menge und des Isoleucin- und Arginin-Gehaltes in den Mediumsvorschlägen auf. Dagegen nahmen Valin, Leucin und anorganische N-, P-Quellen stark ab.
- Die simultane Variation gab deutliche Hinweise auf einen Einfluß von Vitaminen, besonders der Folsäure, von Verdünnungsrate und Begasungsrate auf die spezifische Aktivität und auf die L-Hic-DH-Volumenaktivität und des Arginins auf die Volumenaktivität.

7. Kosten-Minimierungsansätze

- Die Verminderung der komplexen Extrakte im MRS-Medium führte zu einem drastischen Enzymaktivitätsverlust sowohl in Batch-Kulturen als auch in der kontinuierlichen Kulturen.
- Durch den Zusatz nur einer Mediumskomponente, der Folsäure, konnte dieser Verlust kompensiert werden: Achtfach höhere Aktivitäten (**302 U/l**) als im minimierten Medium, und sogar höhere Aktivitäten als im MRS-Medium (mit Standard-Zuckergehalt: 18.2 g/l) wurden gemessen.
- Hierdurch war eine kontinuierliche Enzymproduktion mit einem vereinfachten Medium möglich. Durch Sammeln der Organismen im Eisbad über 3 Tage hinweg wurde bei nur 6 % Lagerverlust eine für die Aufarbeitung nötige Enzymmenge hergestellt ($76 \text{ U/l} \times h$ bei $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$ entsprechend einer Raum-Zeit-Ausbeute von **1812 U/(l × d)**). Der Preis des minimierten Mediums mit Folsäure liegt 5 mal tiefer als der des MRS-Mediums.

8. Ausblick

Die Anwendung einer intelligenten, wenige Schritte benötigenden Suchstrategie zur Mediumsoptimierung, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, ist dort angeraten, wo die Steigerung einer Enzymaktivität oder der Zellmasse im komplexen Zusammenhang durch gentechnologische Methoden nicht möglich ist.

Anhang A. Verschiedenes

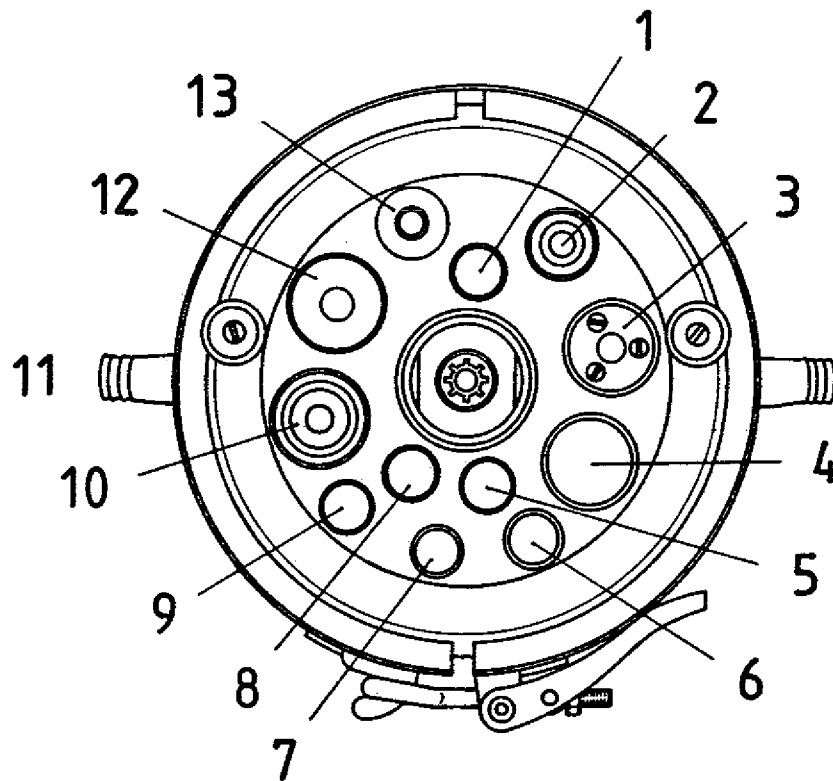


Abb. 44. Aufsicht auf den Deckel des Fermentergefäßes: Biostat M

- 1: Temperaturfühler 2: Thermofalle 3: Blindschraube 4: Redoxelektrode
- 5: Probenahme 6: Animpfstutzen mit Septum 7: Gaseinblasring mit vorgeschalteten Filtern und Rotameter 8: permanente Abdosierung
- 9: Laugezudosierung 10: pH-Elektrode 11: Thermostatisierung 12: Abluftkühler, 13: 4-fach-Stutzen für z.B. Säure und Animpfkultur

Anhang B. Simplex-Programm

```
1 REM          PROGRAMM SIMPLEX
2 :
3 :
4 :
5 REM _____ 6 :
7 :
8 :
10 REM Simplex als Suchstrategie für optimale Prozessparameter bei unbekanntem
20 REM Zusammenhang zwischen unabhängigen und abhängigen Variablen
30 :
40 REM Beispiel:
50 REM Suche nach optimalen Fermentationsparametern für eine maximale Enzym-
60 REM aktivität (Aktivität /l Kultur) einer Bakterienkultur
70 :
80 :
90 REM Literatur zum Simplexalgorithmus:
100 REM (zum Fitten von Parametern bei bekanntem Zusammenhang der Variablen x
110 REM mit Funktion y(x) am Beispiel der Michaelis-Menten-Kinetik  $y = ax/(b + x)$ )
120 :
130 :
140 REM      - Nelder, J.A. and Mead, R. (1965): A simplex method for function
150 REM          minimization  Computer Journal 7, 308
160 REM      - Caceci, M.S. and Cacheris, W.P. (1984): Fitting curves to data
170 REM          Byte 5
180 REM      - Yarbrow, L.A. and Deming, S.T. (1974): Selection and preprocess-
190 REM          ing of factors for Simplex-optimization  Anal.Chim.Acta 74,
200 REM          391
210 :
220 REM _____
230 REM Version Dezember 1988 U.Monter a:simp2.bas
240 REM 32 parameter im Beispiel
250 REM      1Rührer(rpm) 2D(1/h) 3pH 4T(°Celsius) 5N-Gas(NL/min) 6Glc(g/l)
260 REM      2Malt(g/l) 8Hefe(g/l) 9Corn(ml Auszug/l) 10Malz(g/l) 11Pepcas
270 REM      (g/l) 12Fleisch(g/l) 13Mn(mg/l) 14Fe(mg/l) 15Tween(g/l) 16Vit1
280 REM      (µg/l) 17Vit2(µg/l) 18Vit3(µg/l) 19PO4(g/l) 20NH4Cl(g/l) 21Citr
290 REM      (g/l) 22Asc(g/l) 23AS1(g/l) 24AS2(g/l) 25AS3(g/l) 26AS4(g/l)
300 REM      27AS5(g/l) 28AS6(g/l) 29AS7(g/l) 30KS1(g/l) 31KS2(g/l) 32Hut(%
310 REM      Stamm/ )
320 :
330 REM _____
340 :
350 OPTION BASE 1
360 DEFINT I - N: REM          PLATZZUWEISUNGEN
370 M = 32: REM      Zahl der Parameter mit Spaltenindex J
380 N = M + 1: REM      Zahl der Vertices mit Zeilenindex I
390 REM      Koeffizienten für Operationen mit der schlechtesten Vertex
400 ALPHA = 1: REM      Reflexionskoeffizient (> 0)
410 BETA = .5: REM      Kontraktionskoeffizient (< 1)
420 GAMMA = 2: REM      Expansionskoeffizient (> 1)
430 :
440 :
450 :
```

```

460 DIM SIMP(N,N): REM N Zellen und M (Parameterzahl) + 1 (Ergebnis) Spalten
462 REM      Simplex: Bereich, der eine Dimension mehr als der Raum hat,
464 REM      der durch m Parameter definiert ist
466 REM      Vertex: eine Zeile mit m Spalten (Parametern), manchmal im
468 REM      Programm auch für m + 1 Spalten
470 DIM S(M), P(M), Q(M): REM Schrittweiten und Werte (P,Q) deren Addition
475 REM      zur Anfangsvertex die übrigen Vertices ergibt
500 DIM H(N): REM Index der Zeile mit dem höchsten Wert in der n-ten Spalte
502 REM      simp(H(N),3) ist z.B. die Zeile mit dem höchsten Wert in der
504 REM      3. Spalte; simp(H(N),N) ist das höchste Ergebnis;
506 REM      simp(H(N),J) ist die Zeile mit dem höchsten Ergebnis
510 DIM L(N): REM Index der Zeile mit dem niedrigsten Wert in der n-ten Spalte
520 DIM MEAN(1,N): REM Mittelwert der jeweiligen Spalten der SIMP(N,N)
530 DIM CENTER(N): REM Mittelpunkt der Simplex (N,N) ohne die schlechteste Vert
540 DIM VNEXT(1,N): REM neue, zu testende Vertex (ohne die n-te Spalte)
550 REM -----
560 DATA 200.,0.16,6.2,29.,0.2,10.,5.,10.,0.,0.,5.,5.,0.025,2.,1.,2.,10.
570 DATA 10.,2.,1.,1.,0.5,0.,0.,0.,0.,0.,0.,0.,0.,0.
580 REM m Parameter
590 DATA 560.,0.432,3.2,11.2,1.152,32.,24.,24.,24.,24.,24.,24.,0.8,16.,4.,40.
600 DATA 80.,80.,4.,4.,4.,1.6,4.,4.,4.,4.,4.,4.,4.,4.
610 REM m Schrittweiten (80% der Anfangswerte)
615 REM -----
620 REM      EINLESEN DER ANFANGSWERTE, SCHRITTWEITEN
630 REM      UND BERECHNEN DER ANFANGSSIMPLEX
632 REM      -----ABFRAGE zum ÜBERSPRINGEN DER ANFANGSSIMP
633 PRINT "Lastsimp bereits im Datenfile (1) oder Neubeginn (0) ? "
635 A$="":WHILE A$="" :A$=INKEY$:WEND
637 IF INSTR("0",A$) GOTO 650
639 IF INSTR("1",A$) GOTO 1238: REM      Auslesen der Lastsimp aus dem File
641 PRINT "Gib nur 1 oder 0 ein! ";A$;" kenne ich hier nicht! "
642 GOTO 633
648 REM -----
650 FOR I= 1 TO M
660 READ SIMP(1,I): REM      erste Vertex
670 NEXT I
680 FOR I= 1 TO M
690 READ S(I)
700 NEXT I
710 FOR I= 1 TO M
720 P(I)=S(I)*(SQR(N)+M-1)/(M*SQR(2))
730 Q(I)=S(I)*(SQR(N)-1)/(M*SQR(2))
740 NEXT I
750 FOR I= 2 TO N: REM      Schleife über verbleibende Vertices
760 FOR J= 1 TO M
770 SIMP(I,J)=SIMP(1,J)+Q(J)
780 NEXT J
790 SIMP(I,I-1)=SIMP(1,I-1)+P(I-1)
800 NEXT I
810 :
820 PRINT "Ausdruck der Anfangssimplex gewünscht (y/n)?"
830 A$="":WHILE A$="" :A$=INKEY$:WEND
840 IF INSTR("yYzZjJ",A$) GOTO 860
845 IF INSTR("nN",A$) GOTO 1060
850 PRINT "Gib nur j/y oder n ein! ";A$;" kenne ich hier nicht!"
855 GOTO 820

```

```

858 REM -----
860 REM          AUSDRUCK DER ANFANGSSIMPLEX
861 REM (wird für n Zeilen und m Spalten berechnet, n-te Spalte ist zu
863 REM messen; Anfangssimplex Simp(N,M) mit Zeilenindex I, Spaltenindex J
864 :
870 LPRINT "Anfangssimplex"
880 LPRINT
890 LPRINT "M = ";M
900 LPRINT "N = ";N
910 LPRINT "P-Werte "
920 FOR I=1 TO M
930 LPRINT USING " + #.## ^ ^ ^ ^";P(I);
940 NEXT I
950 LPRINT
960 LPRINT "Q-Werte "
962 FOR I=1 TO M
964 LPRINT USING " + #.## ^ ^ ^ ^";Q(I);
966 NEXT I
968 LPRINT
970 LPRINT
972 LPRINT "Anfangssimplex (ohne n-te Spalte): "
980 FOR ZEILE=1 TO N
990 FOR SPALTE=1 TO M
1000 LPRINT USING " + ###.###";SIMP(ZEILE,SPALTE);
1010 NEXT SPALTE
1020 LPRINT
1030 NEXT ZEILE
1040 LPRINT
1050 :
1060 REM -----
1070 :
1080 PRINT "Ergebnis der Anfangssimplex (N,M): "
1090 :
1100 PRINT "Enzymaktivitäten bitte nacheinander und jeweils mit enter eingeben"
1105 PRINT "FALLS EINE AKTIVITÄT FALSCH EINGEGEBEN WURDE PROGRAMM MIT ctrl br ";
1107 PRINT "ABBRECHEN UND MIT RUN NEU STARTEN! "
1110 FOR I=1 TO N
1120 PRINT "Nr. ";I;":";
1130 INPUT SIMP(I,N): REM          Eingabe der n-ten Spalte der
1140 NEXT I: REM                  Simplex (N,N) (Ergebnis)
1145 PRINT "Lastsimplex "
1150 :
1160 FOR I=1 TO N: REM          Anzeige der Simplex(N,N) auf dem
1170 FOR J=1 TO N: REM          Bildschirm
1180 PRINT USING " + ###.###";SIMP(I,J);
1190 NEXT J
1200 PRINT
1210 NEXT I
1215 REM In 1100-1210 wird die Anfangssimplex Simp(N,M) durch die neue Simplex
1216 REM Simp(N,N) mit Ergebnis ersetzt od. in der Simplex aus dem letzten
1217 REM Durchgang (Lastsimp) wird die schlechteste Vertex ersetzt od. die
1218 REM Simplex aus dem letzten Durchgang wird durch eine neue, kontrahierte
1219 REM Simplex ersetzt; Abspeicherung im Datenfile Lastsimp.
1220 :

```

```

1223 REM -----
1225 :
1230 GOSUB 3000: REM           für Datei Lastsimp auf Disk
1232 :
1234 PRINT "Daten der neuen Simplex wurden im File Lastsimp auf Disk abgelegt "
1236 :
1238 PRINT "Daten werden aus dem File Lastsimp vom Disk gelesen "
1240 :
1242 GOSUB 3140: REM           für Datei Lastsimp vom Disk
1244 :
1246 :
1250 REM -----
1251 REM           AUSDRUCK DER LAST-SIMPLEX (aus dem letzten Durchgang)
1252 PRINT "Ausdruck der Lastsimplex gefällig (j/n)?"
1253 A$="":WHILE A$="":A$=INKEY$:WEND
1254 IF INSTR("yYzZjJ",A$) GOTO 1260
1255 IF INSTR("nN",A$) GOTO 1370
1256 PRINT "Gib nur j/y od. n ein! ";A$;" kenne ich hier nicht!"
1257 GOTO 1252
1258 :
1260 LPRINT "Last-Simplex"
1270 LPRINT
1280 FOR I=1 TO N
1290 FOR J=1 TO N
1300 LPRINT USING " +###.###";SIMP(I,J);
1310 NEXT J
1320 LPRINT
1330 NEXT I
1340 :
1350 REM -----
1360 :
1370 REM           Ordnen der Lastsimp nach Grösse
1380 :
1390 GOSUB 3400: REM           sucht kleinste Vertex
1400 :
1402 :
1404 LPRINT "L(N): ";
1406 LPRINT USING " +###.###";L(N)
1408 LPRINT
1410 LPRINT "H(N): ";
1412 LPRINT USING " +###.###";H(N)
1414 LPRINT
1416 :
1420 REM -----
1430 :
1440 REM           MITTELWERT aller Spalten
1450 GOSUB 4300
1460 :
1510 REM -----
1520 FOR J=1 TO M
1530 CENTER(J)=0: REM           Berechnen des Mittelpunktes der Simplex ohne
1540 FOR I=1 TO N: REM           schlechteste Vertex und Ergebnis simp(I,N)
1550 IF I < > L(N) THEN CENTER(J)=CENTER(J)+SIMP(I,J)
1560 NEXT I
1570 CENTER(J)=CENTER(J)/M
1580 NEXT J
1590 :

```

```

1600 LPRINT "center: "
1610 FOR J=1 TO M
1620 LPRINT USING " +###.###";CENTER(J);
1630 NEXT J
1640 LPRINT
1642 :
1644 PRINT "center: "
1646 FOR J=1 TO M
1648 PRINT USING " +###.###";CENTER(J);
1650 NEXT J
1652 PRINT
1654 REM _____
1660 :
1670 GOSUB 3610          FR REFLEXION
1680 :
1690 REM _____
1692 PRINT "reflektierte Vertex: "
1694 FOR J=1 TO M
1696 PRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
1698 NEXT J
1699 PRINT
1700 PRINT
1702 PRINT "Gib das Ergebnis der reflektierten Vertex ein: "
1704 INPUT "Ergebnis von VNEXT ";VNEXT(1,N)
1706 LPRINT "reflektierte Vertex mit Ergebnis: "
1708 FOR J=1 TO N
1710 LPRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
1712 NEXT J
1714 LPRINT
1720 :
1730 REM _____
1740 IF VNEXT(1,N) < SIMP(L(N),N) THEN 2120 ELSE GOSUB 3750
1750 REM Falls die reflektierte Vertex schlechter als (L(N),N) ist, kontrahiere
1760 REM (2120,3900) od. falls die reflektierte Vertex grösser als (L(N),N)
1770 REM ist, ersetze die schlechteste Vertex (3750).
1772 :
1774 REM VNEXT (die ersetzte Simp (L(N),N))ist nun die reflektierte Vertex (da
1776 REM die reflektierte besser als die schlechteste war).
1777 :
1778 REM _____spez. Korrektur einer nach Reflexion besseren Vertex
1779 :
1780 PRINT "Korrektur der gemessenen, reflekt. Vertex (L(N),J) gewünscht? "
1782 PRINT "(j/n) ? "
1784 A$="":WHILE A$=""A$=INKEY$:WEND
1786 IF INSTR("nN",A$) GOTO 1820
1788 IF INSTR("yYjZzJ",A$) GOTO 1796
1790 PRINT "Gib nur j/y oder n ein! ";A$;" kenne ich hier nicht! "
1792 GOTO 1780
1794 :
1796 FOR J=1 TO M
1798 PRINT "Parameter-Nr. ";J;"= "
1800 PRINT "Aenderung dieses Parameters gewuenscht (j/n) ? "
1801 A$="":WHILE A$=""A$=INKEY$:WEND
1802 IF INSTR("nN",A$) GOTO 1807
1803 IF INSTR("yYzZjJ",A$) GOTO 1806
1804 PRINT "Gib nur j/y oder n ein! ";A$;" kenne ich hier nicht! "
1805 GOTO 1800

```

```

1806 INPUT SIMP(L(N),J)
1807 NEXT J
1808 PRINT "korregierte, reflektierte Vertex : "
1809 FOR J=1 TO N
1810 PRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
1811 NEXT J
1812 LPRINT "korregierte, reflektierte Vertex: "
1813 FOR J=1 TO N
1814 LPRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
1815 NEXT J
1816 :
1817 REM _____
1818 :
1820 IF VNEXT(1,N) >= SIMP(H(N),N) THEN GOSUB 4100 ELSE 2020
1830 REM falls die reflektierte besser als die beste Vertex ist, expandiere
1840 REM (4100); sonst behalte die reflektierte Vertex (VNEXT).
1850 :
1860 :
1870 IF VNEXT (1,N) >= SIMP(H(N),N) THEN GOSUB 3750 ELSE 2020
1880 REM VNEXT ist nun die expandierte; falls diese immer noch besser als die
1890 REM beste (= nun die reflektierte) ist, akzeptiere die expandierte (3750)
1900 REM sonst die reflektierte Vertex.
1905 :
1910 :
1920 PRINT "expandierte Vertex ist akzeptiert ": REM *****
1930 PRINT "expandierte Vertex mit Ergebnis: "
1940 FOR J=1 TO N
1950 PRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J); REM ist vnnext(1,J)
1960 NEXT J
1962 PRINT
1966 LPRINT "expandierte Vertex ist akzeptiert "
1967 LPRINT
1968 LPRINT "expandierte Vertex mit Ergebnis: "
1970 FOR J=1 TO N
1972 LPRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
1974 NEXT J
1976 LPRINT
1980 :
1990 :
2000 GOTO 2600: REM Korrekturmöglichkeit
2010 :
2012 PRINT "reflektierte Vertex ist akzeptiert "
2020 LPRINT "reflektierte Vertex ist akzeptiert ": REM *****
2030 REM (da durch Expansion nicht besser)
2040 LPRINT "reflektierte Vertex mit Ergebnis: "
2050 FOR J=1 TO N
2060 LPRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J); REM = vnnext(1,J) ersetzte Verte
2070 NEXT J
2080 LPRINT
2082 PRINT "reflektierte Vertex mit Ergebnis: "
2084 FOR J=1 TO N
2086 PRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
2088 NEXT J
2089 PRINT
2090 :
2100 GOTO 2600: REM Korrekturmöglichkeit
2110 :

```

```

2120 GOSUB 3900: REM           für KONTRAKTION
2130 :
2140 IF VNEXT(1,N) >= SIMP(L(N),N) THEN GOSUB 3750 ELSE GOTO 2290
2150 REM vnext ist nun die kontrahierte Vertex ;
2160 REM akzeptiere sie, falls besser als die schlechteste (3750),
2170 REM sonst kontrahiere die ganze Simplex (2290).
2180 :
2182 PRINT "kontrahierte Vertex ist akzeptiert "
2184 PRINT
2186 PRINT "kontrahierte Vertex mit Ergebnis: "
2188 FOR J=1 TO N
2190 PRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
2192 NEXT J
2194 PRINT
2200 LPRINT "kontrahierte Vertex ist akzeptiert ": REM *****
2210 LPRINT "kontrahierte Vertex mit Ergebnis: "
2220 FOR J=1 TO N
2230 LPRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J); REM ist vnext(1,J)
2240 NEXT J
2250 LPRINT
2260 :
2270 GOTO 2600: REM           Korrekturmöglichkeit
2280 REM -----
2290 REM           KONTRAKTION der GANZEN SIMPLEX ausser
2300 REM           der besten Vertex zu dieser besten hin
2310 FOR I=1 TO N
2320 FOR J=1 TO M
2330 SIMP(I,J)=BETA*(SIMP(I,J) + SIMP(H(N),J))
2340 NEXT J
2350 NEXT I
2360 LPRINT "kontrahierte Simplex: "
2370 FOR I=1 TO N
2380 FOR J=1 TO M
2390 LPRINT USING " +###.###";SIMP(I,J);
2400 NEXT J
2410 LPRINT
2420 NEXT I
2430 LPRINT "kontrahierte Simplex SIMP(N,M) wurde vorgeschlagen: REM *****
2440 PRINT "Ergebnisse der kontrahierten Simplex: "
2450 REM -----
2460 REM Eingabe der n-ten Spalte (Ergebnis) der kontrahierten Simplex
2465 PRINT "Achtung, das beste Ergebnis der vorherigen,besten ";H(N);" Simplex "
2468 PRINT " muß nicht neu gemessen werden. "
2470 GOTO 2900: REM           Korrekturmöglichkeit
2480 :
2490 :
2500 :
2510 :
2520 :
2530 REM           Ende eines Durchgangs
2540 :
2550 :

```

```

2600 REM -----
2602 REM                      KORREKTUR der ERSETZTEN VERTEX
2605 :
2610 PRINT "Korrektur der gemessenen, ersetzten Vertex (L(N),J) gewünscht ";
2615 PRINT " (j/n) ? "
2620 A$="":WHILE A$="":A$=INKEY$:WEND
2630 IF INSTR("nN",A$) GOTO 1150
2640 IF INSTR("yYjJzZ",A$) GOTO 2710
2650 PRINT "Gib nur j/y oder n ein! ";A$;" kenne ich hier nicht! "
2670 GOTO 2610
2680 :
2710 FOR J=1 TO N
2720 PRINT "Parameter-Nr. ";J;" = "
2730 PRINT "Änderung dieses Parameters gewünscht (j/n) ? "
2740 A$="":WHILE A$="":A$=INKEY$:WEND
2750 IF INSTR("nN",A$) GOTO 2800
2760 IF INSTR("yYzZjJ",A$) GOTO 2790
2770 PRINT "Gib nur j/y oder n ein! ";A$;" kenne ich hier nicht! "
2780 GOTO 2730
2790 INPUT SIMP(L(N),J)
2800 NEXT J
2802 PRINT "korregierte Vertex: "
2804 FOR J=1 TO N
2806 PRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
2808 NEXT J
2810 PRINT
2818 LPRINT "korregierte Vertex: "
2820 FOR J=1 TO N
2830 LPRINT USING " +###.###";SIMP(L(N),J);
2840 NEXT J
2850 GOTO 1150: REM                      geht dort nach 3000 zur Ablage der
2855 REM                      korrigierten Vertex im Datenfile
2860 REM -----
2870 :
2890 REM                      Korrektur der kontrahierten Simplex
2895 REM          zusätzliche Schlaufe über alle Vertices, noch zu programmieren
2900 PRINT "ÄTSCH "
2910 GOTO 1100
2920 :
2930 REM -----
2970 REM -----
2980 REM                      BEGINN DER UNTERPROGRAMME
2990 REM -----
3000 REM -----
3010 REM                      ABLEGEN DER NEUESTEN SIMPLEX (LASTSIMP)
3020 REM                      IM DATENFILE VON DISK A
3030 OPEN "a:lastsimp.dat" FOR OUTPUT AS 1: REM
3040 PRINT #1,SIMP(N,N)
3050 FOR I=1 TO N
3060 FOR J=1 TO N-1
3070 PRINT #1, USING " +###.###, ";SIMP(I,J);
3080 NEXT J
3090 PRINT #1, USING " +###.###";SIMP(I,N)
3100 PRINT
3110 NEXT I
3120 CLOSE 1
3130 RETURN: REM                      geht nach 1240

```

```

3140 REM -----
3150 :
3160 :
3170 OPEN "a:lastsimp.dat " FOR INPUT AS 2
3180 INPUT #2,SIMP(N,N): REM      ABRUFEN DER LETZTEN SIMPLEX (LASTSIMP)
3190 FOR I=1 TO N: REM          AUS DEM DATENFILE VON DISK A
3200 FOR J=1 TO N
3210 INPUT #2,SIMP(I,J)
3220 NEXT J
3230 NEXT I
3240 CLOSE 2
3250 RETURN: REM                geht nach 1250
3260 REM -----
3400 FOR J=1 TO N
3410 L(J)=1
3420 H(J)=1: REM                Suche nach der Vertex mit dem höchsten,
3430 FOR I=1 TO N: REM          niedrigsten Ergebnis (simp(I,N))
3440 IF SIMP(I,J) < SIMP(L(J),J) THEN L(J)=I
3450 IF SIMP(I,J) > SIMP(H(J),J) THEN H(J)=I
3460 NEXT I
3470 NEXT J
3472 :
3474 PRINT "L(N): ";
3476 PRINT USING " +###.###";L(N)
3478 PRINT
3480 PRINT "H(N): ";
3482 PRINT USING " +###.###";H(N)
3484 PRINT
3486 :
3590 RETURN: REM                geht nach 1400
3600 REM -----
3610 :
3620 REM                        REFLEXION der schlechtesten Vertex
3630 REM                        am Mittelpunkt
3640 FOR J=1 TO M
3650 VNEXT(1,J)=(1+ALPHA)*CENTER(J)-ALPHA*SIMP(L(N),J)
3660 NEXT J
3670 LPRINT "reflektierte Vertex: "
3680 FOR J=1 TO M
3690 LPRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
3700 NEXT J
3710 LPRINT
3720 RETURN: REM                geht nach 1680
3730 REM -----
3740 :
3750 REM                        ERSATZ der schlechtesten Vertex durch
3760 REM                        VNEXT (reflektierte, expandierte od.
3770 REM                        kontrahierte Vertex)
3780 FOR J=1 TO N
3790 SIMP(L(N),J)=VNEXT(1,J)
3800 NEXT J
3850 RETURN: REM                geht nach 1820 (refl. akzeptieren) od. 2200 (Kontr.)
3860 REM -----
3870 :
3880 :
3890 :

```

```

3900 REM                      KONTRAKTION der SCHLECHTESTEN VERTEX
3910 REM                      zum Mittelpunkt hin (da die schlech-
3920 REM                      teste Vertex die reflektierte war)
3930 FOR J=1 TO M
3940  VNEXT(1,J)=BETA*SIMP(L(N),J) + (1-BETA)*CENTER(J)
3950 NEXT J
3960 LPRINT "kontrahierte Vertex: "
3970 FOR J=1 TO M
3980  LPRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
3990 NEXT J
3992 PRINT "kontrahierte Vertex: "
3994 FOR J=1 TO M
3996  PRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
3998 NEXT J
4000 PRINT
4002 PRINT "vnex ist nun die kontrahierte Vertex (1,J) "
4004 PRINT
4006 PRINT "Gib das Ergebnis der kontrahierten Vertex ein: "
4007 PRINT
4008 LPRINT "VNEXT ist nun die kontrahierte Vertex(1,J) "
4010 LPRINT
4020 LPRINT "Gib das Ergebnis der kontrahierten Vertex ein: "
4032 INPUT "Ergebnis von vnex ";VNEXT(1,N)
4040 RETURN: REM              geht nach 2140
4050 :
4060 REM -----
4090 :
4100 REM                      EXPANSION der reflektierten Vertex
4110 REM                      (heißt hier simp(L(N),J); hat
4120 REM                      schlechteste ersetzt) zum Mittelpunkt
4130 FOR J=1 TO M
4140  VNEXT(1,J)=GAMMA*SIMP(L(N),J) + (1-GAMMA)*CENTER(J)
4150 NEXT J
4160 LPRINT "expandierte Vertex: "
4170 FOR J=1 TO M
4180  LPRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
4190 NEXT J
4192 LPRINT
4196 PRINT "expandierte Vertex: "
4198 FOR J=1 TO M
4200  PRINT USING " +###.###";VNEXT(1,J);
4202 NEXT J
4204 PRINT
4210 LPRINT "Gib das Ergebnis der expandierten Vertex ein: "
4212 PRINT "Gib das Ergebnis der expandierten Vertex ein: "
4220 INPUT "Ergebnis von VNEXT ";VNEXT(1,N)
4230 RETURN : REM              geht nach 1870
4240 REM -----
4300 REM                      MITTELWERT mean(1,N) der Spalten in
4310 REM                      der Simplex Simp(N,N)
4320 FOR J=1 TO N
4330  MEAN(1,J)=0
4340  FOR I=1 TO N
4350   MEAN(1,J)=MEAN(1,J) + SIMP(I,J)
4360  NEXT I
4370  MEAN(1,J)=MEAN(1,J)/N
4380 NEXT J

```

```
4390 PRINT "Mittelwerte der Spalten: "  
4400 FOR J= 1 TO N  
4410 PRINT USING " + ###.###";MEAN(1,J);  
4420 NEXT J  
4430 PRINT  
4432 LPRINT "Mittelwerte der Spalten: "  
4434 FOR J= 1 TO N  
4436 LPRINT USING " + ###.###";MEAN(1,J);  
4438 NEXT J  
4439 LPRINT  
4440 RETURN: REM          geht nach 1460  
4450 REM _____  
4460 REM _____
```

Das oben wiedergegebene Programm enthält die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Werte für die Anfangssimplex.

Anhang C. Liste der Chemikalien und Geräte

Chemikalien

- Boehringer, Mannheim, D
Glucose-UV-Test (716-251), Glucose-Harnteststreifen, Nicotinadenindinucleotid (reduziert)
- Degussa, Hanau, D
L-Amino- und Ketosäuren für die Fermentation: Arginin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Valin; Ketoleucin, Ketovalin, Ketovaleriansäure (Na^+ -Salze)
- Fluka, Buchs, D
Citronensäure-Monohydrat, L-Citrullin, L-Ornithinmonohydrochlorid, L-Phenylalanin
- Merck, Darmstadt, D
Nährbodenbestandteile: D(-)-Arabinose, Ascorbinsäure, L-Asparaginsäure, Diammoniumhydrogencitrat, Fleischextrakt, D(-)-Fructose, D(+)-Glucose-Monohydrat, Gluconsäure, Glycerin 87 % p.A., D(+)-Lactose, Maltose-Monohydrat, Malzextrakt, D-Mannit, MRS-Nährbouillon, Natriumacetat, Pepton aus Casein (tryptisch), Saccharose, D(-)-Sorbit, D(+)-Xylose
Salze: $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, KCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaOH, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 24 \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
Vitamine: Biotin, Calcium-Pantothenat, Folsäure (für biochemische Zwecke), Nicotinamid, para-Aminobenzoessäure, Pyridoxin $\times \text{HCl}$, Pyridoxamin, Riboflavin, Thiaminhydrochlorid, Vitamin B_{12}
Sonstige: Rinderserumalbumin, Titriplex I, Titriplex II
- NIO Nahrungsmittel GmbH, Krefeld, D
Dextrose "Isnur", 99.5 %
- Ohly, Hamburg, D
Hefeextrakt
- Pierce, Illinois, USA
Probennachweisreagenz A und B für den BCA-Test
- Sigma, München, D
Hydroxyisocaproat und Ketoisocaproat für Enzymtests und HPLC, Lactat für HPLC; Tween 80, L-Tryptophan

Geräte

- Laborfermenter:
Biostat M mit Glasgefäß M2 (Flachboden), Biostat E mit Stahlgefäß ER (Rundboden), Braun Diesseltech, Bad Melsungen, D
- Dosierstrecke:
YPP01, Sartorius, Göttingen, D
- Mikrofiltration:
Sartocon Mini-Mikrofiltrationseinheit, Sartorius, Göttingen
- Pumpen:
Watson Marlow Schlauchpumpen 501 U (10, 50, 100, 170 upm), Verder, Düsseldorf
eingebaute Korrekturmittelpumpen an Fermenter und Dosierstrecke
- MEAS-Zubehör:
IBM AT3, IBM; Drucker FX-85, Epson; Interface, Siemens
- Photometer:
Spektrophotometer UV 160 und UV 150-02, Shimadzu, Kyoto, Japan
Titertek-Twinreader Plus, Flow Laboratories, Meckenheim, D
- Zentrifugen:
Sorvall-Kühlzentrifuge RCB-5B, DuPont de Nemours, Bad Homburg, D
Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode, D
- Schwingmühle
MM2, Retsch, Haan, D
- HPLC-Anlage:
Gynkotheke, Germering bei München, D mit Säule ORH 801, ICI, Frankfurt
- Gaschromatograph:
5480, Hewlett Packard, USA mit Säule Porapak QS, 80 - 100 mesh
- Aminosäureanalysator:
LC 5001, Biotronik, Maintal, D
- Sterilfilter:
Flüssigfiltration: HV-Filter (0.4 μm Porengröße) und Sterivex GM (Porengröße 0.2 μm), Millipore, Eschborn, D; Nalgene-Filter (Porengröße 0.2 μm), Nalge, Rochester, NY, USA; Sartopure PP mini (Porengröße 0.2 μm), Sartorius, Göttingen
Luftfiltration: Midisart, Sartorius, Göttingen, D; Bacterial Air Vent, Biotest Serum, Frankfurt, D; Blaurandfilter, Schleicher und Schuell, Dassel, D
- Software:
MEAS, Version 1.1, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, D; Concurrent Dos, Digital Research, Monterey, CA, USA; MS-DOS, Version 3.0, Microsoft; Graphikprogramme GDDM, IBM, und PLOTIT und Correl Draw, IBM; Textverarbeitung GML, IBM; Programme: Microsoft BASIC und Turbopascal, Version 6.0, Borland, CA, USA

Anhang D. Liste der Abkürzungen und Nomenklaturliste

Abkürzungen

A_{578}	Optische Dichte bei 578 nm
Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
aufg	aufgenommen
Citr	Citrullin
DH	Dehydrogenase
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMR	Enzymmembranreaktor
geb	gebildet
Glc	Glucose
Glu	Glutamat
L-Hic-DH	L-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap.	Kapitel
KPi	Kaliumphosphatpuffer
Lac	Lactat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Malt	Maltose
max.	maximal
MEAS	Meßwerterfassungssystem
M_r	Molekulargewicht
Met	Methionin
NI	Normliter
$\text{NADH} + \text{H}^+$	Nicotinadenindinucleotid, reduzierte Form
$\text{NADPH} + \text{H}^+$	Nicotinadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
OD	Optische Dichte
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
Prot. i. RE	Protein im Rohextrakt
sp	species
spez.	spezifisch

Tg	Trockengewicht
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
upm	Umdrehungen pro Minute
Xyl	Xylose

Nomenklatur

α	()	Reflexionskoeffizient
β	()	Kontraktionskoeffizient
D	(1/h)	Verdünnungsrate
D_c	(1/h)	Kritische Verdünnungsrate
d	(cm)	Schichtdicke
E	()	Extinktion
ε	(l $\times$ mol ⁻¹ $\times$ cm ⁻³)	Extinktionskoeffizient
f	(l/h)	Flußrate
F	()	Verdünnungsfaktor
γ	()	Expansionskoeffizient
K_i	(mol/l), (g/l)	Hemmkonstante
K_M	(mol/l), (g/l)	Michaelis-Menten-Konstante
K_s	(mol/l), (g/l)	Sättigungskonstante für ein Substrat
m_s	(g Glc/(g Tg $\times$ h))	Erhaltungsstoffwechselkoeffizient für das Substrat
m_p	(g Lac/(g Tg $\times$ h))	Erhaltungsstoffwechselkoeffizient für das Produkt
μ	h ⁻¹	spezifische Wachstumsrate
μ_{max}	h ⁻¹	maximale Wachstumsrate
n	()	Hemmkoefizient (hier für Lactat und Ethanol)
P	(g/l)	Produkt
P_{max}	(g/l)	maximale Produktkonzentration
pI	()	isoelektrischer Punkt
q_p	(g Lac/(g Tg $\times$ h))	spezifische Produktbildungsrate
q_s	(g Glc/(g Tg $\times$ h))	spezifische Substrataufnahmerate
S	(g/l)	Substrat
s	(g/l)	aufgenommenes Substrat
$\bar{s}$	(g/l)	Substrat im Kulturüberstand
S_R	(g/l)	Substratkonzentration im Reservoir
S_n	()	Schrittweite
S_{max}	(g/l)	maximal umsetzbare Substratkonzentration
T	°C	Temperatur
τ	(h)	Verweilzeit
t_d	(1/h)	Verdopplungszeit
V	(l)	Volumen
x	(g Tg/l)	Bakteriendichte im steady state und in Batch-Kulturen
X	(g Tg/l)	Bakterienertrag in Batch-Kulturen
Y	(g Tg/g)	Ertragskoeffizient
$Y_{0(S)}$	(g Tg _{geb} /g Glc _{aufg})	maximaler Ertragskoeffizient für Glucose
$Y_{0(P)}$	(g Tg _{geb} /g Lac _{geb})	maximaler Ertragskoeffizient für Lactat
y_H	()	bestes Ergebnis in einer Simplex
y_L	()	schlechtestes Ergebnis in einer Simplex

Anhang E. Literaturverzeichnis

Ablay, P (1987):

Optimieren mit Evolutionsstrategien

Spektrum der Wissenschaft, 7, 104 - 115

Aiba, S., Shoda, M., and Nagatani, M. (1968):

Kinetics of product inhibition in alcoholic fermentation

Biotechnol. Bioeng. 10, 845 - 864

Allison, M.J., Bucklin, J.A., and Robinson, I.M. (1966):

Importance of the isovalerate carboxylation pathway of leucine biosynthesis in the rumen

Appl. Microbiol. 14, 807 - 814

Andrews, J.F (1968):

A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates

Biotechnol. Bioeng. 10, 707 - 723

Barker, H.A (1981):

Amino acid degradation by anaerobic bacteria

Ann. Rev. Biochem. 50, 23 - 40

Béal, C., Louvet, Ph., and Corrieu, G. (1989):

Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398

Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 148 - 154

Beatrix, B., Bendrat, K., Rospert, S., and Buckel, W. (1990): The biotin-dependent sodium pump glutacetyl-CoA decarboxylase from *Fusobacterium nucleatum* (subsp. *nucleatum*)

Arch. Microbiol. 154, 362 - 369

Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y., and Pareilleux, A (1988):

Influence of pH, lactose, and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study

Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 340 - 344

Bibal, B., Vayssier, Y., Tournou, M., and Pareilleux, A (1989):

Enhanced inhibition of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations

Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 630 - 635

Bibal, B., Kapp, C., Goma, G., and Pareilleux, A (1989):

Continuous culture of *Streptococcus cremoris* on lactose using various medium conditions

Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 155 - 159

Bland, R.G. (1981):

Wirtschaftsfaktor lineare Programmierung

Spektrum der Wissenschaft 8, 119 - 130

Buckel, W. (1980):

Analysis of the fermentation pathways of clostridia using doubled labelled glutamate

Arch Microbiol. 127, 167 - 169

Buckel, W. and Barker, H.A (1974):

Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria

J. Bacteriol 117, 1248 - 1260

Buckel, W. and Liedtke, H (1986):

The sodium pump glutacetyl CoA decarboxylase from Acidaminococcus fermentans Specific cleavage by alkanols

Eur. J. Biochem. 156, 251 - 257

Buckel, W. and Semmler, R. (1983):

Purification, characterisation and reconstitution of glutacetyl CoA decarboxylase, a biotin dependent sodium pump from anaerobic bacteria

Eur. J. Biochem 136, 427 - 434

Box, G.E P and Wilson, K.B. (1951):

On the experimental attainment of optimum conditions

J. R. Statist. Soc. B, 13, 1, 1 - 45

Box, G E P, (1955):

Evolutionary operation: A method for increasing industrial productivity

Paper presented to the international conference on statistical quality control, Paris, July 1955.

reproduced in Appl. Statistics (1957): 6, 3 - 22

Brock, D. (1990):

Biotechnology: a textbook of industrial microbiology, 2nd edition, Sinauer Associates, Inc , Sunderland, Ma, USA

(engl. Ausgabe von Crueger, W and Crueger, A (1989): Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, Oldenburg Verlag)

Bryson, V (1952):

The turbidostatic selector - a device for automatic isolation of bacterial variants

Science, N.Y., 116, 48 - 58

Buchanan, R.E. (1918):

Life phases in a bacterial culture

J. Infect. Diseases, 23, 109 - 125

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974):
Bergey's manual of determinative bacteriology
8th ed., Williams Wilkins, Baltimore

Buckenhüskes, H. und Hammes, W.P. (1990):
Starterkulturen bei der Verarbeitung von Obst und Gemüse
BioEngineering 2, 34 - 42

Büchs, J. (1988):
Immobilisierung von aeroben Mikroorganismen an Glassintermaterial am Beispiel der
L-Leucin-Produktion mit *Corynebacterium glutamicum* Berichte des Forschungszentrums
Jülich GmbH, Jül-2251

Caceci, M.S. and Cacheris, W.P. (1984):
Fitting curves to data. The Simplex algorithm is the answer
Byte 5, 340 - 362

Calvo, J.M. (1983):
Leucine biosynthesis in prokaryotes
in: Hermann, K.M. and Somerville, R.L. (eds.), Amino acids. Biosynthesis and genetic
regulation, 267 - 284, Addison-Wesley, London

Chassy, B.M. (1987):
Prospects for the genetic manipulation of *Lactobacilli*
FEMS Microbiol. Rev. 46, 297 - 312

Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. (1983):
Production of ethanol from biomass
Ann. of the NY Acad. Sci. 413, 435 - 447

Cooney, Ch.L., Koplov, H.M., and Häggström, M. (1979):
Transient phenomena in continuous culture
in: Calcott, P.H. (ed.), Continuous culture of cells, 1, pp 143 - 168, Crc Press Inc., Boca Raton,
Florida

Crow, V.L. and Thomas, T.D. (1982):
Arginine metabolism in lactic streptococci
J. Bacteriol 150, 1024 - 1032

Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., and Stalon, V. (1986):
Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria
Microbiol. Rev. 50 (3), 314 - 352

DeMan, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960):
A medium for the cultivation of *Lactobacilli*
J. Appl. Bacteriol. 23, 130 - 135

Deming, St. N. and Morgan, St. L. (1973):

Simplex optimization of variables in analytical chemistry

Anal. Chem. 45, 3, 278A - 282A

de Raucourt, A., Girard, D., Prigent, Y., and Boyaval, P. (1989a):

Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electrodialysis: modelling and simulation

Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 521 - 527

de Raucourt, A., Girard, D., Prigent, Y., and Boyaval, P. (1989b):

Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electrodialysis: model identification

Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 528 - 534

Dumenil, G., Crémieux, A., Phan tan Luu, R., and Combet, M. (1975):

Bioconversion from D,L homoserine to L-threonine. I. Application of factorial designs

Europ. J. Appl. Microbiol. 1, 213 - 220

Dumenil, G., Crémieux, A., Phan-tan-Luu, R., and Aune, J.P. (1975):

Bioconversion from D,L homoserine to L threonine II. Application of the Simplex Method for Optimization

Europ. J. Appl. Microbiol. 1, 221 - 231

Dumenil, G., Mattei, G., Sergent, M., Bertrand, J.C., Laget, M., and Phan tan Luu, R. (1988):

Application of Doehlert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture

Appl. Microbiol. Biotechnol. 27, 405 - 409

Elsden, S.R., Hilton, M.G., and Wallter, J.M. (1976):

The endproducts of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia

Arch. Microbiol. 107, 283 - 288

Exterkate, E.A. (1990):

Differences in short peptide - substrate cleavage by two cell - envelope located serin proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* are related to a secondary binding specificity

Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 401 - 406

Famelart, M.-H., Kobilinsky, A., Bouillanne, Ch. and Desmazeaud, M.J. (1987):

Influence of temperature, pH, and dissolved oxygen on growth of *Brevibacterium linens* in a fermentor

Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 442 - 448

Fiechter, A. (1981):

Batch and continuous culture of microbial, plant, and animal cells

in: Biotechnology, Rehm, H.-J. and Reed, G. (eds.), 1, pp. 453 - 505, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanno, R.S., Magnum, R.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., and Woese, C.R. (1980):

The phylogeny of prokaryotes

Science 209, 457 - 463

Friedman, M.R. and Gaden, E.L. (1970):

Growth and acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dialysis culture system

Biotechnol. Bioeng. 12, 961 - 974

Fülle, R. und Diekmann, S. (1989):

Anpassung des Simplex-Verfahrens an die automatisierte Optimierung des Betriebes von technischen Anlagen

msR, Berlin 32, 11, 508 - 513

Gätje, G. and Gottschalk, G. (1990):

Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*

Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 446 - 449

Gekko, K. and Timasheff, S.N. (1981):

Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol

Biochem. 20, 4677 - 4686

Götz, F., Elstner, E.F., Sedowitz, B., and Lengfelder, E. (1980):

Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum*. II. Superoxide dismutation

Arch. Microbiol. 125, 215 - 220

Goochee, Ch. F., Hatch, R.T., and Cadman, Th. W. (1984):

The response of a nitrogen-limited chemostat culture of *Escherichia coli* B/r to pH and dilution rate steps

Biotechnol. Bioeng. 27, 439 - 446

Hansson, M. and Häggström, M.H. (1984):

Effects of growth conditions on the activities of superoxide dismutase and NADH oxidase in *Streptococcus lactis*

Current Microbiol. 10, 345 - 352

Heimbuch, A.H., Aurand, L.W., and Speck, M.L. (1956):

Some characteristics of growth stimulant in corn steep liquor for *Lactobacillus casei*

J. Bacteriol. 72, 543 - 547

Henderson, G.B., Zevely, E.M., and Huenneke, F.M. (1979):

Coupling of energy to folate transport in *Lactobacillus casei*

J. Bacteriol. 139, 552 - 559

Herbert, D., Elsworth, R., and Telling, R.C. (1956):

The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study

J. Gen. Microbiol. 14, 601 - 622

Herbert, D. (1958):

Continuous culture of microorganisms: some theoretical aspects

in: Continuous cultivation of microorganisms: a symposium, 1958, pp. 45 - 52, Publishing house of the Czechoslovakia academy of sciences, Prague

Herrero, A.A. (1983):

End-product inhibition in anerobic fermentations

Trends Biotechnol. 1, 49 - 53

Higuchi, M. (1984):

The effect of oxygen on growth and mannitol fermentation of *Streptococcus mutans*

J. Gen. Microbiol., 130, 1819 - 1826

Holzappel, W. and Kandler, O. (1969):

Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck

5 *Lactobacillus coprophilus* subsp. *confusus* nov. subsp. - eine neue Unterart der Untergattung *Betabacterium*

Zbl. Bakt. Abt. II, 123, 7, 657 - 666

Hooke, R. and Jeeves, J.A. (1961):

Direct search solution of numerical and statistical problems

J. Assoc. Comput. Machinery 8, 212 - 229

Hummel, W., Schütte, H., and Kula, M.-R. (1983):

Large scale production of D-lactate dehydrogenase for the stereospecific reduction of pyruvate and phenylpyruvate

Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18, 75 - 85

Hummel, W., Weiss, N., and Kula, M.-R. (1984):

Isolation and characterisation of a bacterium possessing L-phenylalanine dehydrogenase activity

Arch. Microbiol. 137, 47 - 52

Hummel, W., Schütte, H., and Kula, M.-R. (1985):

D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*

Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 7 - 15

Hummel, W., Schütte, H., and Kula, M.-R. (1988):

D-(-)-Mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*

Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 433 - 439

Hummel, W and Kula, M.-R (1989a):
Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds
FEBS Eur. J Biochem. 184, 1 - 13

Hummel, W. und Kula, M.-R. (1989b):
A simple method for small-scale disruption of bacteria and yeasts
J. Microbiol. Meth. 9, 201 - 209

Hustedt, H., Kroner, K.H., Schütte, H., and Kula, M.-R. (1985):
Aufarbeitung intrazellulärer Enzyme mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion
Sonderdruck aus Biotech Forum 1

Hutner, S.H. (1972):
Inorganic nutrition
Ann. Rev. Microbiol. 26, 313 - 343

Ingram, L.O. and Buttke, T M (1984):
Effects of alcohols on microorganisms
Adv. Microbiol. Physiol. 25, 253 - 300

ito, S., Hashiba, H., and Eguchi, Y. (1974):
Adaptive control of the ethanol-forming system in heterolactic acid bacteria - effect of growth conditions on alcohol-dehydrogenase synthesis in *Leuconostoc mesenteroides*
J. Biochem. 75, 577 - 581

Jørgensen, M.H. and Nikolajsen, K. (1987):
Mathematical model for lactic acid formation with *Streptococcus cremoris* from glucose
Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 313 - 316

Johnson, E.C., Gilliland, S.E., Speck, M.L. (1971):
Characterization of growth stimulants in corn steep for lactic streptococci
Appl. Microbiol. 21, 316 - 320

Kandler, O (1982):
Gärungsmechanismen bei Milchsäurebakterien
Forum Mikrobiologie 5, 16 - 22

Kandler, O. und Stetter, K. (1973):
Der Beitrag neuerer biochemischer Merkmale für die Systematik der Laktobazillen
3. Symp. Techn. Mikrobiol. Berlin

Kashket, E R (1985):
The proton motive force in bacteria, an assessment of methods
Ann. Rev. Microbiol. 39, 219 - 242

Kashket, E.R. (1987):

Bioenergetics of lactic acid bacteria, cytoplasmatic pH and osmotolerance
FEMS Microbiol. Rev. 46, 233 - 244

Kattanek, S. (1985):

Experimente in der Verfahrenstechnik

in: Weiss, S. (ed.) Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden, 8, S. 150 - 160; VCH Verlagsgesellschaft; Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel

Kemp, C.W., Robrish, S.A., Curtis, M.A., Sharer, S.A., and Bowen, W.H. (1983):

Application of a competition model of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in binary continuous culture

Appl. Environ. Microbiol. 45, 1277 - 1282

Kilian, S.G., du Preez, J.C., and Gericke, M. (1989):

The effects of ethanol on growth rate and passive proton diffusion in yeasts

Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 90 - 94

Kluyver, A.J. (1935):

Die bakteriellen Zuckervergärungen

Ergeb. Enzymforschung 4, 230 - 273

Konings, W.N. (1985):

Generation of metabolic energy by endproduct efflux

Trends Biochem. 10, 317 - 319

Konings, W.N., Poolman, P., and Driessen, A.J.M. (1989):

Bioenergetics and solute transport in lactococci

CRC Crit. Rev. Microbiol. 16 (6), 419 - 476

Kula, M.-R. (1986):

persönliche Mitteilung

Kula, M.-R. (1985):

Recovery operations

in: Rehm, H.-J. and Reed, G. (eds.), Biotechnology, vol. 2, pp. 725 - 760, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Kula, M.-R. und Wandrey, Ch. (1987):

Continuous enzymatic transformation in an Enzyme-Membrane Reactor with simultaneous NADH regeneration Meth. Enzym. 136, 9 - 21

Lam, J.C. and Ollis, D.F. (1981):

Kinetics of multiproduct fermentations

Biotechnol. Bioeng. 23, 1517 - 1525

Leão, C. and von Uden, N. (1983):

Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of *Saccharomyces cerevisiae*

Biotechnol. Bioeng. 25 (8), 2085 - 2090

Leão, C. and von Uden, N. (1984):

Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*

Biotechnol. Bioeng. 26, 403 - 405

Leão, C. and van Uden, N. (1984):

Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Biochim Biophys. Acta 774, 43 - 48

Ledesma, O.V., de Ruiz Holgado, A.P., and Oliver, G. (1977):

A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli

J. Appl. Bacteriol. 42, 123 - 133

Lerch, H.P., Blocker, H., Kallwass, H., Hoppe, J., Tsai, H., and Collins, J. (1989):

Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*

Gene 78, 47 - 57

Lerch, H.P., Frank, R., Collins, J. (1989):

Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*

Gene 83, 263 - 270

Levenspiel, O. (1980):

The monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations

Biotechnol. Bioeng. 22, 1671 - 1687

Long, D.E. (1969):

Simplex optimization of the response from chemical systems

Anal. Chim. Acta 46, 193 - 206

Luedecking, R. and Piret, E. L. (1959):

A kinetic study of the lactic acid fermentation: Batch process at controlled pH

J. Biochem Microbiol. Technol. Eng. 1, 393 - 431

Luong, J.H.T. (1985):

Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation

Biotechnol. Bioeng. 27, 280 - 285

Major, N.C. and Bull, A.T. (1985):

Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrückii*
Biotechnol. Lett. 7 (6), 401 - 405

Mathieu, D. et Phan-tan-Luu, R. (1976):

Methodologie de la recherche experimentale, Marseille

Merck, E., Darmstadt, Datenblatt in: Mikrobiologisches Handbuch

Michels, P.A.M., Michels, J.P.J., Boonstra, J., and Konings, W.N. (1979):

Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by excretion of metabolic endproducts

FEMS Microbiol. Lett. 5, 357 - 364

Mitchell, P. (1973):

Performance and conservation of osmotic work by proton-coupled solute porter systems

J. Bioeng. 4, 63 - 91 Monod, J. (1942):

Recherches sur la croissance bacterienne

Masson, Paris

Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Skurai, T., and Yura, T. (1981):

Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways

J. Bacteriol. 148, 64 - 71

Nelder, J.A. and Mead, R. (1965):

A simplex method for function minimization

Computer J. 7, 308 - 313

Novack, M., Strehaiano, P., Moreno, M., Goma, G. (1981):

Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol

Biotechnol. Bioeng. 22, 201 - 211

Novick, A. and Szilard, L. (1950):

Description of the chemostat

Science, N.Y., 112, 715 - 716

Obermeier, N. and Poralla, K. (1976):

Some physiological functions of L-leucine dehydrogenase in *Bacillus subtilis*

Arch. Microbiol. 109 (1-2), 59 - 63

Ohleyer, E., Blanch, H.W., and Wilke, Ch., R. (1985):

Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor

Appl. Biochem. Biotechnol. 11, 317 - 332

Otto, R., Lageveen, R.G., Veldkamp, H., Konings, W.N. (1982):
Lactate efflux-induced electrical potential in membrane vesicles of streptococcus cremoris
J. Bacteriol. 149 (2), 733 - 738

Otto, R., ten Brink, B., Veldkamp, H., and Konings, W.N. (1983):
The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of Streptococcus cremoris
FEMS Microbiol Lett. 16, 69 - 74

Orla-Jensen, S. (1919):
The lactic acid bacteria
Andr. Fred. Host & Son (eds.), Copenhagen

Owens, J.D. and Legan, J.D. (1987):
Determination of the monod substrate saturation constant for microbial growth
FEMS Microbiol. Rev. 46, 419 - 432

Pankova, L.M., Shvinka, J.E., and Beker, M.J. (1988):
Regulation of intracellular H⁺-balance during shift from anaerobic to aerobic conditions
Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 (6), 583 - 588

Park, Y.S., Ohtake, H., and Toda, K. (1990):
A kinetic study of acetic acid production by liquid - surface cultures of Acetobacter aceti
Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 259 - 263

Phan tan Luu, R., Bazard, D., Flayeux, R., Lehuede, J.M., Parisot, M., Vinh, T., and Moll, M. (1979):
Application de la méthodologie de la recherche expérimentale. Plans d'expérience factoriels et simplex séquentiels - exemples
Ind. Alim. Agricoles 96, 441 - 451

Pirt, S.J. (1965):
The maintenance energy of bacteria in growing cultures
Proc. Roy. Soc. B., 163, 224 - 231

Pirt, S.J. (1975):
Principles of microbe and cell cultivation,
Blackwell Scientific Publ., Oxford

Plackett, R.L. and Burmann, J.P. (1946):
The design of optimum multifactorial experiments
Biometrika 33, 305 - 325

Poralla, K. (1971):
Induction of a dehydrogenase activity for branched-chain amino acids in Bacillus subtilis
Arch. Microbiol. 77, 339 - 343

- Rainbow, C. (1975):
Beer spoilage lactic acid bacteria
in: Carr, J.G., Cutting, C.V., Whiting, G.C. (eds.), Lactic acid bacteria in beverages and food,
pp. 149 - 158, Academic Press, London, New York, San Francisco
- Reuter, G. (1975):
Classification problems, ecology and some biochemical activities of Lactobacilli of meat
products, pp. 221 - 229
in: Carr, J.G., Cutting, C.V., Whiting, G.C. (eds.), Lactic acid bacteria in beverages and food,
Academic Press, London, New York, San Francisco
- Rhee, S.K. and Pack, M.Y. (1980):
Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*
J. Bacteriol. 144, 1, 217 - 221
- Robrish, S.A. and Thompson, J. (1989):
Na⁺-requirement for glutamate dependent sugar transport by *Fusobacterium nucleatum* ATCC
10953
Curr. Microbiol. 19, 329 - 334
- Rogers, P.L., Bramall, L., and McDonald, I.J. (1978):
Kinetic analysis of batch and continuous culture of *Streptococcus cremoris* HP
Can. J. Microbiol. 24, 372 - 380
- Rogosa, M., Franklin, J.G., and Perry, K.D. (1961):
Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of
Lactobacillus spp.
J. Gen. Microbiol., 25, 473 - 482
- Rosenbrock, H.H. and Storey, C. (1970):
An automatic method for finding the greatest or least value of a function
The Computer Journal, 3, 175
- Scheirlinck, T., de Meutter, J., Arnaut, G., Joos, H., Clayssens, M., and Michiels, F. (1990):
Cloning and expression of cellulase and xylanase genes in *Lactobacillus plantarum*
Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 534 - 541
- Schellenberger, A. und Selke, R. (1959):
Über die Decarboxylierung von α -Ketosäuren bei Gegenwart von Metallsalzen
J. prakt. Chem. 8 (4), 379 - 386
- Schepers, H.J. (1985):
Untersuchungen zur Ethanol-Bildung aus Xylose durch *Bacillus marcerans*
Dissertation, Universität Düsseldorf
- Schlegel, H.G. (1985):
Allgemeine Mikrobiologie, 6. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Schwall, H. (1981):

Milchsäure

in: Bartholomé, E., Biekert, E., Hellmann, H. (Hrg.), Ullmann Enzyklopädie der technischen Chemie, Band 17, 4. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Basel

Schweiger, G., Dutscho, R. and Buckel, W. (1987):

Purification of 2-hydroxy-glutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. An iron-sulfur protein

Eur. J. Biochem. 169, 441 - 448

Schütte, H., Hummel, W. and Kula, M.-R. (1984):

L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase - A new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids

Appl. Microbiol. Biotechnol. 19, 167 - 176

Schütte, H., Hummel, W. and Kula, M.-R. (1985):

Improved enzyme screening by automated fast protein liquid chromatography

Analyt. Biochem. 151, 547 - 553

Schütte, H., Hummel, W., Tsai, H., and Kula, M.-R. (1985):

L-Leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus*: production, large scale purification and protein characterization

Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 306 - 317

Shane, B. and Stokstad, E.L. (1975):

Transport and metabolism of folates by bacteria

J. Biol. Chem. 250 (6), 2243 - 2253

Shane, B. and Stokstad, E.L. (1976):

Transport and metabolism of methyltetrahydrofolates by *Lactobacillus casei*

J. Biochem. 251 (11), 3405 - 3410

Shane, B. and Stokstad, E.L. (1977a):

Metabolism of methyltetrahydrofolate by *Lactobacillus casei*

J. Gen. Microbiol. 103, 249 - 259

Shane, B. and Stokstad, E.L. (1977b):

Rate limiting steps in folate metabolism by *Lactobacillus casei*

J. Gen. Microbiol. 103, 261 - 270

Sharpe, M.E. (1981):

The genus *Lactobacillus*

in: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H., Balous, A., and Schlegel, H.G. (eds.), The prokaryotes, vol. 2, p. 1654 - 1679, Springer Verlag KG, Berlin

Sharpe, M.E., Garvie, E.T., and Tilbury, R.H. (1972):

Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*

Appl. Microbiol. 23, 389 - 397

Simon, H., Bader, J., Rarnbeck, B., Krezdorn, E. und Tischer, W. (1979):

Stereospezifische Hydrierung mit Mikroorganismen und immobilisierten Enzymsystemen

In: Dellweg, H.W. (Hrsg.), 4.Symposium technische Mikrobiologie, Berlin

Smith, P.K., Krohn, R.F., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D.,

Fujimoto, E.K., Goecke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985):

Measurement of protein using bicinchoninic acid

Anal. Biochem. 150, 76 - 85

Soska, J. (1966):

Growth of *Lactobacillus acidophilus* in the absence of folic acid

J. Bacteriol. 91, 1840 - 1847

Spendley, W., Hext, G.R., and Himsworth, F.R. (1962):

Sequential application of simplex designs in optimization and evolutionary operation

Technometrics 4, 441 - 461

Stetter, K.O. and Kandler, O. (1973):

Formation of DL-lactic acid by lactobacilli and characterization of a lactic acid racemase from several streptobacteria

Arch. Microbiol. 94, 221 - 247

Stouthamer, A.H. (1965):

Determination and significance of molar growth yields

Meth. Microbiol. 629 - 663

Strobel, H.J., Russel, J.B., Driessen, A.J.M., and Konings, W.N. (1989):

Transport of amino acids in *Lactobacillus casei* by proton motive force dependent and non proton motive force dependent mechanisms

J. Bacteriol. 171 (1), 280 - 284

Sussman, D.J., Milman, G., Osborne, C. Shane, B. (1986):

In situ autoradiographic detection of polyglutamate synthase activity

Analyt. Biochem. 158 (2), 371 - 376

TenBrink, B. and Konings, W.N. (1982):

Electrochemical proton gradient and lactate concentration gradient in *Streptococcus cremoris* cells grown in batch culture

J. Bacteriol. 152, 2, 682 - 686

TenBrink, B., Roel, O., Hansen, U.-P., and Konings, W.N. (1985):

Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*

J. Bacteriol. 162, 1, 383 - 390

Tempest, D.W. and Herbert, D. (1965):

Effect of dilution rate and growth limiting substrate on the metabolic activity of *Torula utilis* cultures

J. Gen. Microbiol. 41, 143 - 150

Tempest, D.W., Herbert, D., and Phipps, P.J. (1967):

Growth of *Aerobacter aerogenes* at low dilution rates

in: Microbial physiology and continuous culture, Powell, E.O., Evans, C.G.T., Strange, R.E., and Tempest, D.W. (eds.), pp. 240 - 261, HMSO London

Tempest, D.W. (1970):

The continuous cultivation of microorganisms 1. Theory of the Chemostat

in: Norris, H.R. and Ribbons, P.N., Methods in Microbiology, Vol. 2, pp. 260 - 275, Academic Press, London, NY

Terraciano, J.S. and Kashket, E.R. (1986):

Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*

Appl. Environ. Microbiol. 52, 86 - 91

Tichy, S., Vasic-Racki, D.J., Schütte, H., Talsky, G., and Wandrey, C. (1987):

Modelling of a multi-enzyme system

Chem. Biochem. Eng. Q1, 25 - 30

Tilbury, R.H. (1975):

Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry

in: Carr, J.G., Cutting, C.V., Whiting, G.C. (eds.), Lactic acid bacteria in beverages and food, pp. 177 - 191, Academic Press, London, New York, San Francisco

Thomas, T.D., Ellwood, D.C., and Loney, M.C. (1979):

Change from homo to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from limitation in anaerobic chemostat cultures

J. Bacteriol. 138, 109 - 117

von Eysmond, J. (1990):

Einsatz der Elektrodialyse bei der anaeroben Essigsäureproduktion

Dissertation, Universität Bonn

von Eysmond, J., Vasic-Racki, D.J., and Wandrey, Ch. (1990):

Acetic acid production by *Acetogenium kivui* in continuous culture - kinetic studies and computer simulations

Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 344 - 349

Wandrey, C , Filiotakis, E , Wichmann, U , and Kula, M.-R. (1984):
L-amino acids from a racemic mixture of α -hydroxy acids
Enzyme engineering 7, (Laskin, A , Tsao, G.T., and Wingard, L.B. eds.)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 434, 91 - 94

Wichmann, R , Wandrey, C., Bückmann, F., and Kula, M.-R. (1981):
Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous
NADH(H) regeneration
Biotechnol. Bioeng. 23, 2789 - 2802

Wichmann, R , Wandrey, C., Leuchtenberger, W., Kula, M.-R. und Bückmann, F. (1982):
Verfahren zur Herstellung von optisch reinen α -Hydroxycarbonsäuren
Deutsche Offenlegungsschrift DOS 293008.76, US Patent 4 326 031 vom 20.4.1982

Wichmann, R. and Wandrey, C. (1984):
Enzymatic production of optically active 2-hydroxy acids
Enzyme engineering 7, (Laskin, A , Tsao, G.T., and Wingard, L.B. eds.)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 434, 89 - 90

Van den Heuvel, J.C. and Beeftink, H.H. (1988):
Kinetic effects of simultaneous inhibition by substrate and product
Biotech. Bioeng. 31, 718 - 724

Vick Roy, T.B. , Mandel, D.K. , Dea, D.K. , Planch, H.W., and Wilke, C.R. (1983):
The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production
Biotechnol. Lett. 5 (10), 665 - 670

Wiegel, J and Schlegel, H.G. (1977):
Leucine biosynthesis: Effect of branched chain amino acids and threonine on
 α -isopropylmalate synthase activity from aerobic and anaerobic microorganisms
Biochem Syst Ecol. 5, 169 - 176

Winter, J. (1974):
Der Einfluß von organischen Säuren und von Sauerstoff auf die Gär- und Energiebilanz von
Leuconostoc und verschiedenen Arten von Lactobacillen
Dissertation, Universität München

Wohlfarth, G. and Buckel, W. (1985):
A sodium ion gradient as energy source for Peptostreptococcus asaccharolyticus
Arch. Microbiol. 142, 128 - 135

Yamazaki, Y. and Maeda, H. (1986):
Enzymatic synthesis of optically pure (R)-(-)-mandelic acid and other 2-hydroxylic acids:
screening for the enzyme and its purification and use
Agric. Biol. Chem. 50 (10), 2621 - 2631

Yarbro, L.A. and Deming, St. N. (1974):

Selection and preprocessing of factors for simplex optimization

Anal. Chim. Acta 73 (2), 391 - 398

Yu, P.-L., Hodge, R.A., and Li, X.-P. (1990):

In vitro expression of Lac-PTS and tagatose 1,6-bisphosphate aldolase genes from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* plasmid pDI-21

Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 677 - 679

Zeng, A.-P. and Deckwer, W.-D. (1991):

A model for multiproduct inhibited growth of *Enterobacter aerogenes* in 2,3-butanediol fermentation

Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 1 - 3

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt.

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und die freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ch. Wandrey danke ich für die Bereitstellung des Meßwert-erfassungssystems MEAS.

Mein Dank gilt auch Frä. S. Löslein für die freundliche Durchführung der Aminosäureanalysen, Herrn R. Goldbaum für die Unterstützung bei HPLC-Analysen und Herrn U. Garske für die Unterstützung bei der Erstellung von Graphiken mit Plotit.

Bei A. Rooney, M. Zaffar und H. Schulz möchte ich mich für die im Rahmen ihrer Semester- und praktischen Arbeiten durchgeführten Untersuchungen, die wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts, besonders Herrn Dr. M. Kittelmann und Frau Dr. G. Miczka, danke ich für viele Anregungen und Diskussionen und den Mitarbeitern des Labores 2215 für die nette Arbeitsatmosphäre.

Frau Dr. C. Cordes und Frau Dr. G. Bierbaum danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes herzlich.

Jül-2549
November 1991
ISSN 0366-0885