

**Kultivierungen mit einem Hochleistungsstamm von
Acremonium chrysogenum
in komplexen und synthetischen Medien**

- Strategien zur Produktivitätssteigerung unter Berücksichtigung der Enzymaktivitäten der Cephalosporin C-Biosynthese -

- Guido Seidel -

**Kultivierungen mit einem Hochleistungsstamm von
Acremonium chrysogenum in komplexen und synthetischen Medien
- Strategien zur Produktivitätssteigerung unter Berücksichtigung der
Enzymaktivitäten der Cephalosporin C-Biosynthese -**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Chem. Guido Seidel

geboren am 02. 07. 1969 in Langenhagen

Hannover 1999

Referent : **Prof. em. Dr. Dr. h. c. K. Schügerl**

Korreferent : **Prof. Dr. T. H. Scheper**

Tag der Prüfung : **10.02.1999**

Meinen Eltern

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover von August 1996 bis Dezember 1998 durchgeführt und wie zu Beginn einer jeden wissenschaftlichen Arbeit sollen zunächst einige Worte des Dankes gesagt werden, an die Menschen, die zum guten Gelingen dieses nicht immer einfachen Unterfangens beigetragen haben. Vielen Menschen begegnet man auf dem Weg zum Erlangen eines akademischen Titels und einige werden mit Sicherheit ein ganzes Leben lang in Erinnerung bleiben. Für die Leitung der Arbeit, der steten Hilfsbereitschaft und der freundlichen Betreuung - trotz zunehmender Abwesenheit durch seine wohlverdiente Emeritierung - sowie der mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten danke ich **Herrn Prof. em. Dr. Dr. h. c. K. Schügerl**. Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. T. H. Scheper** bedanken, der trotz zunehmenden Stresses als Nachfolger im Amt des Institutsleiters niemals nein sagen kann. Die Bereitstellung des Hochleistungsstammes A3/2, einiger Medienbestandteile und der HPLC-Standards sorgte für einen reibungslosen Ablauf, hierfür bedanke ich mich bei **Hoechst AG/Frankfurt - Main**, die auch den Großteil der finanziellen Unterstützung dieser Arbeit übernahm. Allen Mitgliedern und Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie danke ich für die freundliche Zusammenarbeit - wo hat man das schon - und für die Unterstützung bei jeglicher Art von Problemen. Ein besonderer Dank gilt Frau Martina Weiß, die als gute Seele immer ansprechbar ist und mit immerwährender Hilfsbereitschaft zur Seite steht. Ebenso findet man in den Werkstätten des Instituts zwar nicht immer gutgelaunte, dafür jedoch äußerst kompetente Mitarbeiter, die jeder Problemstellung mit einer technischen und meistens sogar auch durchführbaren Lösung gegenüberstehen. Weiterhin möchte ich mich bei Yasmin Fahimi und Michael Jürgens für ihre engagierte Mitarbeit während ihrer Diplomarbeiten sowie bei Herrn Dr. Jong-Il Rhee für seine freundschaftliche Unterstützung bedanken. Einige entscheidende Wege in dieser Arbeit wurden dadurch in die richtige Richtung gelenkt. Normalerweise steht am Ende dieser Seite immer eine Auflistung von Personen - meistens Freunde und Freundinnen -, die einem wichtig genug erscheinen, aufgeführt zu werden. Aber wenn man ehrlich ist, dann reicht der Platz einer Seite nicht aus, um allen zu danken, die wichtig sind. Für mich persönlich ist es sehr schwierig, Personen zu nennen, da sich im Laufe dieser Doktorarbeit sehr viel verändert hat. Geliebte Menschen kommen und gehen, deswegen lohnt es sich im Moment nur nach vorne zu gucken, denn niemand weiß was einem die Zukunft bringt. Freundschaft ist wichtiger als jeder Titel und ich hoffe jeder meiner Freunde fühlt sich angesprochen.

DANKE !!!

**Kultivierungen mit einem Hochleistungsstamm
von *Acremonium chrysogenum* in komplexen und synthetischen Medien
- Strategien zur Produktivitätssteigerung unter Berücksichtigung der Enzymaktivitäten
der Cephalosporin C-Biosynthese -**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kultivierungen im 30L-Rührkesselreaktor mit dem Hochleistungsstamm A3/2(C2) von *Acremonium chrysogenum* in komplexen und synthetischen Medien durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten über extra- und intrazelluläre Größen sollten sowohl Schlußfolgerungen über Engpässe in der Biosynthese des Antibiotikums Cephalosporin C gemacht werden als auch die Möglichkeit einer Produktivitätssteigerung durch Medienkomposition nachdrücklich untersucht werden.

Da der Wachstums- und Produktionsprozeß des Pilzes in komplexen Medien durch sein diauxisches Verhalten beschrieben werden kann, wurden Glucosezufütterungsexperimente durchgeführt, die den Produktionsprozeß bei gleicher Ausbeute beschleunigten. Der ebenfalls prognostizierte hohe Bedarf an anabolisch wertvollen Aminosäuren, wurde durch den variablen Zusatz von L-Alanin, L-Valin und L-Serin untersucht. Die Ergebnisse belegen eine deutliche Ausbeutesteigerung bezüglich des Hauptproduktes Cephalosporin C und eine Senkung der Konzentration der Nebenprodukte. Die Messung der Enzymaktivitäten, der in der Biosynthese beteiligten Enzyme, weisen die δ -(L- α -Amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valin-Synthetase-Aktivität als primären, die Expandase/Hydroxylase-Aktivität als sekundären Engpaß aus.

Die Entwicklung eines synthetischen Mediums und dessen Einsatz ermöglicht Einblicke in die Anpassungsfähigkeit des verwendeten Stammes. Bei vergleichbaren Wachstums- und Produktionsverhalten ist die Anwendung neuer Analysemethoden, wie der 2D-Fluoreszenzspektrometrie möglich. Der Vergleich der gewonnenen Daten und zahlreiche mathematische Ansätze machten die Entwicklung eines einfachen kinetischen Modells möglich, mit dessen Hilfe einige kinetische Konstanten identifiziert werden konnten. Simulationen mit der gelösten Sauerstoffkonzentration zeigen die Wichtigkeit des pO_2 -Wertes für den Produktionsprozeß und erklären das Auftreten hoher Penicillin N- und Deacetoxycephalosporin C- Konzentrationen im komplexen Medium.

Schlagworte : Fermentation, Cephalosporin C, Enzymaktivitäten

Guido Seidel

Abstract

**Cultivations with a high-producing strain of
Acronium chrysogenum in complex and synthetic media
- Strategies for increasing the productivity in consideration of the enzyme activities in
the cephalosporin C biosynthesis -**

As the main aspect of this work cultivations with a high-producing strain of *Acronium chrysogenum* A3/2(C2) were carried out in a 30 litre stirred bioreactor in complex and synthetic media. The aim was, by using the measured concentrations of extra- and intracellular metabolites, to make conclusions and to identify the bottleneck of the cephalosporin-biosynthesis. In addition the productivity should be increased by media composition, which is known as “metabolite engineering”

The growth and production process of the fungi could be described with a diauxic model and in fact of this some glucose feeding experiments were done. The analysis shows a increased speed of the production process by same yield. Besides the observation during the addition of essential amino acids (L-valine, L-serine and L-alanine) is described and shows an increased productivity and yield relative to the main product cephalosporin C and a decrease in the concentration of the by-products.

The measurements of the activities of the important enzymes in the biosynthesis are showing that the δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine-synthetase-activity is the first and the expandase/hydroxylase-activity is the second bottleneck in the antibiotic synthesis.

The development and the inset of a synthetic medium gave interesting insights in the adaptation possibility of the used strain. By comparable growth and production it was possible to use new innovative methods, like the two-dimensional fluorescence spectrometry. The comparison of the measured data could be used for the development of a simple kinetic model, which identifies some kinetic constants. Simulations with the dissolved oxygen concentration were carried out and were showing the importance of the pO₂-value for the biosynthesis.

Keywords : cultivations, cephalosporin C, enzyme activities

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil.....	3
2.1 Cephalosporin C - Vorstufe für halbsynthetische Antibiotika.....	3
2.2 Die Biosynthese des Cephalosporin C	5
2.2.1 Übersicht.....	5
2.2.2 Die Bedeutung von Aminosäuren für die Biosynthese des Cephalosporin C.....	7
2.2.3 Die katalysierenden Enzyme in der Biosynthese des Cephalosporin C....	11
2.3 Kultivierungsmedien für die Cephalosporin C-Produktion	14
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Kultivierungsbedingungen im synthetischen und komplexen Medium.....	17
3.2 1.Vorstufe (Schüttelkulturen)	17
3.3 2.Vorstufe (Nur für Komplexmedium)	18
3.4 Hauptkultur (Biostat UD) und Prozeßsteuerung.....	19
3.5 Kulturfluoreszenz und 2-Dimensionale Fluoreszenzspektrometrie	22
3.6 Probenahme.....	23
3.6.1 Diskontinuierliche Probenahme (off-line)	23
3.6.2 Kontinuierliche Probenahme (on-line)	24
3.7 Analytik.....	25
3.7.1 Extrazelluläre Untersuchungen.....	27
3.7.1.1 Biomassebestimmung.....	27
3.7.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford /1976/	27
3.7.1.3 DNA-Bestimmung nach Dische.....	28
3.7.1.4 Morphologische Betrachtungen	29
3.7.1.5 pH-Wert.....	29
3.7.1.6 Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes	29
3.7.1.7 Phosphatbestimmung (Merck Spectroquant).....	30
3.7.1.8 Ammoniumbestimmung nach DIN 38 406.....	30
3.7.1.9 Produkt- und Precursoranalytik.....	31
3.7.1.10 Aminosäure- und ACV-Analytik	31
3.7.1.11 Organische Säuren	35
3.7.1.12 Bestimmung des Gelöstkohlenstoffgehaltes (DOC)	35

3.7.2 Intrazelluläre Analytik.....	37
3.7.2.1 Zellaufschluß	37
3.7.2.2 RNA-Bestimmung nach Küenzi	38
3.7.2.3 Probenvorbereitung für die HPLC.....	39
3.7.2.4 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen.....	39
3.7.2.4.1 Proteaseinhibitoren	40
3.7.2.4.2 ACV-Synthetase (ACVS)	41
3.7.4.2.3 Isopenicillin N-Synthetase (IPNS).....	43
3.7.4.2.4 Deacetoxycephalosporin C-Synthase(Expandase)/ -Hydroxylase.....	45
3.7.4.2.5 Deacetylcephalosporin C- Acetyltransferase(Acetyltransferase).....	47
4. Ergebnisteil.....	48
4.1 Kultivierungen in komplexen Medien	48
4.1.1 Charakteristischer Kultivierungsverlauf – Wachstumsparameter	49
4.1.2 Betrachtung der extrazellulären Aminosäuren	53
4.1.3 Betrachtung der extrazellulären organischen Säuren.....	56
4.1.4 Betrachtung der intrazellulären Aminosäuren	58
4.1.5 Enzymaktivitäten	60
4.1.6 Cephalosporin C-Produktion in komplexen Medien.....	63
4.1.7 Vergleich der durchgeführten Kultivierungen in komplexen Medien	66
4.1.8 Vereinfachte Kohlenstoffbilanz im komplexen Medium	72
4.1.9 Modellierung der Cephalosporin C-Biosynthese in komplexen Medien..	75
4.2 Kultivierungen in synthetischen Medien	85
4.2.1 Entwicklung, Probleme und erste Anwendungen.....	85
4.2.2 Wachstum im 30L-Reaktor.....	88
4.2.3 Betrachtung der extrazellulären Aminosäuren	93
4.2.4 Verlauf der Produktbildung und Enzymaktivitäten	95
4.3 Messung der Kulturfluoreszenz - Einsatz der 2-D-Fluoreszenzspektrometrie....	98
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	105
5.1 Zusammenfassung.....	105
5.2 Ausblick	107

6. Literaturverzeichnis	110
7. Anhang.....	122
7.1 Zusammensetzung der Agarschrägen	122
7.2 Schüttelkulturen für komplexe und synthetische Medien.....	122
7.3 Zweite Vorkultur für komplexe Medien (Biostat V).....	123
7.4 Hauptkulturmedien der für die Arbeit verwendeten Kultivierungen (BIOSTAT UD 30L)	124
7.5 Bradford-Reagenz für die Proteinbestimmung	125
7.6 pHBAH-Reagenz für die Glucosebestimmung.....	125
7.7 Reagenzlösungen für die Ammoniumbestimmung nach DIN 38 406	125
7.8 Eluentenzusammensetzung für die Produkt HPLC	126
7.9 Zusammensetzung von Maisquellwasser (Corn-Steep-Liquor).....	126
7.10 Fettsäuremuster von Sojaöl.....	127
7.11 Formeln für die Berechnung von CPR, OTR und RQ	127
7.12 Zusammensetzung der Wasch- und Aufschlußpuffer.....	127
8. Abkürzungsverzeichnis	128

1. Einleitung

Herausragende wissenschaftliche Entdeckungen sind oft eine Mischung aus Visionen, Glück und Fehlern. Die Entdeckung des Penicillins kann dafür als gutes Beispiel herangezogen werden. Moderne β -Lactam Antibiotika haben eine lange Geschichte als chemotherapeutische Medikamente und auch heute noch stellen sie mehr als 50% aller weltweit verschriebenen Antibiotika dar. Sie greifen in die Zellwandbiosynthese der Bakterien ein und zeichnen sich durch die hervorragenden Eigenschaften von geringer Giftigkeit und breitem Wirkungsspektrum aus. Der weitverbreitete Einsatz von Substanzen wie Penicillin und Ampicillin ist einerseits auf ihre Wirkung gegen lebensbedrohliche Krankheiten andererseits auf das sehr gute Preis-Leistungsverhältnis dieser Antibiotika zurückzuführen. Die geringen Kosten für diese Antibiotika sind ein direktes Ergebnis der kolossalen Steigerung in Ausbeute und Produktivität bei Fermentationen in den letzten Jahrzehnten. Es ist kaum möglich, alle Verbesserungen zu dokumentieren und sich gleichzeitig mit der modernen genetischen, als auch der klassischen Methode der Stammverbesserung durch wiederholte Mutation und Selektion nach bestimmten Merkmalen wie Produktion und Wachstum in Schüttelkulturen auseinanderzusetzen. Die Änderung des Genoms erfolgt also nach der klassischen Methode rein zufällig und die Eigenschaften der Mutanten sind nicht immer vorauszusehen. Mit den neueren genetischen Methoden ist es dagegen möglich, gezielte Veränderungen am Genom vorzunehmen und damit bekannte Engpässe der Produktbiosynthese zu erweitern. Dies wird heutzutage als „metabolic engineering“ bezeichnet /Bailey 1991/.

Neben dem von Alexander Fleming im Jahr 1928 entdeckten Penicillin, spielt die Substanzklasse der Cephalosporine von jeher eine wesentliche Rolle in der modernen Antibiotikatherapie. Sie zeichnen sich durch ein noch breiteres Wirkungsspektrum und einem geringeren allergenen Potential aus. Basis für die Herstellung von halbsynthetischen Antibiotika ist auch heute noch das von *Acremonium chrysogenum* im Sekundärstoffwechsel produzierte Cephalosporin C.

Wie bei fast allen Antibiotika-Produzenten sind auch die natürlichen Wildstämme von *Acremonium chrysogenum* für die industrielle Produktion von Antibiotika nicht ausreichend geeignet. Zum einen ist ihre Produktivität nicht besonders groß, zum anderen können regulatorische Effekte des Substrats oder des Produkts selbst zu negativen Nebeneffekten der Produktion führen.

Daher verwendet man sogenannte Hochleistungsstämmen, die durch Mutation und "Screening" in ihrer Produktivität verbessert worden sind. Forschungsergebnisse mit verschiedenen Stämmen sind damit aber auch nur bedingt vergleichbar. Die komplizierten Stoffwechselfvorgänge und die ausgeprägten Fähigkeiten der Pilze sich sehr differenziert an ihre Umgebung anzupassen, können zu unterschiedlichen morphologischen Entwicklungen und Vererbungen verschiedener genetischer Informationen führen. Eine erfolgreiche Stammverbesserung aber setzt detaillierte Kenntnisse über den verwendeten Organismus, insbesondere über Produktion und Wachstum, voraus. In der Literatur finden sich zwar hinsichtlich der Antibiotikaproduktion mit *Acremonium chrysogenum* zahlreiche Veröffentlichungen, doch diese beziehen sich zumeist auf niedrig produzierende Stämme und sind somit schwer auf den in dieser Arbeit kultivierten Stamm zu übertragen.

Essentielle Stoffwechselwege des Pilzes bilden wie in jedem Organismus den Schlüssel zum Verstehen des **WIE** und **WARUM** bestimmte chemische Substanzen von Mikroorganismen produziert werden. Substrate werden aufgenommen, durch anabole Reaktionen umgewandelt und in Zellbestandteile transformiert. Gleichzeitig wird die Energie der Substrate durch katabole Reaktionen freigesetzt. *Acremonium chrysogenum* hat sich in den letzten Jahrzehnten zu dem wichtigsten Cephalosporin C-Produzenten entwickelt und somit lag es nahe, den Primär- und Sekundärmetabolismus genauer zu erforschen, um neben einer industriell wichtigen Produktivitätssteigerung Aufschluß über die zentralen Stoffwechselwege des Pilzes zu erhalten. Heutzutage ist nahezu das gesamte Stoffwechselverhalten des Pilzes aufgeklärt, aber dennoch finden sich immer wieder neue Ansätze für eine Stammverbesserung.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der mehr traditionellen Methode der Optimierung des Fermentationsprozesses unter Verwendung neuer Erkenntnisse über Stoffwechselwege und Engpässe in der Biosynthese des Cephalosporin C. Es wird sowohl der Einfluß von Aminosäurezusätzen zum Kulturmedium untersucht, als auch die Biosynthese des Cephalosporin C in Hinblick auf Engpässe charakterisiert. Zu diesem Zweck wird ein „High performance bioreactor“, wie von Sonnleitner *et al.* /1988/ vorgeschlagen und beschrieben, verwendet. Das Verhalten des Organismus kann demzufolge als Reaktion auf die gewählten Parameter gedeutet werden und wird nicht von eventuellen Fehlern des Systems beeinflusst.

2. Theoretischer Teil

2.1 Cephalosporin C - Vorstufe für halbsynthetische Antibiotika

1945 entdeckte Giuseppe Brotzu in einem von ihm isolierten Schimmelpilz (*Cephalosporium acremonium brotzu*) ein Antibiotikagemisch, welches gegen *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhi* wirksam war /Brotzu *et al.*, 1948/. In weiten Kreisen wird diese Entdeckung als Beginn der Forschung über Cephalosporine angesehen. Cephalosporin C wurde erstmals 1955 von Newton und Abraham als Verunreinigung eines Penicillin N-Gemisches isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe spektroskopischer Methoden und Abbaureaktionen sechs Jahre später und wurde durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt /Gräfe, 1992/.

Waksman *et al.* /1949/ definierte Antibiotika als niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen mit einer Molmasse kleiner 2000 Dalton, die in Konzentrationen kleiner als 200µg/ml das Wachstum anderer Mikroorganismen inhibieren, jedoch auf den Produzenten selbst nicht wirken. Heutzutage reicht die klassische Definition nach Waksman nicht mehr aus, da Erkenntnisse über Wirkmechanismen, Anwendungen und Herkunft von Antibiotika eine ausführlichere Definition notwendig machen. Bei der aktuellen Definition von Antibiotika wird nach der Herkunft, der biologischen Wirkung, dem Wirkmechanismus, dem Biosyntheseweg und der chemischen Struktur unterschieden /Gräfe, 1992/.

Antibiotika sind Produkte des sogenannten Sekundärstoffwechsels. Der Begriff stammt aus der Pflanzenphysiologie und bezeichnet Stoffwechselvorgänge, die für die vegetative Entwicklung des Produzenten keine definierte Rolle spielen. Sekundärmetabolite werden nur von einer kleinen, systematisch definierten Gruppe von Organismen (z.B. Mikroben) gebildet und weisen eine große Variabilität der chemischen Struktur auf.

Der Sekundärstoffwechsel selbst unterliegt neben vielen anabolen und katabolen physiologischen Regulierungsmechanismen (z.B. Substratüberschuß etc.) vor allem einer genetischen Regulation. Hier befindet sich auch der Hauptangriffspunkt für die Klonierung aktiverer Produktionsstämme, bei denen gezielt Gene exprimiert bzw. reprimiert werden.

Die Frage nach dem Zweck des Sekundärstoffwechsels für den Organismus kann bis heute nicht eindeutig beantwortet werden. Als sicher gilt jedoch, daß es sich nicht nur um "Abfall" für die Produzenten handelt, sondern den Sekundärmetaboliten eine - wenn auch sehr unterschiedliche - Aufgabe zukommt.

Die Bildung geschieht meistens aufgrund von Nährstoffungleichgewichten oder als Reservoir für später verstoffwechselbare Reservestoffe /Gräfe, 1992/. Für eine Funktion der Antibiotikabildung im Produzenten selbst spricht u.a., daß neben den Syntheseketten auch Selbstschutzmechanismen vorhanden sind, die die Zelle vor einem "Selbstmord" durch ein eigenes Produkt, durch enzymatische Modifikation oder aktiven Transport aus der Zelle bewahren. Für Mikroorganismen besteht häufig eine inverse Korrelation zwischen Wachstum und Antibiotikabildung, während morphologische Differenzierungen parallel verlaufen. Maximale Bildung des Antibiotikums wird zumeist dann beobachtet, wenn wachstumsfördernde Substrate im Medium aufgebraucht sind. Auch bei *Acremonium chrysogenum* sind Zusammenhänge zwischen Wachstum, Zelldifferenzierung und der Produktion von Cephalosporin C festgestellt worden /Witt, 1993/.

Eine der wichtigsten Antibiotikagruppe sind die β -Lactame, wie Penicilline oder Cephalosporine. Keine andere Naturstoffklasse hat wohl eine so umfangreiche halbsynthetische Modifikation erfahren wie die β -Lactam-Antibiotika /Queener *et al.*, 1979/. Den Vorteilen der ursprünglich entdeckten Penicilline G und V und Cephalosporine, wie sehr geringe Toxizität und hohe bakterizide Wirkung, standen gravierende Nachteile, wie die geringe Breite des Wirkungsspektrums, ungenügende pharmakokinetische Eigenschaften sowie rasche Resistenzbildung gegenüber. Diese Resistenzbildung ist auch heute noch der Hauptstimulus für die ständige Entwicklung neuer β -Lactam Präparate. Hierbei spielen Cephalosporine eine immer wichtigere Rolle, da sie bessere Möglichkeiten für strukturelle Modifikationen bieten. Substituenten können sowohl in der 3- als auch in der 7 β -Position variiert werden. Dadurch können möglicherweise zahlreiche Resistenzmechanismen in Bakterien umgangen werden. Die industrielle Herstellung der Cephalosporine erfolgt durch chemische Modifikation von 7-Aminocephalosporansäure sowie durch Ringerweiterung ausgehend von Penicillin G und V. Da es noch nicht wirtschaftlich genug ist, die 7-Aminocephalosporansäure vollsynthetisch darzustellen, besitzt die halbsynthetische Darstellung aus Cephalosporin C eine hohe industrielle Aufmerksamkeit. Cephalosporin C ist ein hauptsächlich in *Acremonium chrysogenum* (früher *Cephalosporium acremonium*; Klasse der *Hyphomyceten*, *Deuteromycotina* oder *Fungi imperfecti* /Onions *et al.*/) produzierter Sekundärmetabolit, welcher selbst nur eine schwache antibakterielle Wirkung besitzt und dessen Wirkmechanismus als eine Interaktion bei der Zellwandsynthese des Bakteriums (Hemmung der Transpeptidase) beschrieben werden kann /Yokum *et al.*, 1980/.

Die initiale Bildung aus einer Tripeptidvorstufe ordnet Cephalosporin C in die Klasse der Peptidwirkstoffe ein. Strukturell gesehen gehört Cephalosporin C in die Klasse der einfachen zyklischen Peptide und Aminosäurederivate.

2.2 Die Biosynthese des Cephalosporin C

2.2.1 Übersicht

Die Biosynthese der Cephalosporine und Penicilline sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Mikroorganismen, gilt heute als aufgeklärt. Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, beginnt die Biosynthese des Cephalosporin C mit der Verkopplung von L- α -Aminoadipinsäure mit L-Cystein und der darauffolgenden Anknüpfung von L-Valin. Das so resultierende Tripeptid δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valin ("ACV") bildet das Grundgerüst aller natürlich vorkommenden Penicilline und Cephalosporine. Im Falle des Cephalosporin C folgen danach fünf weitere enzymatisch katalysierte Reaktionen. Im folgenden soll einerseits auf den Aminosäurestoffwechsel, den daraus resultierenden Precursor-Aminosäuren, und andererseits auf die, an den biosynthetisch relevanten Reaktionen, beteiligten Enzyme näher eingegangen werden.

An der Biosynthese beteiligte Enzyme :

- 1** ACV-Synthetase
- 2** Isopenicillin N-Synthetase
- 3** Isopenicillin N-Epimerase
- 4** Deacetoxycephalosporin C-Synthase (Expandase)
- 5** Deacetoxycephalosporin C-Hydroxylase
- 6** Deacetylcephalosporin C-Acetyltransferase

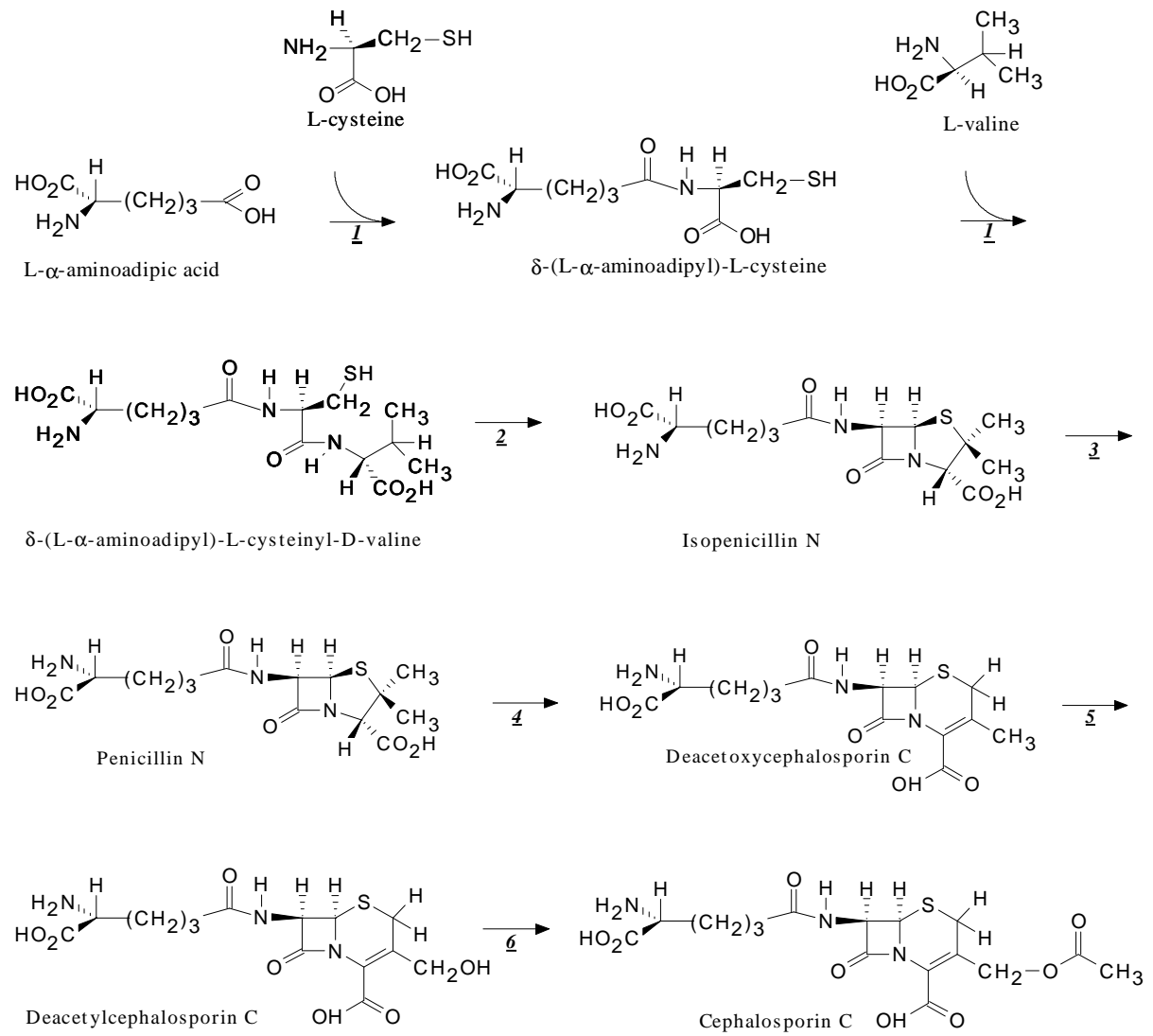


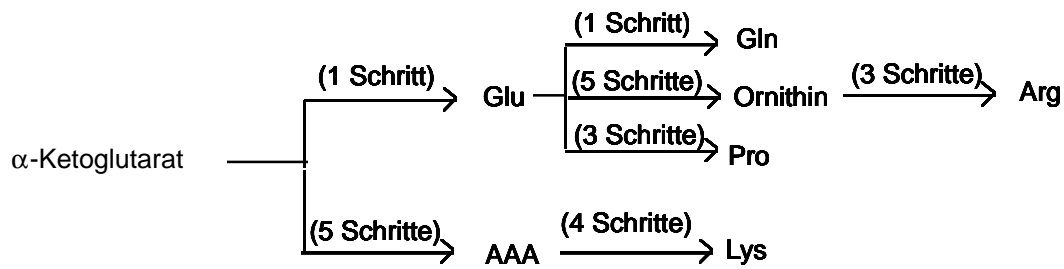
Abb. 2.1 : Die Biosynthese des Cephalosporin C /Martin *et al.*, 1989/

2.2.2 Die Bedeutung von Aminosäuren für die Biosynthese des Cephalosporin C

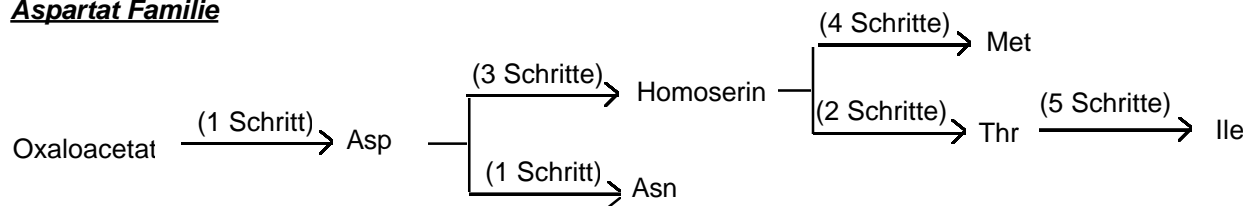
Aminosäuren gelten generell als ein wertvolles Substrat. Zumeist werden sie als organische, leicht metabolisierbare Stickstoffquelle verwendet, da hohe Ammoniumkonzentrationen inhibierend auf einzelne Enzyme wirken /Zhang *et al.*, 1987/. Neuerdings werden vereinzelte Aminosäuren gezielt eingesetzt, wenn sie aufgrund von Stoffwechseluntersuchungen direkt mit der Biosynthese des gewünschten Produktes in Zusammenhang gebracht werden können. Allerdings ist ihr industrieller Einsatz durch ihren hohen Marktwert zum Teil begrenzt. In Corn-Steep-Liquor, der häufig zur Kultivierung zahlreicher Pilze verwendet wird, finden sich allerdings eine ganze Reihe von verschiedenen Aminosäuren (siehe Anhang). Diese liegen hauptsächlich als Proteine vor, die erst durch Proteasen gespalten werden müssen. Dabei entstehen aus den Proteinen Peptide mit geringem Molekulargewicht und/oder Aminosäuren. Die komplette Hydrolysierung zu Aminosäuren erfolgt oftmals aber erst intrazellulär, nachdem die Oligopeptide in die Zellen transportiert worden sind. Aus dem Aminosäure-Katabolismus resultiert ein Absondern von Ammonium in das extrazelluläre Medium durch Desaminierung. Daher ist am Anfang einiger Fermentationen ein Anstieg der Ammonium-konzentration zu beobachten. Erst nachdem die Aminosäuren aus dem Nährmedium aufgenommen sind, erfolgt ein Abbau der Ammoniumkonzentration /Nielsen, 1995/. Bei den Fermentationen, die in dieser Arbeit untersucht werden, wird die Ammoniumkonzentration jedoch bewußt niedrig gehalten. Die Aufnahme von Ammonium und Aminosäuren erfolgt zumeist gleichzeitig (siehe Ergebnisteil).

In der folgenden Abbildung 2.2 sind die komplexen Wege der Biosynthese der Aminosäuren vereinfacht dargestellt. Nach Pateman *et al.* /1976/ kann man die Aminosäuren in Pilzen, ähnlich wie in Bakterien, in fünf Familien unterteilen, zuzüglich der Biosynthese des Histidins.

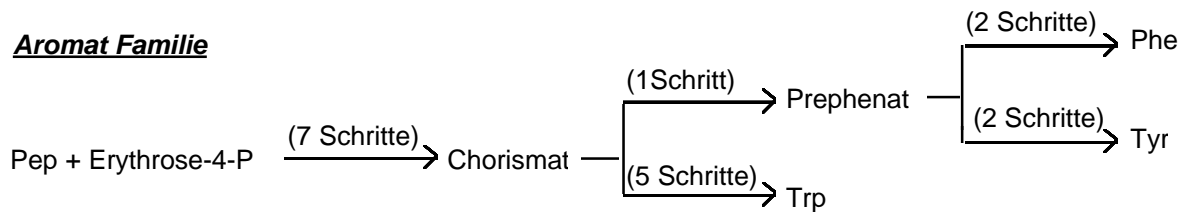
Glutamat Familie



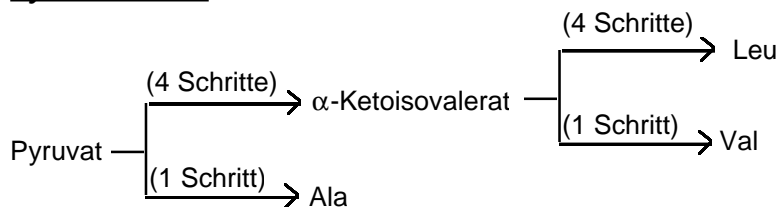
Aspartat Familie



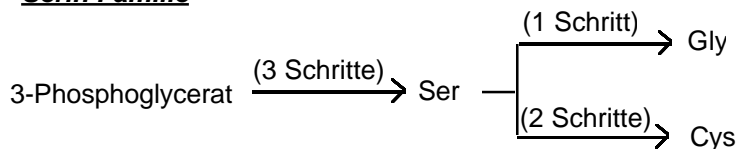
Aromat Familie



Pyruvat Familie



Serin Familie



Histidin

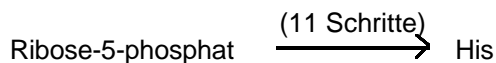


Abb. 2.2 : Allgemeiner Überblick über die Biosynthese von Aminosäuren

Der deutlichste Unterschied zwischen den Stoffwechselwegen bei Bakterien und Pilzen ist die Lysin-Biosynthese. Zudem steht diese in direktem Zusammenhang zur Biosynthese des Cephalosporin C. Wie schon eingangs erwähnt, gründet sich die Biosynthese des Cephalosporin C auf das aus den drei Precursor-Aminosäuren L- α -Aminoacidipinsäure, L-Cystein und L-Valin gebildete Tripeptid LLD-ACV. Da der Gehalt an diesen Precursoren im vorgelegten Kulturmedium im Verhältnis zur produzierten Menge des Cephalosporin C sehr gering ist, sind die Biosynthesewege dieser Aminosäuren von entscheidender Bedeutung.

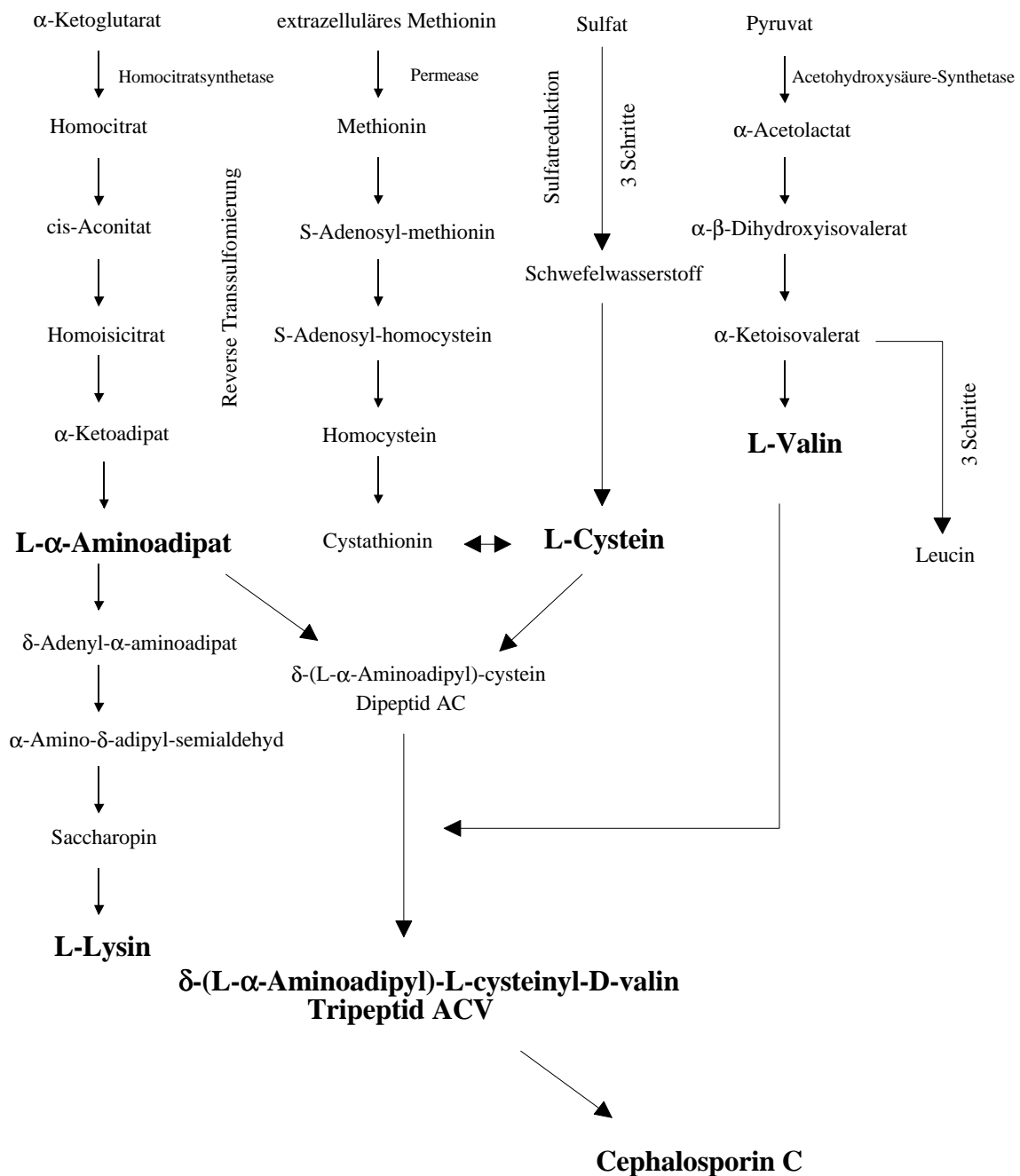


Abb. 2.3 : Biosynthese zu Vorläufern der β -Lactam-Antibiotika nach Malik /1980/

Die α -Aminoadipinsäure ist ein ausschließlich in Pilzen vorkommendes Intermediat der Lysin-Biosynthese und sie unterliegt als solches einer Feedback-Hemmung der Homocitrat-Synthase durch das Endprodukt Lysin. Nach Smith /1985/ ist die Folge dieser Hemmung eine verminderte Produktion an α -Aminoadipinsäure in *Penicillium chrysogenum*. Metha *et al.* /1979/ fanden einen ähnlichen Zusammenhang für *Acremonium chrysogenum*, zudem stellten sie fest, daß niedrige Lysin-Konzentrationen die Cephalosporinbildung stimulierten. Beachtet werden muß jedoch die Kompartimentierung der einzelnen Schritte /Bhattacharjee 1985, Hönlinger und Kubicek 1989/.

Als weiterer Baustein ist die Aminosäure Cystein näher zu betrachten. Die Inkorporation des für die Cystein-Biosynthese essentiellen Schwefels in *Acremonium chrysogenum* kann prinzipiell auf zwei charakteristischen Wegen geschehen. Die erste - und auch bei dem verwendeten Stamm dominierende Möglichkeit - besteht in der Aufnahme extrazellulären Methionins sowie der sich anschließenden reversen Transsulfonierung zum Cystein. Nach Untersuchungen von Tollnick /1996/ kann der verwendete moderne Hochleistungsstamm von *Acremonium chrysogenum* auch den alternativen, zweiten Weg der Sulfatreduktion beschreiten. Nach Nielsen /1995/ geht die direkte Sulfatreduktion von L-Serin aus und spielt bei höheren Konzentrationen dieser Aminosäure eine Rolle. Deswegen wurde in einigen Kultivierungen ein Serinzusatz gewählt. Allerdings wird auch bei der Transsulfonierung L-Serin zur Umsetzung des Intermediats Homocystein in Cystathionin benötigt /Nielsen 1995/. Die tatsächliche Verwendung bleibt also unklar. Fest steht nur, daß L-Serin ebenso wie L-Methionin essentielle Aminosäuren der Cystein-Synthese darstellen.

Die Biosynthese des Valins besteht, wie in Abbildung 2.3 dargestellt, ausgehend vom α -Ketoglutarat aus vier Schritten und steht in enger Beziehung zu der ebenfalls verzweigten Biosynthese der Aminosäuren Leucin und Isoleucin. Aufgrund der intensiven Verknüpfung der drei Stoffwechselwege der verzweigten Aminosäuren ist die Regulation der Valin-Biosynthese komplex und teilweise noch nicht genau charakterisiert. Ein Intermediat der Valin-Biosynthese (α -Ketoisovalerat) stellt einen Kreuzungspunkt in den Synthesewegen des Valins und des Leucins dar. Michal /1993/ gibt eine Feedback-Hemmung der ersten drei enzymatischen Schritte der Valin-Synthese durch Valin, Leucin und Isoleucin an, während Alonso *et al.* /1987/ bei *Acremonium chrysogenum* eine Hemmung der Synthese durch L-Methionin beobachteten.

2.2.3 Die katalysierenden Enzyme in der Biosynthese des Cephalosporin C

Die δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D- γ -amin-synthetase (ACVS) stellt, wie eingangs erwähnt, das erste Enzym im Rahmen der Biosynthese aller natürlichen Penicilline und Cephalosporine dar. Es ist bekannt, daß dieser „committed step“ vom Standpunkt der Zellökonomie aus gesehen einer der Hauptregulationspunkte ist /Zhang und Demain, 1992/. Für die industrielle Nutzung entwickelt sich dies jedoch zu einem schwerwiegenden Nachteil, da die Bildung des Tripeptids ACV somit zum Engpaß der Cephalosporin C-Biosynthese wird. Die Regulation dieses Enzyms, d.h. sowohl die Genexprimierung als auch die Inhibierung/Aktivierung durch Stoffwechselmetabolite, ist aufgrund der Schlüsselposition der ACVS eingehend untersucht worden.

Die native ACVS ist ein aus zwei gleich großen Untereinheiten bestehendes, ungewöhnlich großes, aber glykosyliertes Multienzym mit einer Molmasse im Bereich zwischen 700 und 800kDa /Zhang und Demain, 1992/. Für *Penicillium chrysogenum* fanden Theilgaard *et al.* /1997/ eine Molmasse zwischen 425 und 470kDa in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode. Laut Hersbach *et al.* /1984/ handelt es sich um ein cytosolisch lokalisiertes Enzym. Nach neueren Untersuchungen von Lendenfeld *et al.* /1993/ an *Penicillium chrysogenum* liegt jedoch eine Bindung der ACVS mit der Vakuolenmembran vor. Die nichtribosomale Peptid-Synthetase /Lopez-Nieto *et al.*, 1985/ benötigt als Kofaktoren Mg^{2+} und ATP, welches infolge der Hydrolyse die nötige Energie für die Reaktion liefert. Intermediär tritt das Dipeptid LL-AC auf /Banko *et al.* 1986/, welches aber im Normalfall aufgrund der weitaus höheren Umsetzungsrate von LL-AC zu LLD-ACV nicht vom Enzym freigesetzt wird.

Zahlreiche *in-vitro* Untersuchungen an *Acremonium chrysogenum* zeigten komplexe Regulationsmechanismen. So wird die Synthese der ACVS durch Ammonium /Shen *et al.*, 1984b, Zhang *et al.* 1987b/ und Phosphat reprimiert, während Methionin induzierend wirkt /Zhang *et al.*, 1987a/. Die Kofaktoren ATP, L-Cystein /Zhang und Demain, 1991/ und α -AAA /Lopez-Nieto *et al.*, 1985/ haben sich als aktivierend herausgestellt, dagegen wirken Phosphat, Glyceraldehyd-3-phosphat /Zhang und Demain, 1991/, Ammonium /Zhang *et al.* 1987b/ und Fe^{2+} -Ionen /Zhang *et al.*, 1988/ inhibierend.

Theoretischer Teil

Eine Produktinhibierung der ACVS durch LLD-ACV bis zu einer Konzentration von 0,035mM konnte von Zhang *et al.* /1992b/ ausgeschlossen werden.

Kinetische Messungen der ACVS ergaben für die Precursor-Aminosäuren L- α -Aminoadipinsäure, L-Cystein und L-Valin Werte von $K_M = 0,17\text{mM}$, $0,026\text{mM}$ bzw. $0,34\text{mM}$ /Banko *et al.*, 1987/. Vergleichbare Untersuchungen an Zellfrei-Extrakten von *Streptomyces clavuligerus* führten zu ca. dreifach höheren Werten /Jensen *et al.*, 1988/. Ebenso zeigten die Untersuchungen von Theilgaard *et al.* /1997/ deutliche Unterschiede in *Penicillium chrysogenum*, was wieder die Schwierigkeit der Vergleichbarkeit von Ergebnissen unter den Mikroorganismen deutlich macht.

Die **Isopenicillin N-Synthetase (IPNS / Cyclase)** cyclisiert das Tripeptid ACV und gilt als das am besten charakterisierte Enzym der β -Lactam-Biosynthese. Nach Hersbach *et al.* /1984/ liegt die IPNS nicht membrangebunden und löslich im Golgi-Apparat vor. Untersuchungen an aufgereinigter Cyclase wurden sowohl für *Acremonium chrysogenum* /Pang *et al.*, 1984/ als auch für *Penicillium chrysogenum* /Pang *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1985/, *S. clavuligerus* /Jensen *et al.*, 1986b/ und *S. lactamdurans* /Castro *et al.*, 1988/ durchgeführt. Die Cyclisierung des LLD-ACV zum Isopenicillin N erfolgt oxidativ. Nach Bainbridge *et al.* /1992/ ist eine äquimolare Menge Sauerstoff als Kofaktor erforderlich, und die Kinetik der Reaktion ist als erster Ordnung bezüglich der Gelöstsauerstoffkonzentration beschreibbar.

Nach Baldwin und Abraham /1988/ spielt im Verlauf der katalytischen Umsetzung das, mit hoher Affinität reversibel, vermutlich im aktiven Zentrum, gebundene Fe^{2+} eine zentrale Rolle. Die Cyclase weist für Ihr Substrat LLD-ACV einen K_M -Wert von $0,34\text{mM}$ auf /Pang *et al.*, 1984/. Zusätzliche Kofaktoren sind Dithiothreitol und Ascorbat /Martin und Liras, 1989/, wobei letzteres dazu dient, das Eisen in der aktiven, zweiwertigen Form zu halten. Dithiothreitol hat hingegen *in-vitro* die Aufgabe, eine Oxidation, des in Reaktionsansätzen vorgelegten Substrates LLD-ACV, zur disulfidischen (bis-ACV) Form zu verhindern, da ausschließlich reduziertes LLD-ACV als Substrat akzeptiert wird /Jensen *et al.*, 1982; Perry *et al.*, 1988/. *In-vivo* wird diese Aufgabe vermutlich von einer Disulfidreduktase übernommen /Cohen *et al.*, 1994/. Da Dithiothreitol einen stabilisierenden Einfluß auf die Aktivität der Cyclase während der Aufreinigung hat, wird vermutet, daß reduzierte Thiolgruppen des Enzyms essentiell für die Aktivität sind. Der Einsatz von Dithiothreitol schützt das Enzym folglich vor einer Oxidation durch Sauerstoff /Ramos *et al.*, 1985/.

Theoretischer Teil

Als nächste Reaktion im biosynthetischen Weg zum Cephalosporin C folgt die Epimerisierung der L- α -Aminoadipat-Seitenkette des Isopenicillin N zur D-Konfiguration. Das für diese Umwandlung zuständige Enzym ist die von Konomi *et al.* /1979/ nachgewiesene **Isopenicillin N-Epimerase**. Nach Hersbach *et al.* /1984/ liegt die IPN-Epimerase vermutlich membranassoziiert vor. Die IPN-Epimerase ist in Zellfrei-Extrakten sehr instabil und konnte deswegen bisher nur äußerst unzureichend charakterisiert werden /Martin und Liras, 1989/. Nach Jayatilake *et al.* /1981/ benötigt das Enzym weder Fe^{2+} noch Ascorbat oder ATP als Kofaktoren. Die K_M -Werte der IPN-Epimerase aus *S. clavuligerus* für Isopenicillin N und Penicillin N betragen 0,3mM respektive 0,78mM /Usui *et al.* 1989/.

Die Ringerweiterung des Penicillin N zum Deacetoxycephalosporin C (DAOC) sowie die sich anschließende Hydroxylierung zum Deacetylcephalosporin C (DAC) wird in *Acremonium chrysogenum* durch ein bifunktionales Enzym katalysiert, der **Deacetoxycephalosporin C-Synthase und -Hydroxylase**. Bei dem Enzym handelt es sich um eine intermolekulare Dioxygenase mit einem Molekulargewicht von ca. 41kDa, dessen Bifunktionalität von Scheidegger *et al.* /1984/ postuliert wurde, nachdem es nicht gelang, die expandierenden und hydroxylierenden Enzymaktivitäten in Extrakten von *Acremonium chrysogenum* zu separieren. Bei der Aufreinigung von Expandase- und Hydroxylaseaktivitäten, die physikalisch assoziiert waren, fanden Baldwin *et al.* /1987/ ein konstantes Verhältnis von 7:1 heraus. Beide Enzymaktivitäten benötigen für die Umsetzung Sauerstoff und α -Ketoglutarat, welches in stöchiometrischen Mengen zu Succinat decarboxyliert wird /Baldwin, 1989b/. Martin und Liras /1989/ stellten die Verfügbarkeit des α -Ketoglutarates als möglichen limitierenden Faktor für die Ringexpansion dar. Weitere essentielle Kofaktoren sind neben Fe^{2+} -Ionen auch Ascorbinsäure und Dithiothreitol /Shen *et al.*, 1984; Lübke *et al.* 1985/.

Als inhibierend stellte sich Phosphat /Zhang *et al.*, 1988/ heraus, während Ammonium /Zhang *et al.*, 1987b/ und Glucose /Shen *et al.*, 1984/ reprimierend auf die Synthese des Enzyms wirken.

Nach den Untersuchungen von Lucas /1993/ und Scheidegger /1988/ ist die Expandase/Hydroxylase-Aktivität stärker von der Sauerstoffkonzentration abhängig als die Cyclisierung des ACV zum Penicillin N, so daß es bei Sauerstofflimitierung zur Akkumulation von Penicillin N kommt.

Die Expandase-Aktivität von *Acremonium chrysogenum* besitzt nach Dotzlaß *et al.* /1987/ K_M -Werte für Penicillin N und α -Ketoglutarat von 0,029mM und 0,022mM. Die Hydroxylase-Aktivität weist für DAOC und α -Ketoglutarat K_M -Werte von 0,02mM und 0,022mM auf.

Als letzter Schritt in der Biosynthese des Cephalosporin C folgt die Acetylierung des DAC zum Cephalosporin C durch die **Deacetylcephalosporin C-Acetyltransferase (Acetyltransferase)**. Fujisawa *et al.* /1975/ beschrieben das Enzym erstmalig und Scheidegger *et al.* /1985/ konnten es partiell aufreinigen. Danach folgten weitere Charakterisierungen, die aber erst durch Matsuyama *et al.* /1992/ unter Verwendung von 7-Aminocephalosporansäure als Puffer erfolgversprechend waren. Die extreme Instabilität *in-vitro* konnte so verringert werden. Die Acetyltransferase hat danach ein Molekulargewicht von 55kDa und zerfällt in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in zwei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 27kDa und 14kDa.

Die Acetyltransferase benötigt nach Fujisawa *et al.* /1975/ und Felix *et al.* /1980/ neben Mg^{2+} -Ionen zusätzlich Acetat, ATP und Coenzym-A bzw. Acetyl-Coenzym-A als essentielle Kofaktoren. Matsuyama *et al.* /1992/ konnten in neueren Untersuchungen den notwendigen Charakter von Mg^{2+} nicht bestätigen. Die Acetyltransferase besitzt eine hohe Substrataffinität für die Hydroxymethylgruppe am C_3 -Atom des DAC und wird durch Coenzym A, DAOC, PenN und 2,6-Dihydroxybenzoesäure inhibiert /Scheidegger *et al.*, 1985/.

Das der Michaelis-Menten Kinetik folgende Enzym weist bei 7,5 ein pH-Optimum und einen K_M -Wert für DAC von 0,029mM auf, während der K_M -Wert für Acetyl-CoA bei 1,05mM liegt.

2.3 Kultivierungsmedien für die Cephalosporin C-Produktion

Der entscheidende Faktor für das Wachstum eines Mikroorganismus und die Produktion von eventuellen Stoffwechselprodukten bildet die Zusammensetzung des Mediums, in dem eine Kultivierung stattfindet. Grundsätzlich wird zwischen synthetischen, d.h. chemisch genau definierten Zusammensetzungen, und komplexen Medien unterschieden.

Bei der Auswahl oder Entwicklung eines Kulturmediums sollten aus prozeßtechnischen und ökonomischen Gründen mehrere Kriterien berücksichtigt werden.

Theoretischer Teil

- Die Medienzusammensetzung muß so gewählt werden, daß die Bestandteile des Mediums weder intermolekular, noch mit dem Mikroorganismus selbst in störende Wechselwirkungen treten (**Interaktionskriterium**).
- Die Zell- und Komponentenanalytik muß während einer Kultivierung durchführbar sein, um die Kultivierung kontrollieren und regeln zu können (**Analytisches Kriterium**).
- Eine sich an eine Fermentation anschließende bzw. integrierte Aufarbeitung des Produktes sollte durch Medienbestandteile nicht grundlos erschwert werden (**Präparatives Kriterium**).
- Besonders bei großen Medienmengen sollten die verwendeten Komponenten kostengünstig sein (**Ökonomisches Kriterium**).

Im Labormaßstab werden meistens definierte Medien verwendet, da hier die analytische Komponente im Vordergrund steht. Da die Zusammensetzung des Mediums zu Beginn bekannt ist, kann die zeitliche Änderung verschiedener Substrat- und Metabolitkonzentrationen leicht bestimmt werden. Zudem sind die Medien feststofffrei bzw. -arm, so daß eine Trennung der Zellen vom Medium oder eine Isolierung des Produktes erleichtert wird. Aufgrund dieser Eigenschaften ist auch die Kontrolle des Bioprozesses zumeist leichter, da optische Analysemethoden zum Einsatz kommen können. In der Vergangenheit wurden schon mehrere Experimente mit *Acremonium chrysogenum* in synthetischen Medien durchgeführt. Bei fast allen wurde aber mit niedrigproduzierenden Stämmen gearbeitet, bei denen der Einfluß von Substraten auf die Biosynthese des Cephalosporin C genauer untersucht werden sollte /Velasco, 1994; Zhang, 1987/.

Im Industriemaßstab steht das ökonomische Kriterium im Vordergrund, so daß hier in der Regel komplexe Medien für die Antibiotikaproduktion verwendet werden. Ein solches Medium enthält Bestandteile natürlicher Herkunft, deren genaue Zusammensetzung nur lückenhaft bekannt ist und die sich von Zeit zu Zeit ändern kann. Da diese Rohmaterialien preiswert sind und in großen Mengen als Nebenprodukte in der Lebensmittelindustrie anfallen, sind sie ideal für Prozesse, die sich an der Ausbeute orientieren.

Der Einsatz eines synthetischen Mediums in der Industrie lohnt sich, wenn die Zusammensetzung einfach und preiswert ist oder ein sehr teures Produkt gewonnen werden soll. Komplexe Medien werden im Labormaßstab nur dann verwendet, wenn möglichst nah am Industrieprozess geforscht werden soll. Es wird also eine Prozeßoptimierung angestrebt, bei der die industriellen Betriebsbedingungen nahezu identisch sind.

Im Falle der Kultivierungen mit *Acremonium chrysogenum* zur Produktion von Cephalosporin C als Vorstufe zur Gewinnung halbsynthetischer Antibiotika findet ein Komplexmedium Verwendung. Es enthält als Kohlenstoffquelle in den Vorkulturen und zu Beginn der Hauptkulturen leicht verwertbare Glucose. Dies hat zur Folge, daß es unter starkem Biomassegewinn zu einem schnellen Anwachsen der Kultur kommt. In der Hauptwachstumsphase verstoffwechselt der Pilz den eingesetzten, ebenfalls leicht metabolisierbaren Trockenglucosesirup. Dieser besteht zu 1,5% aus Glucose, 35% Maltose, 21% Maltotriose und 42,5% Oligosacchariden.

Untersuchungen von Behmer und Demain /1983 bzw. 1982/ und Küenzi *et al.* /1980/ zeigen, daß hohe Konzentrationen von Glucose in der Produktionsphase zu unkontrolliertem Wachstum und zu negativen, regulatorischen Effekten bei der Biosynthese des Cephalosporin C führen. Dies hat zur Folge, daß heutzutage wachstumslimitierende Kohlenstoffquellen eingesetzt werden. In der Produktionsphase wird Sojaöl als C-Quelle angeboten, welches aufgrund seines hohen spezifischen Energiegehaltes keinen hohen Volumenfehler im Reaktor verursacht.

Acremonium chrysogenum gehört zu einer Spezies von Pilzen, die viele Stickstoffverbindungen in ihrem Stoffwechsel einsetzen können. Neben den im Medium in variablen Konzentrationen vorliegenden Hauptstickstoffquellen Ammonium und Aminosäuren, kann der Pilz auch Nitrat nach vorheriger Reduktion verwerten. Aminosäuren bilden aufgrund ihrer organischen Natur die bevorzugte Stickstoffquelle, weswegen L-Alanin und L-Arginin zugefüttert werden. Untersuchungen von Tollnick /1996/ und Beyer /1996/ zeigen, daß die im Corn-Steep-Liquor enthaltene Aminosäure L-Alanin bevorzugt aufgenommen wird, was sich auch im Rahmen dieser Arbeit zeigt.

3. Material und Methoden

3.1 Kultivierungsbedingungen im synthetischen und komplexen Medium

Der für alle Kultivierungen verwendete Hochleistungsstamm *Acremonium chrysogenum* A 3/2 (C3) wurde freundlicherweise von der Firma Hoechst AG Frankfurt/Main (HMR Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierungen werden in zwei und drei Stufen durchgeführt, wobei die Vorkulturparameter so eingestellt werden, daß das Erreichen einer hohen Animpfdichte für die Hauptkultur gewährleistet ist. Die Entwicklung des synthetischen Mediums wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Jürgens /1998/ untersucht und ist dort ausführlich beschrieben. Der Corn-Steep-Liquor wurde genau auf seine Zusammensetzung untersucht, um eventuelle Abweichungen von der in der Literatur veröffentlichten Zusammensetzung festzustellen. Der Ersatz der unlöslichen Komponenten des Corn-Steep-Liquors, durch die in Reinform vorliegenden Substrate, reduzierte das Medium auf seine löslichen Bestandteile. Dies bringt jedoch deutliche Unterschiede im Produktions- und Wachstumsverhalten mit sich (siehe Ergebnisteil), da unbestimmbare Wachstums- und Produktionsfaktoren fehlen.

3.2 1. Vorstufe (Schüttelkulturen)

Die in Ampullen zu je ca. 2,2 ml vorliegenden Sporensuspensionen werden in einem Dewar mit flüssigem Stickstoff gelagert. Um mehrere Vorversuche durchzuführen wird für das synthetische Medium ein teilweise anderer Anzuchtweg gewählt, als für die Schüttelkultur für Kultivierungen im komplexen Medium,. Da mehrere Schüttelkolben aus einer Sporenampulle angeimpft werden sollen, wird eine Stammhaltung auf Agarschrägen gewählt. Für die Stammhaltung auf Agar wird das Medium nach Küenzi *et al.* /1980/ (siehe Anhang) verwendet. Nach 20-minütigem Autoklavieren bei 121°C, was auch eine Homogenisierung des Mediums zur Folge hat, werden jeweils 5ml Agarmedium in die Schrägröhrchen gegossen. Nach 24 Stunden Auskühlung werden je 3 Impfösen Sporensuspension auf dem Agar verteilt. Die Agarschrägen wurden 7 Tage bei 25°C inkubiert. Die Röhrchen können nach der Inkubationszeit bei 4°C bis zu zehn Wochen gelagert werden.. Die abgeernteten Agarschrägen werden unter sterilen Bedingungen langsam auf Raumtemperatur gebracht. Das Inokulum wird in einen 1L-Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt.

Zum Beimpfen des Vorkulturmediums wird das Mycel mit einer Impföse vom Agar gelöst und mit einer sterilisierten, physiologischen Kochsalzlösung ausgeschwemmt.

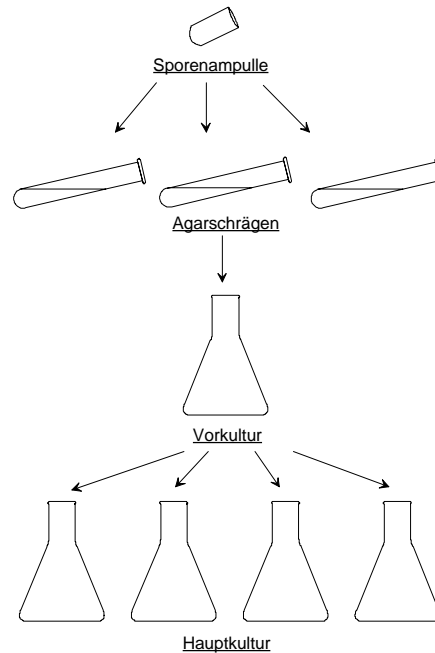


Abb. 3.1 : Anzuchtschema für das synthetische Medium

Für eine Kultivierung im komplexen Medium wird der Inhalt einer Sporenampulle für einen 1L-Erlenmeyerkolben direkt eingesetzt, die Agarhaltung entfällt. In dem Erlenmeyerkolben befinden sich 160ml eines auf Malz- und Hefeextrakt basierenden Anzuchtmediums, welches vorher bei 121°C 20min sterilisiert wird. Das Medium ist leicht metabolisierbar und garantiert somit ein rasches Anwachsen des Pilzes. Die Schüttelkultur wird 72h bei 25°C und 280Upm auf einem Rundschüttler mit 3cm Hub geschüttelt, so daß auch hier schon für eine ausreichende Sauerstoffversorgung gesorgt ist. Ausgehend von dieser Zellsuspension können entweder mehrere Schüttelkolben für Kleinexperimente angeimpft oder aber in den Fermentermaßstab übergegangen werden.

3.3 2. Vorstufe (Nur für Komplexmedium)

Die zweite Vorkultur enthält bereits Corn-Steep-Liquor und Glucose im Medium (siehe Anhang), um die Synthese produktionsrelevanter Enzyme anzuregen. Sie wird in einem 10L fassenden Biostat V (Firma Braun, Melsungen) durchgeführt. 24 Stunden vor dem Animpfen wird das Kulturgefäß mit 6L des Mediums gefüllt und 35-40min bei 121°C mit ca. 1bar Überdruck dampfsterilisiert. Nach dem Abkühlen wird der Fermenter auf 25°C thermostatisiert und mindestens 12 Stunden gewartet, ehe der pH-Wert auf 6,5 eingestellt wird.

Mit einem Mass-Flow-Controller wird eine der Hauptkultivierung entsprechende Sauerstoffzufuhr durch Begasung mit Preßluft (pO_2 -Wert läuft unregelt, aber reproduzierbar) eingestellt und der Rührer auf 600 UPM justiert. Abbildung 3.2 zeigt den typischen Verlauf einer Vorkultur anhand der Meßgrößen pH-Wert und CO_2 im Abgas [%]. Der Überimpfzeitpunkt zur Hauptkultur wird fast immer nach 25-30 Stunden erreicht. Im allgemeinen sind die Meßdaten der Vorkultur gut reproduzierbar.

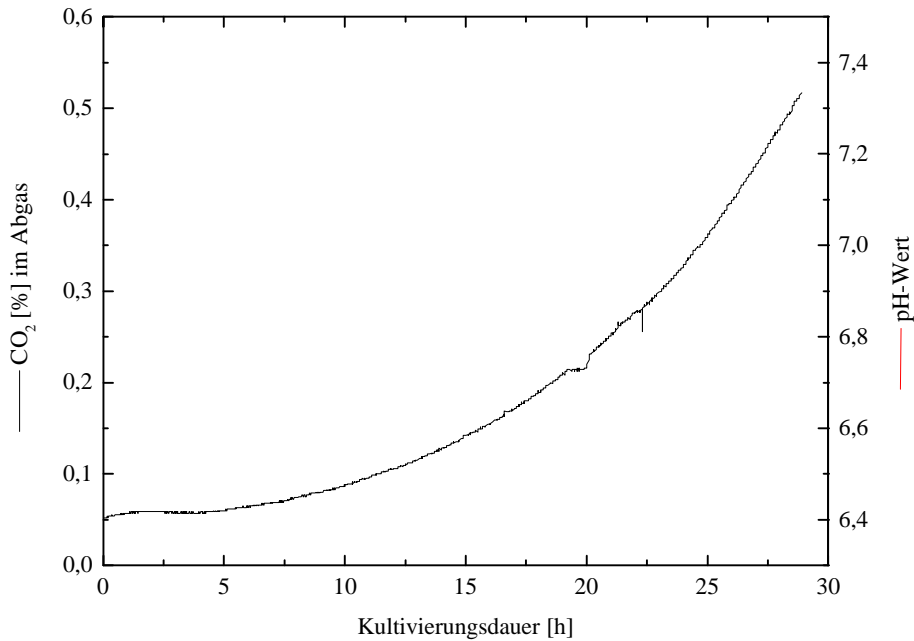


Abb. 3.2 : pH-Wert und CO_2 im Abgas bei einer typischen Vorkultur

Auf die zweite Vorkultur wird für die Kultivierung im synthetischen Medium verzichtet, da der Eintrag an unlöslichen Bestandteilen und Festkörperpartikeln zu groß wäre.

3.4 Hauptkultur (Biostat UD) und Prozeßsteuerung

Die Hauptkultivierungen werden sowohl für das synthetische Medium als auch für das komplexe Medium in einem 30L Arbeitsvolumen fassenden Biostat UD-Reaktor (Fa. Braun, Melsungen) durchgeführt. Der Biostat UD ist mit einer digitalen Meß- und Regeleinheit (DCU, 16-bit Mikrorechner auf VME-bus Basis) versehen, welche wiederum mit dem auf einem separaten Rechner installierten Prozeßleitsystem Ubicon (Fa. esd, Hannover) kommuniziert. Die Meßdatenerfassung und die Prozeßsteuerung erfolgt von diesem externen Rechnersystem aus.

Die Ein- und Ausgabekarte des Systems ist eine 16 kanälige, asynchrone, serielle VME-ASIO16 (Fa. esd, Hannover), welche es ermöglicht, im Sekundentakt Meßergebnisse aufzuzeichnen. Die Speicherung der Messung erfolgt alle 60 Sekunden und kann über die auf Pearl/RTOS-UH basierende Software (UBICON, Fa. esd) graphisch verfolgt werden, was eine Beobachtung des Prozesses und notwendige Eingriffe erleichtert. Über einen einfachen Formeleditor kann die Eingabe komplexer Formeln stattfinden, wie z.B. die wichtigen Betriebsparameter wie OTR (Sauerstofftransferrate), CPR (Kohlendioxidproduktionsrate) und RQ (Respirationskoeffizient) (Formeln siehe Anhang), die sofort berechnet werden.

Der Reaktor wird mit einer pH-Elektrode (Fa. Broadley-James), einem Thermoelement (PT100), einem 2D-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi oder BioView) sowie einer Sauerstoffsonde (Fa. Ingold oder Fa. Mettler-Toledo) zur Prozeßüberwachung versehen. Zur Abgas-Analytik sind ein CO₂-Detektor (UNOR 6N, Fa. Maihak) und ein O₂-Detektor (Oxygor 610, Fa. Maihak) in den Abgasstrom integriert. In Abbildung 3.3 ist der schematische Aufbau des Reaktors dargestellt. Der Fermenter wird mit 25L bzw. 30L der im Anhang aufgelisteten Kulturmedien versehen und bei 121°C (ca. 1bar Überdruck, 200 UPM) 30min dampfsterilisiert. Anschließend wird der Reaktor auf 25°C thermostatisiert und mindestens 12 Stunden stehengelassen. Danach werden die Prozeßparameter eingestellt {25°C, 600 UPM, pH-Wert 6,5 (Kontrolle durch off-line-Probe, um eine eventuelle Drift der Elektrode im Reaktor auszuschließen), Begasung : 15 bzw. 30 slm (0,5 bzw. 1 vvm) Preßluft zuzüglich Sauerstoffzudosierung, pO₂-Wert auf 100 %-ige Luftsättigung}. Der Gesamt- und Sauerstoffstrom wird über eine Zweikanalsteuereinheit (Gasratiocontroller, Fa. Braun, Melsungen) geregelt. Die pH-Regulierung während des Prozesses erfolgt durch die Zugabe von 12,5%-iger Ammoniumhydroxidlösung und konzentrierter Schwefelsäure und setzt nach 20h ein, bzw. bei Erreichen der vorgegebenen Grenzpunkte von pH 7,5 bzw. pH 5,75. Die Sauerstoffzudosierung setzt bei Erreichen des eingestellten Grenzwertes (meistens pO₂-Wert von 60%) ein und beträgt maximal 10% des Gesamtstromes an Pressluft. Durch Verdampfung während der Sterilisation und dem späteren Animpfen pendelt sich das Volumen in der Regel auf 30-31L ein. Die Prozeßdauer wird ab dem Impfzeitpunkt betrachtet, obwohl im Komplexmedium, resultierend aus der zweiten Vorkultur, mit einer sehr hohen Animpfdichte von 19% gearbeitet wird. Bei den Kultivierungen im synthetischen Medium wird der Hauptreaktor direkt mit der Schüttelkultur angeimpft, wobei eine hohe Verdünnung dieser gewährleistet ist, was einen sehr geringen Feststoffeintrag und eine längere Lagphase (siehe Ergebnisteil) zur Folge hat.

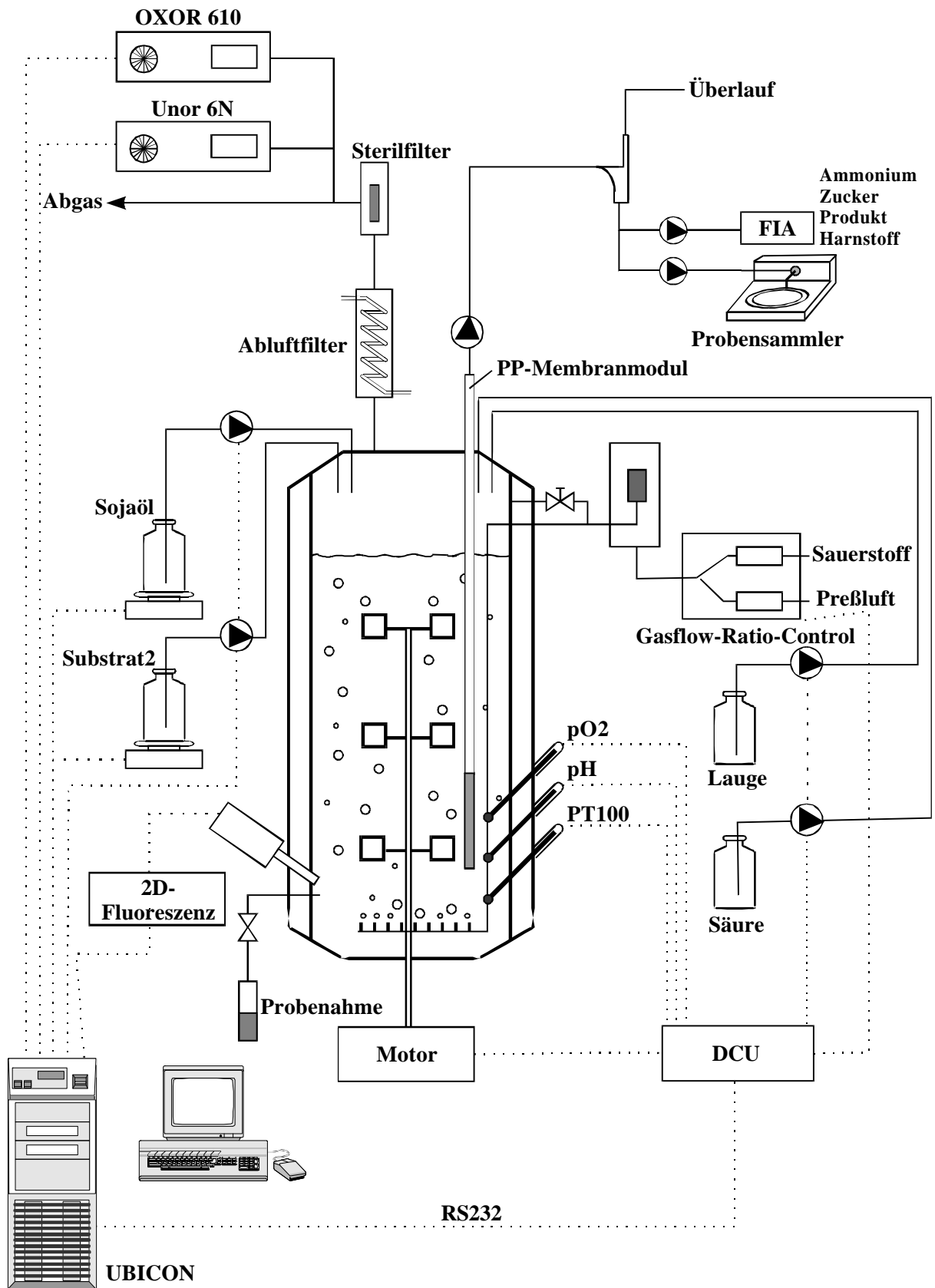


Abb. 3.3 : Schematischer Aufbau des Kultivierungsreaktors (BIostat UD)

3.5 Kulturfluoreszenz und 2-Dimensionale Fluoreszenzspektrometrie

Die verwendeten Reaktoren können mit dem Ingold-Fluorosensor [Fa. Ingold] bestückt werden, um die NAD(P)H-Fluoreszenz im Bereich der Exzitation von 340-360nm und der Emission bei 450-460nm zu messen. Nach Scheper *et al.* /1986/ bietet diese Möglichkeit eine elegante, nicht-invasive Methode zur Biomasseabschätzung in der exponentiellen Wachstumsphase.

Da am Institut für Technische Chemie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Thomas Scheper die optische Analytik der zweidimensionalen Fluoreszenzspektrometrie angewendet wird, wurden in Zusammenarbeit mit Lindemann /1998/ mehrere Messungen der Kulturfluoreszenz durchgeführt. Die Messungen erfolgten on-line im 10L und 30L Maßstab, durch einen direkt in den Bioreaktor integrierten Stutzen, in den der Lichtleiter während der Kultivierung eingesetzt wird. Hierdurch besteht kein Kontaminationsrisiko und es wird die relative Fluoreszenzintensität *insitu* während der Kultivierungen, durch ein in den Stutzen integriertes Quarzglas verfolgt.

Zunächst werden mehrere Spektren in hochkomplexen Industriemedien mit dem kommerziell erhältlichen Hitachi F4500-Fluoreszenzspektrometer (Fa. Hitachi, Japan) verfolgt. An diesem Gerät können durch Gittermonochromatoren Exzitations- und Emissionwellenlänge unabhängig voneinander eingestellt werden.

Anschließend werden in verdünnten Komplexmedien und synthetischen Medien einige Kultivierungen mit dem BioView-Fluoreszenzsensor (Fa. Delta Light & Optics, Dänemark) überwacht. Dieses Gerät ist in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie, Universität Hannover als Prototyp entwickelt worden und ermöglicht durch Filterräder die Einstellung von Exzitation- und Emissionswellenlängen. Das Verfahren erlaubt die Fluoreszenzmessung in einem Bereich von 280-450nm (Exzitation) bzw. 300-600nm (Emission) und ermöglicht somit die Identifikation weiterer Fluorophore, vor allem im synthetischen Medium, da dort der störende Corn-Steep-Liquor fehlt. Genaue Daten über die verwendeten Spektrometer sowie die Versuchsaufbauten finden sich bei Lindemann /1998/ und Marose /1998/.

3.6 Probenahme

3.6.1 Diskontinuierliche Probenahme (off-line)

Für die diskontinuierliche Probenahme steht am Fermenter ein Probenahmeventil zur Verfügung. Die Probenahme wird - wenn möglich - zweimal täglich mit mehreren Personen durchgeführt, um eine zügige Verarbeitung zu garantieren. Anschließend erfolgt jeweils eine 20-minütige Dampfsterilisation des Probenahmeventils. Die off-line Proben bilden die Grundlage für alle Untersuchungen, die direkt mit der Zellmasse in Zusammenhang stehen, da on-line nur zellfreies Kulturmedium gesammelt werden kann. d.h. mit diesen Proben werden sowohl die Zellaufschlüsse sowie Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt, als auch intrazelluläre Metabolite gemessen. Da die Bestimmung der Enzymaktivitäten bei den off-line Proben im Vordergrund steht, wurde ein schnelles Probenahmeverfahren entwickelt. Für diese Analyseverfahren muß eine Trennung der Biomasse vom Kulturmedium, bzw. von sonstigen extrazellulären Substanzen erfolgen, die an den Zellen anhaften. Gleichzeitig muß ein Verfahren gefunden werden, das den Stoffwechsel in den Proben nach der Probenahme möglichst schnell unterbindet. Daher wird einerseits auf eine strenge Kühlung während der gesamten Probenahme geachtet andererseits wird der Einsatz von Proteaseinhibitoren bei der Lagerung in einem Aufschlußpuffer getestet. Das folgende Schema stellt die wichtigsten Schritte der Probenahme dar.

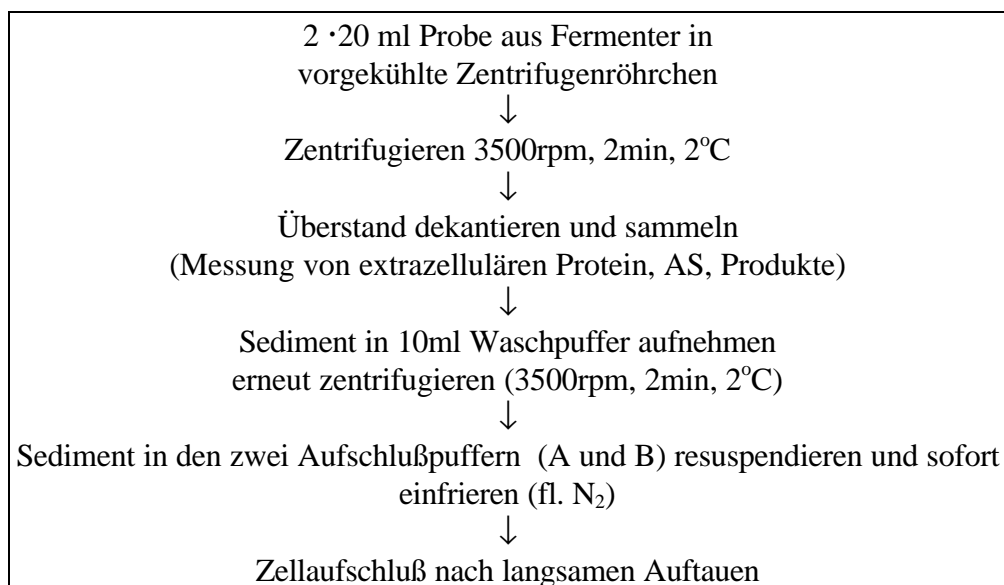


Abb. 3.4: Probenahmeschema für intrazelluläre Messungen

In zwei auf Eis vorgekühlte Schraubdeckelzentrifugenröhrchen werden jeweils 20ml Probe der Kultivierung abgefüllt und in einer Kühlzentrifuge die Biofeuchtmasse vom flüssigen Überstand getrennt (3500Upm, 2min, 2°C). Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit jeweils 10ml, auf Eis vorgekühltem Waschpuffer (siehe Anhang) resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (3500Upm, 2min, 2°C). Um ein schnelles Auswaschen intrazellulärer Bestandteile zu vermeiden, wird auf ein zweites Waschen verzichtet. Wie spätere Ergebnisse zeigen werden, ist dieses auch nicht zwingend notwendig. Die Überstände werden abermals verworfen und die Rückstände in jeweils 10ml, eines auf Eis vorgekühlten Aufschlußpuffers A bzw. B (siehe Anhang) aufgenommen. Aufschlußpuffer A enthält keine Inhibitoren, während Aufschlußpuffer B ein Gemisch aus verschiedenen Inhibitoren zugesetzt ist. Dabei handelt es sich um ein Produkt der Fa. Boehringer Mannheim, das besonders zur Inhibierung von Proteasen empfohlen wird. Anschließend werden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bearbeitungszeit bis zur Lagerung konnte auf 8min bei maximal 2°C reduziert werden /Fahimi 1998/. Neben diesem beschriebenen Verfahren werden noch mehrere Proben nach anderen Verfahrensweisen zur direkten Biomassebestimmung, für morphologische Untersuchungen, der Gesamtzuckerbestimmung sowie der Quantifizierung des Proteingehaltes genommen und schockgefroren (siehe unten).

3.6.2 Kontinuierliche Probenahme (on-line)

Für die kontinuierliche Probenahme sind im Fermenter ein oder zwei parallel geschaltete Probenahmemodule mit tubulären Polypropylen-Mikrofiltrationsmembranen (0,1µm, Eppendorf) eingebaut. Um eine Hydrophilisierung der Membranen zu gewährleisten, werden diese gewöhnlich in einem Isopropanol-Wasser-Gemisch gelagert. Dadurch wird garantiert, daß sich kein Zellmaterial, Feststoffe und vor allem Öl im Filtrat ansammelt. Erst im späteren Verlauf der Kultivierung werden die Membranen etwas durchlässig für Öl, welches dann zu Beginn der Analytik mit n-Hexan extrahiert werden kann.

Vor und nach einer Kultivierung können die Module durch Reinigung (Spülen für 24 Stunden) mit 3%-iger, heißer Mucosol-Lösung von Medienbestandteilen gesäubert werden und sind somit für mehrere Kultivierungen einsetzbar.

Der kontinuierliche Entnahmestrom wird durch Schlauchpumpen nahezu konstant gehalten (0,3ml/min) und gewährleistet die Versorgung des Probeablagensystems sowie in Reihe geschaltete andere Analysengeräte wie FIA-Anlagen oder eine on-line HPLC.

Das Probeablagesystem besteht aus einem programmierbaren Autosampler (Gilson XL222, abimed) und einem auf -18°C tiefkühlbaren Rack, welches ein sofortiges Schockgefrieren der Proben in 60 Eppendorf-Reaktionsgefäße (je 2,2ml) ermöglicht und somit enzymatische und chemische Reaktionen in den Proben unterdrückt. Über den Autosampler kann die Menge und die Frequenz gesteuert werden, meist wird jede Stunde über einen Zeitraum von 10min ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Anzumerken ist, daß sich die aus diesen Proben ermittelten Werte auf das Kulturfiltrat beziehen und teilweise mit dem entsprechenden Sedimentvolumen der off-line Proben korrigiert werden müssen.

3.7 Analytik

Der analytische Teil der Arbeit wird in zwei große Bereiche getrennt.

Erstens, die extrazellulären Bestimmungen, die in erster Linie Aufschluß über prozeß-relevante Größen geben sollen. Aus diesen Werten wird der Kultivierungsverlauf auf Reproduzierbarkeit und Erfolg hinsichtlich der Verbesserung der Produktivität untersucht. Als wichtigster Punkt steht hier die Untersuchung der Produkte der β -Lactam Biosynthese.

Zweitens, die intrazellulären Untersuchungen, die Aufschluß über Engpässe in der Biosynthese des Cephalosporin C geben sollen. Hier stehen folglich die Enzymaktivitäten, der in der Biosynthese involvierten Enzyme, und die Aminosäurespektren im Mittelpunkt. Die im extrazellulären Teil beschriebenen Methoden für Produkt- und Aminosäureanalytik sind analog übertragbar auf die mit anderen Proben durchgeführten intrazellulären Untersuchungen, allein die Konzentrationsunterschiede - der betrachteten Substanzen in den Proben - müssen berücksichtigt werden.

Kernstück für beide Untersuchungen ist die HPLC, die durch ergänzende Analysemethoden unterstützt wird. Die folgende Abbildung 3.5 zeigt das verwendete HPLC-System. Auf diesem automatisierten Chromatographiesystem können sowohl Produktkonzentrationen, Aminosäuren sowie Enzymaktivitäten gemessen werden. Der Benutzer muß lediglich zwischen der entsprechenden Methode und Säule wählen, dies ist über ein umfunktioniertes Umschaltventil (Rheodyne-6-Wege-Injektionsventil) möglich, welches den entsprechenden Autosampler mit der jeweiligen Säule koppelt. Beide Säulen werden von der gleichen HPLC-Pumpe (IRICA) versorgt.

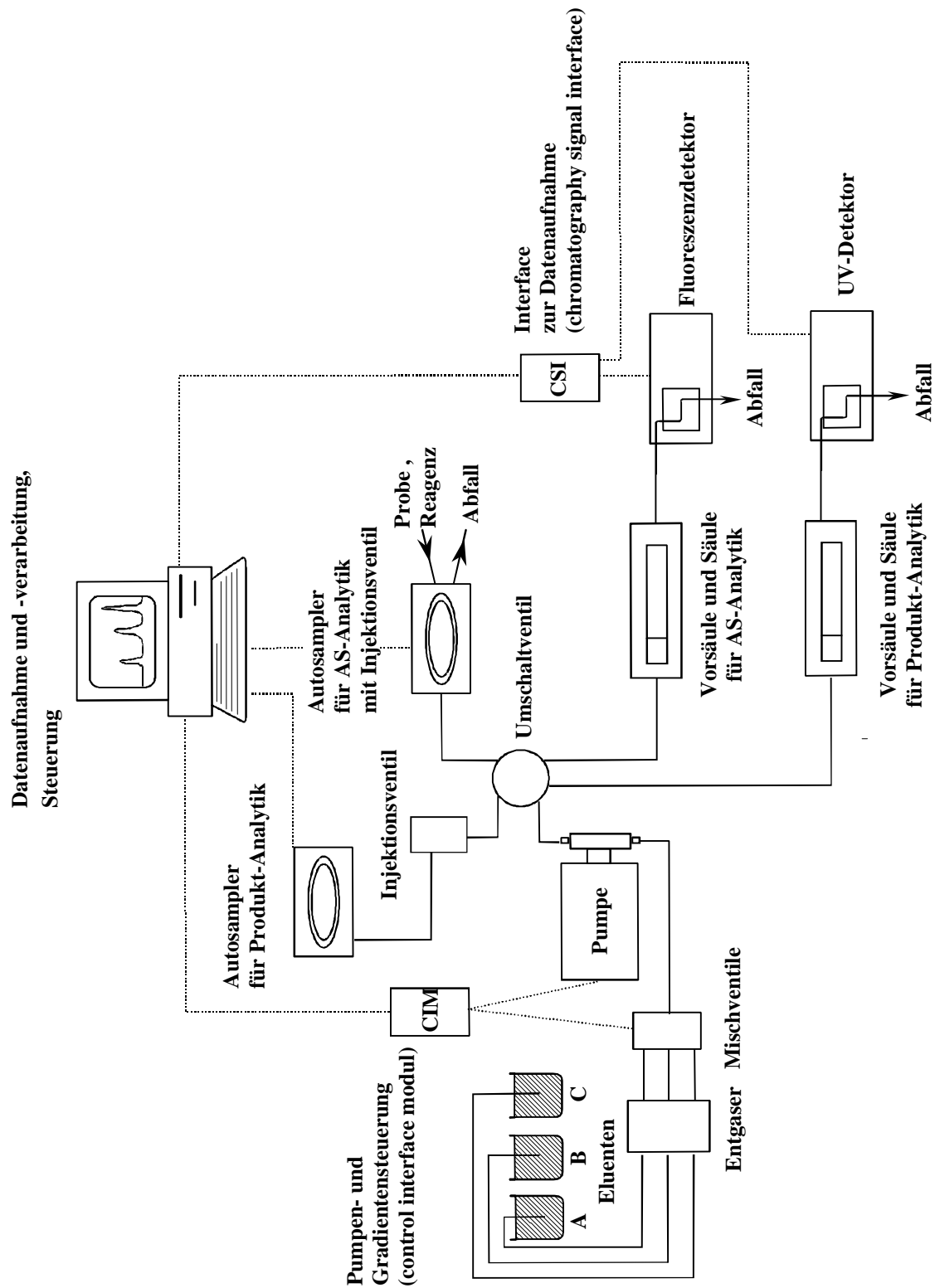


Abb. 3.5 : Schematischer Aufbau des verwendeten HPLC-Systems

3.7.1 Extrazelluläre Untersuchungen

3.7.1.1 Biomassebestimmung

Für die Biomassebestimmung werden 25ml Probe in ein vorher ausgewogenes, skaliertes Zentrifugenglas abgefüllt und so zunächst das absolute Sedimentvolumen bestimmt. Es wird bei 3500Upm 10min zentrifugiert (Laborfuge GL, Heraeus Christ). Der so gewonnene Überstand verworfen, das Sediment ausgewogen (Biofeuchtmasse) und anschließend das Sediment in einem Trockenofen bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (min. 48 Stunden).

Die so erhaltene Biotrockenmasse enthält somit einen hohen Feststoffanteil aus dem Medium und ist nicht als reine Biomasse zu verstehen. Sie gibt aber Aufschluß über den Zuwachs an Biomasse, da der Feststoffanteil im Laufe der Kultivierung immer geringer wird. Dies gilt natürlich nicht in dieser Form für das definierte Medium, da dort kein Feststoffanteil auftritt und somit das Sediment gleich der Biomasse ist.

3.7.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford /1976/

Zur Bestimmung des extrazellulären Proteingehaltes werden zunächst 3 x 2ml Probe in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt und in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und bei -18°C eingefroren, um eine spätere Verarbeitung zu ermöglichen.

Der eigentliche Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue an Proteinen. Der Farbstoff wird bei der Bindung an Proteine durch eine doppelt protonierte anionische Form stabilisiert, die bei 595nm optisch meßbar ist.

Nach dem Auftauen werden die Proben auf einen Proteingehalt von ca. 1-50µg/ml verdünnt. 200µl dieser Verdünnung werden mit 800µl Bradfordreagenz (siehe Anhang) versetzt. Nach 10min wird die Extinktion gegen eine Blindprobe gemessen.

Die Konzentrationszuordnung erfolgt über eine vorher gemessene BSA-Standardreihe, die hyperbolisch ausgewertet wird (Origin 5.0, Firma MicroCal Software), da die Konzentrationszunahmen im oberen Meßbereich nicht mehr linear sind.

3.7.1.3 DNA-Bestimmung nach Dische

Der Dische-Test ist eine auf Pilze angepaßte Methode, die auf die Bildung eines blauen Triphenylmethan-Komplexes mit der freigesetzten DNA nach saurer Hydrolyse zurückzuführen ist /Burton, 1956/. Eiskalte Perchlorsäure sorgt für die vollständige Fällung der DNA wie der Proteine. Danach erfolgt die saure Hydrolyse durch Perchlorsäure bei 37°C. Jeweils 0,5ml der bei 3500 Upm abzentrifugierten Proben werden mit 0,5ml 1M HClO₄ vermischt und 30min ins Eisbad gestellt. In der Mikrozentrifuge werden wäßrige und organische Phase wieder getrennt und der Überstand verworfen. Das Sediment wird mit 1ml 0,5M HClO₄ resuspendiert. Aus 0,5ml einer DNA-Stammlösung (1mg/ml) wird mit 0,5ml 1M HClO₄ eine Standard-Lösung hergestellt. Proben und Standard werden 15min im Eppendorf-Thermostat auf 95°C erhitzt. Für die Entnahme der Probenansätze muß nochmals zentrifugiert werden. Nach dem Abkühlen wird aus dem Standard eine Verdünnungsreihe hergestellt:

0,5ml Standard	+ 4,5ml 0,5M HClO ₄	(1) entspricht 50µg/ml
0,6ml Verd. (1)	+ 0,4ml 0,5M HClO ₄	(2) entspricht 30µg/ml
0,4ml Verd. (1)	+ 0,6ml 0,5M HClO ₄	(3) entspricht 20µg/ml
0,2ml Verd. (1)	+ 0,8ml 0,5M HClO ₄	(4) entspricht 10µg/ml
0,1ml Verd. (1)	+ 0,9ml 0,5M HClO ₄	(5) entspricht 5µg/ml

Jeweils 0,5ml der Probenansätze und der Standardverdünnungen werden mit 1ml Gebrauchsreagenz über Nacht im Eppendorf-Thermostaten auf 37°C erhitzt (12-24 Stunden). Die Herstellung des Gebrauchsreagenz erfolgt nach:

2% Acetaldehyd	0,5ml 99% Acetaldehyd in 25ml H ₂ O lösen und bei 4°C aufbewahren (täglich frisch!!!).
Diphenylamin-Lösg.	1,5g Diphenylamin in 100ml Eisessig lösen und 1,5ml konz. H ₂ SO ₄ zugeben.
Gebrauchsreagenz	0,1ml Acetaldehyd-Lösung und 20ml Diphenylamin-Lösung unmittelbar vor der Verwendung mischen.

Nach dem Abkühlen wird die Extinktion bei 600nm in einer Quarzküvette gemessen. Eventuell muß bei noch ausfallenden Proteinresten zuvor zentrifugiert werden.

Die normalerweise vorausgehenden Waschschrirte sind bei diesem Verfahren nicht berucksichtigt, da mit bereits gewaschenen Proben gearbeitet wird.

3.7.1.4 Morphologische Betrachtungen

Fur die lichtmikroskopische Untersuchung stand ein Mikroskop der Firma Olympus (BH-2) zur Verfugung. Bei jeder Probenahme kann somit die Sterilitat und der morphologische Zustand der Kultur beurteilt werden.

3.7.1.5 pH-Wert

Der pH-Wert der off-line Proben wird mit einem knick-Digital-pH-Meter gemessen, da somit eine Nachkalibrierung der pH-Elektrode im Fermenter moglich wird. Dies ist besonders im Hinblick auf die beobachtete Drift der benutzten pH-Elektroden wichtig, die mehr oder weniger stark nach erfolgter Sterilisation auftritt.

3.7.1.6 Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes

Aus dem im Medium enthaltenen Polysacchariden kann durch chemische und enzymatische Hydrolyse Glucose freigesetzt werden, die der Pilz verstoffwechseln kann. Deshalb wird nach vorher erfolgter enzymatischer Hydrolyse (Amyloglucosidase, Sigma) der Gesamtglucosegehalt im Kulturfiltrat nach der pHBAH-Methode /Klingspohn, 1990; Schmidt *et al.* 1985; Muni, 1976/ bestimmt.

Hydrolyse :	50µl	Probe (unverdunnt)
	100µl	Amyloglucosidaselsg.(10mg/ml)
	850 µl	destilliertes H ₂ O

Der Ansatz wird gut durchmischt und mindestens 60min bei 37°C inkubiert. Danach wird das Hydrolysat auf einen Glucosegehalt von 0,1 - 0,75g/l verdunnt. 100µl dieser Verdunnung werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1200µl des pHBAH-Reagenzes (siehe Anhang) versetzt, 10s auf einem Mixer geschuttelt und anschlieÙend 5min in einem Eppendorf-Thermostaten auf 95°C erhitzt.

Die Proben werden im Eisbad abgekühlt und die Extinktion bei 410nm (Halbmikroküvetten) gegen eine mitbehandelte Blindprobe gemessen. Die Zuordnung der Konzentration erfolgt über eine Standardreihe.

3.7.1.7 Phosphatbestimmung (Merck Spectroquant)

Die Phosphatbestimmung wird mit einem Test-Set der Firma Merck (Spectroquant P14848) durchgeführt. Die Arbeitsvorschrift wird entsprechend der vorliegenden Probevolumina minimiert.

Der Test beruht auf der Reaktion von Orthophosphat-Ionen mit Molybdat-Ionen, welche in schwefelsaurer Lösung Molybdat-Phosphorsäure bilden. Diese wird mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau reduziert, welches bei 712nm absorbiert.

Durchführung :

Die Proben werden auf einen Phosphorgehalt von 0,2 - 2,5mg/ml verdünnt (bidest. H₂O) und in einer Halbmikroküvette vorgelegt (1ml). Danach werden sie mit den im Set enthaltenen Reagenzien P-1A (Molybdat/Schwefelsäure) und P-2A (Ascorbinsäure) versetzt und gut durchmischt. Nach 15 min wird die Extinktion bei 712nm gegen eine Blindprobe gemessen. Die Konzentration kann über die dem Test-Set beiliegende Kalibrationsgerade ermittelt werden.

3.7.1.8 Ammoniumbestimmung nach DIN 38 406

Bei einem pH-Wert von ca. 12,5 reagieren Hypochlorit- und Salicylat-Ionen bei Gegenwart eines Katalysators (Dinatriumpentacyanonitrosylferrat) mit Ammonium-Ionen zu einem grünblauen Farbstoff. Die Hypochlorit-Ionen entstehen durch alkalische Hydrolyse aus Ionen der Dichlorisocyanursäure /DIN-Vorschrift 1983/. Aus dem Medium sind keine Störungen des Testes durch Fremdionen zu erwarten.

Die Proben werden auf einen Ammoniumgehalt von ca. 0,1 - 0,3mg/l verdünnt. 1ml der Verdünnung wird mit je 100µl der Reagenzlösungen A und B (siehe Anhang) versetzt. Die Ansätze werden gut durchmischt und mindestens 2 Stunden bei 25°C stengelassen. Anschließend wird die Extinktion bei 650nm in einer Halbmikroküvette gegen einen Blindwert gemessen. Die Konzentration kann aus einer parallel verarbeiteten Kalibrationsgerade bestimmt werden.

3.7.1.9 Produkt- und Precursoranalytik

Die Produkt- und Precursoranalytik wird mit dem schon vorher dargestellten automatisierten HPLC-System durchgeführt. Das System für die Produktanalytik besteht aus einem kühlbaren Rack, einem Autosampler (Gilson XL 222, abimed), Pumpe (Irica), Injektionsventil (Valco), Vorsäule, Trennsäule (Macherey und Nagel), Thermostat (Julabo), Zweikanal-UV-Detektor (Gynkotec), einem Interface zur Steuerung des Samplers und zur Datenaufnahme (CSI-Box) und einem PC (486 DX66), auf dem zur Meßdatenerfassung und -auswertung das Programm APEX-Chromatography Workstation (Autochrom inc. Version 2.11) installiert ist.

Die Verwendung des programmierbaren Autosamplers als Injektionsapparat macht die Verwertung großer Probezahlen möglich, da die Anlage längere Zeit - z.B. über Nacht - laufen gelassen werden kann. Die Proben können im kühlbaren Rack ohne meßbare Veränderungen bis zu 48 h gelagert werden

Zur Trennung der Substanzen wird eine nach dem Prinzip der Reversed-Phase-Chromatographie arbeitende, mit Nucleosil 5[®] C₁₈ gepackte Säule (Länge 12,5 oder 25cm) verwendet. Als Eluent wird ein wäßriger, methanolhaltiger Phosphatpuffer unter Zusatz von Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (siehe Anhang) eingesetzt. Der verwendete Zweikanal-UV-Detektor ermittelt die Absorptionsmaxima bei 260nm und 220nm, welche on-line mit APEX verfolgt werden können.

Die erforderlichen Standardsubstanzen (DAC, DAOC, Na-CPC, PenN) sind von der Hoechst AG, Frankfurt/Main (HMR) zur Verfügung gestellt worden.

Die Auswertung der aufgenommenen Chromatogramme erfolgte durch Integration der Peakfläche mit APEX. Später berechnete Ergebnisse - so z.B. die Produktbildungsraten, Raumzeitausbeuten etc. - sind mit dem Programm Origin 5.0 (MicroCal Software) durch Differenzierung der APEX-Daten nach der Zeit erstellt worden.

3.7.1.10 Aminosäure- und ACV-Analytik

Zur Bestimmung der Aminosäuren Asp, Glu, AAA, Asn, Ser, Tyr, Met, Val, Trp, Phe, Ile, Leu und Lys wird die Methode nach Cooper *et al.* /1984/angewendet, die bereits seit mehreren Jahren am Institut für Technische Chemie etabliert ist. Dabei werden die Zellfrei-Extrakt-Proben nach Entproteinierung mit Methanol und Verdünnung mit Boratpuffer direkt in die vom Autosampler (Pharmacia Biosystems) gesteuerte Vorsäulenderivatisierung mit OPA-Reagenz eingesetzt.

Für die spätere Auswertung wird ein Aminosäure-Standard mitgeführt, der aus dem AS-Standard Reagenz der Fa. Sigma besteht und dem zusätzlich AAA, Trp, Gln sowie ACV beigesetzt sind. Alle Inhaltsstoffe weisen eine Konzentration von 100mM auf.

Die Trennung der Aminosäuren Gln, His, Gly und Thr wird nach dieser Methode ebenfalls vorgenommen, unterliegt jedoch u.U. aufgrund des zunehmenden Anteils Antibiotika in den Proben einer Störung. Die Aminosäuren Arg und Ala werden in Abhängigkeit des Alters der Trennsäule unterschiedlich gut getrennt.

Für die Erfassung thiohaltiger Aminosäuren und Peptiden, wie Cys und ACV muß eine Quantifizierung nach Holzhauser-Rieger /1990/ durchgeführt werden. Danach werden die Proben reduziert und methyliert, wodurch allerdings Störpeaks anderer Qualität entstehen können, so daß zur Erfassung aller Aminosäuren eine Untersuchung der Proben nach beiden Methoden erfolgen muß.

Abbildung 3.6 zeigt ein typisches Chromatogramm. Es sind deutlich die Peaks von Cystein und ACV zu erkennen, die nur bei der reduzierten / methylierten Methode auftreten. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die durchgeführten Schritte zur Aminosäureanalytik

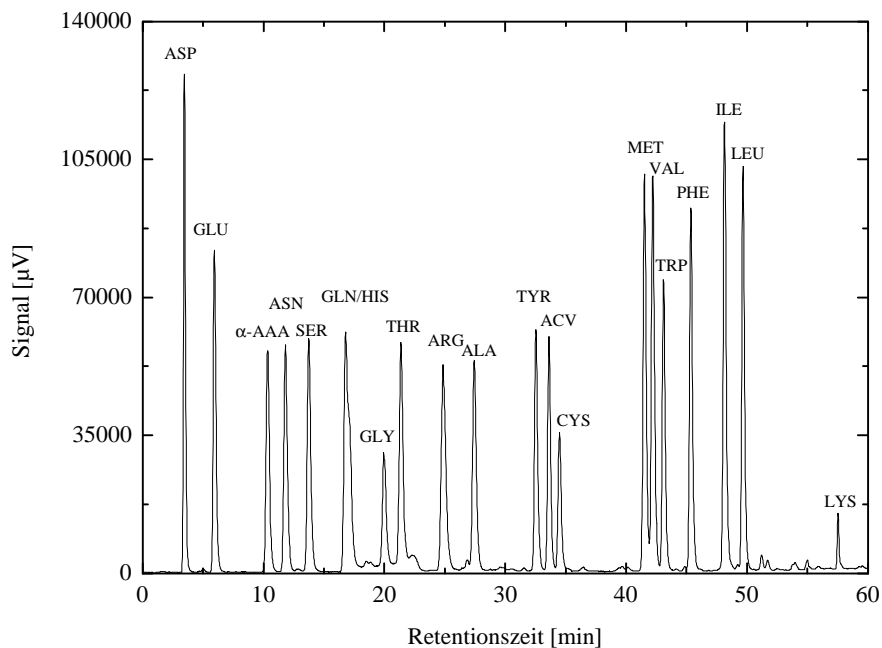


Abb. 3.6 : Chromatogramm eines reduzierten und methylierten Aminosäure-Standards

Material und Methoden

Arbeitsschritt	Beschreibung
<p>Probenvorbereitung für die native Messung</p>	<p><u>Zellfrei-Extrakt</u> entproteiniert mit MeOH (1+4), 10min auf 0°C, Zentrifugation (14.000 Upm, 2min)</p> <p><u>Probenverdünnung:</u> 1. für intrazelluläre Messungen keine, 2. für extrazelluläre Messungen 1:200 und 1:1000 mit Boratpuffer pH10,0</p> <p><u>AS-Standard-Verdünnung:</u> 1+3 mit Boratpuffer pH10,0 (25µM)</p>
<p>Probenvorbereitung für die red./meth. Messung</p>	<p><u>Zellfrei-Extrakt</u> entproteiniert mit MeOH (1+4), 10min auf 0°C, Zentrifugation (14.000 Upm, 2min)</p> <p><u>AS-Standard-Verdünnung:</u> 1+3 mit Boratpuffer pH10,0 (25µM)</p> <p><u>Reduktion/Methylierung:</u></p> <p>0,1ml Probe bzw. Standard +0,25ml Boratpuffer pH8,0 +0,05ml 20mM DTE +0,05ml 400mM Methyliodid in 50%MeOH +0,1ml 4M NaOH 10min Reaktion bei 20°C +0,1ml 4M HCl +0,35ml Boratpuffer pH10,0</p>
<p>Herstellung des OPA-Reagenzes</p>	<p>54mg o-Phtaldialdehyd in 1ml Ethanol +0,04ml Mercaptoethanol ad 10ml Boratpuffer pH9,5 24h altern lassen und bei 4°C lagern</p>

Material und Methoden

Derivatisierung	automatische Vorsäulenderivatisierung mit OPA-Reagenz Proben + OPA = 1+1 1,5min Reaktion bei RT 0,01ml Injektionsvolumen
Eluent A	17g Natriumacetat x 3H ₂ O +15g Natriumdihydrogenphosphat ad 2,5l bidest. Wasser +52ml Tetrahydrofuran +52ml MeOH
Eluent B	54%MeOH (mit bidest. Wasser)
Gradientensteuerung	durch Autochrom CIM Interface von 0% auf 50% Eluent B, linear in 55min 50% Eluent B 5min halten von 50% auf 0% Eluent B, linear in 5min 0% Eluent B 2min halten 67min Gesamtdauer 1ml/min Flußrate über Trennsäule Resolve™ C18, 90Å, 5µm (Waters); 3,9x150mm; bei 30°C
Detektion	Fluoreszenz, Ex=370nm, Em=420nm
Datenaufnahme	Autochrom CSI2 Interface
Auswertung	Apex Chromatographie-Software

Tab. 3.1 : Arbeitsschritte für die Bestimmung von Aminosäuren

3.7.1.11 Organische Säuren

Die Bestimmung von Pyruvat, Succinat, Lactat, Formiat und Acetat in einem Analysengang wurde mit Hilfe einer auf dem Prinzip der Ionenausschlußchromatographie basierenden HPLC-Anlage bestehend aus einem Entgaser (Gastorr GT-103), einer HPLC-Pumpe (Pharmacia LKB), einem Autosampler (Pharmacia LKB), einer Vorsäule (Shodex R Spak KC-LG), einer Trennsäule (Shodex R Spak KC-811), einem Wasserbad (Julabo U3) und einem UV-Detektor (Soma Optics LTD S-3702) durchgeführt. Zur Datenerfassung dient das auf einem PC installierte Chromatographie Datensystem Andromeda 1.6 der Firma Techlab.

Die zellfreien on-line Kultivierungsproben werden im Verhältnis 1:5 mit Perchlorsäure/Perchlorat versetzt, 48h kühl gelagert, 8min bei 6000Upm abzentrifugiert und vorsichtig dekantiert. Eine anschließende Lagerung von einer Woche bei -22°C und anschließender erneuter Zentrifugation sorgt für eine vollständige Entproteinierung.

Die so gewonnenen Proben können über den Autosampler in Injektionsvolumen zwischen 5 und 20µl auf das System aufgetragen werden.

Die organischen Säuren werden auf der aus Polystyrol/Divinylbenzol bestehenden Trennsäule bei einer Temperatur von 40°C mit einem aus 15mM Schwefelsäure bestehenden Eluenten (Fluß : 0,7ml/min) in 95min aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 205nm detektiert.

Die Auswertung der Chromatogramme und Zuordnung der Konzentrationen erfolgt über eine vorher vermessene Standardreihe, die jedesmal frisch angesetzt wird und somit eine gute Kalibration des Systems garantiert.

3.7.1.12. Bestimmung des Gelöstkohlenstoffgehaltes (DOC) - TOCOR

Eine wichtige Größe, um Bilanzierungen durchzuführen, ist der im Medium gelöste organische Kohlenstoff. Hier werden alle kohlenstoffhaltigen Verbindungen als Summenparameter detektiert und somit wird ein Einblick erhalten, wie hoch der Anteil der Substanzen ist, die durch die restliche Analytik nicht erfaßt werden. Durch einfache Differenzenbildung kann auf noch nicht meßbare Substanzen geschlossen werden.

Die Messung des DOC-Wertes (Dissolved Organic Carbon) erfolgt mit einem handelsüblichen TOCOR 3-Analysator (Fa. MAIHAK), der neben dem DOC auch den DIC-Wert (Dissolved Inorganic Carbon) mißt. Im TOCOR 3 wird der Kohlenstoff der gelösten organischen Verbindungen photochemisch durch das UV-Licht einer Hg-Niederdruckdampfampe vollständig zu CO₂ oxidiert.

Die entstehende CO₂-Konzentration wird von einem UNOR-Infrarot-Analysator in ein proportionales, elektrisches Signal umgewandelt. Der zeitliche Verlauf des Signals hat die Form eines Peaks. Die Peakfläche wird aufsummiert, und nachdem das Gerät mit einer Standardreihe (Prüflösung) kalibriert worden ist, kann über ein Digital-Voltmeter direkt der DOC bzw. DIC-Wert abgelesen werden. Eine weitere Möglichkeit ist das Auslesen der Daten über eine serielle Schnittstelle. Mit dem Programm Labtech Notebook kann der Peak optisch dargestellt und bearbeitet werden, so daß eine noch größere Reproduzierbarkeit gewährleistet ist.

Das zu analysierende Kultivierungsmedium (1ml) wird bei ausgeschalteter UV-Lampe in den Reaktor eingespritzt, welcher Schwefelsäure (pH 2 bis 2,5) enthält. Nach dem Einschalten der Begasung mit Sauerstoff wird innerhalb von 2min der anorganische Kohlenstoff als Carbonat ausgetrieben (DIC-Wert). Nach Erreichen der Nulllinie wird die UV-Lampe eingeschaltet und es findet die Oxidation innerhalb von 3 bis 12min statt.

Nach erneutem Rückgang auf die Nulllinie kann der Peak ausgewertet werden (DOC-Wert). Eine Verdünnung ist nur begrenzt notwendig, da durch Variieren der Probemenge ein großer Bereich abgedeckt wird. Die Angabe der Werte erfolgt in mg/l und wird über eine Standardreihe aus Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt.

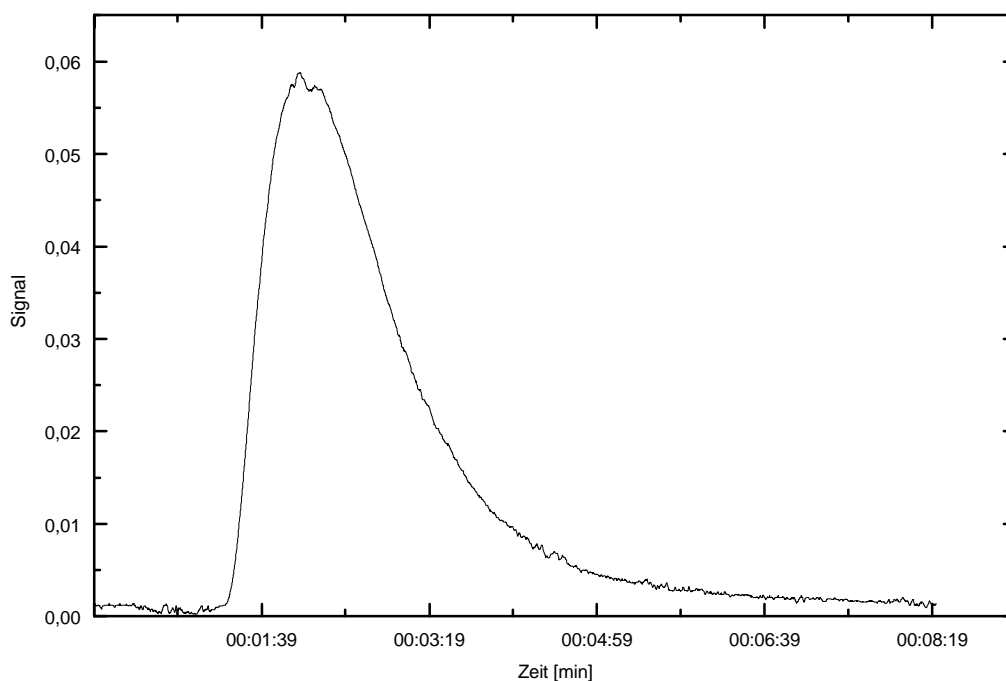


Abb. 3.7 : Typischer Verlauf der Oxidation des Kulturmediums mit dem TOCOR

3.7.2 Intrazelluläre Analytik

3.7.2.1 Zellaufschluß

Um reproduzierbare intrazelluläre Messungen zu garantieren, muß neben dem schnellen Abstoppen des Stoffwechsels auch die quantitative Zerstörung der Zellen gewährleistet sein. Dies ist in fast allen vorherigen Untersuchungen in Frage zu stellen, da sehr unterschiedliche morphologische Strukturen im Laufe einer Kultivierung auftreten. Nach Beyer /1996/ ist ein Zellaufschluß mit einer FrenchPress am vielversprechendsten, es konnten damals aber keine signifikanten Unterschiede zu Zellaufschlüssen mit Ultraschall nachgewiesen werden. Fahimi /1998/ zeigt im Rahmen einer Diplomarbeit jedoch, daß erhebliche Unterschiede in den Messungen auftreten können, je nachdem, welche Art des Aufschlusses verwendet wurde. Neben mechanischen Methoden (Ultraschall, Schwingmühle, Mörser) wird auch eine enzymatische Lyse durchgeführt. Die genaue Beschreibung der untersuchten Verfahren und angewendeten Kombinationen findet sich dort. Am effektivsten stellte sich der Zellaufschluß mit dem Mörser da, so daß dieser auch in den weiteren Untersuchungen angewendet wurde.

Je zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße werden mit den auf Eis aufgetauten Kultivierungsproben gefüllt und zentrifugiert (3500Upm, 2min, 2°C). Der Überstand wird bei 0°C aufbewahrt. Die Rückstände werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden mit einer Zange aufgeschnitten und der gefrorene Rückstand in einen handelsüblichen Feinmörser gedrückt. Der Mörser ist in einer Schaumstoffverkleidung mit Eis und flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Unter regelmäßiger Zugabe von flüssigem Stickstoff werden die Proben zermörsert. Es ist streng darauf zu achten, daß die Proben nicht während des Mahlvorganges auftauen, da sonst ein Verschmieren an der Mörserwand nicht zu verhindern ist. Anschließend wird das Zellpulver mit seinem Überstand wieder vereinigt. Nach der Zentrifugation (3500Upm, 3min, 2°C) können die intrazellulären Messungen durchgeführt werden.

3.7.2.2 RNA-Bestimmung nach Küenzi

Die RNA-Bestimmung orientiert sich an einer Vorschrift, die auf Küenzi *et al.* /1979/ zurückgeht. Dieses Verfahren beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten von DNA und RNA gegenüber Alkalihydroxiden. Die DNA kann danach nicht alkalisch hydrolysiert werden, weil ihr im Gegensatz zur RNA eine sekundäre Hydroxy-Gruppe fehlt. Durch eine pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich gehen die RNA-Monomere in Lösung. Dagegen bleiben die Proteine und die DNA unlöslich. Beim Absorptionsmaximum von 260nm läßt sich die RNA quantitativ erfassen. Um Trübungseffekte zu eliminieren, wird außerhalb der Absorptionsbande bei 320nm ebenfalls die Extinktion bestimmt.

Mittels einer RNA-Stammlösung aus *Torula utilis* wird im Vorfeld die optimale Verfahrensweise und Verdünnung ermittelt, bei der gemessen werden soll. Die Reproduzierbarkeit ist dabei ebenso sichergestellt worden, wie die Stabilität des RNA-Komplexes über mindestens 24h. Da es sich hier um eine quantitative Absolutmessung handelt, ist bei den weiteren Messungen auf das Mitführen eines Standards verzichtet worden.

Von den extra- und intrazellulären Probenüberständen werden jeweils 0,5ml entnommen und mit 2ml 0,3N KOH, bei 37°C, 1h inkubiert. Anschließend läßt man die Proben abkühlen und säuert sie mit 10N Perchlorsäure an (ca. 0,075ml), bis eine klare Lösung entsteht. Die ausgefallene DNA wird abzentrifugiert (3500Upm, 10min, RT) und der verbleibende Überstand mit 0,5N Perchlorsäure 1:50 verdünnt. Mittels einer Deuteriumlampe wird im Spektrometer bei 260nm und bei 320nm in einer Quarzküvette gemessen.

Aus der Differenz der beiden Extinktionswerte (E) ergibt sich die optische Dichte, aus der die Gesamtmenge an RNA berechnet werden kann:

$$OD_{Probe} = E_{260} - E_{320}$$

$$1 \text{ OD} = 33,3 \mu\text{g/ml RNA}$$

3.7.2.3 Probenvorbereitung für die HPLC

Für die Untersuchung an der HPLC ist es nötig, alle Probenüberstände durch Gelfiltration mit Sephadex[®]-Säulen nochmals aufzureinigen und von Glycerin zu befreien. Diese so gewonnenen Zellfrei-Extrakt-Proben können bis zur Messung auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Methode	Beschreibung	Material
Ultrazentrifugation	14.000 Upm, 3min, 2°C	Kühlzentrifuge (B. Braun Sigma 3K20)
Gelfiltration	Kühlraum, 4°C 1ml Probe einlaufen lassen +0,5ml Eluationspuffer +1ml Eluationspuffer insg. 1,5ml auffangen	<u>Sephadex[®] G25</u> Medium (NAP TM -10/ Pharmacia) <u>Eluationspuffer:</u> 50mM TRIS/HCl (pH 7,5) 10mM KCl 10mM MgSO ₄ 1mM DTT

Tab. 3.2 : Arbeitsschritte zur Probenvorbereitung

3.7.2.4 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Nach den Arbeiten von Tollnick /1996/ und Beyer /1996/ galt es, die eingeführten Analytiken als Routine zu etablieren, da sich der Aufwand für solche Messungen nur lohnt, wenn sich für jede durchgeführte Fermentation ein komplettes Enzymspektrum ergibt. Nur aus vollständigen Datensätzen können Aussagen über Engpässe und Strategien für Verbesserungsansätze gemacht werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt weiterhin auf dem postulierten Engpaß der Biosynthese des Cephalosporin C - der ACVS-Aktivität. Es konnte eine Routineanalytik für die Messung der ACVS- und der IPNS- Aktivität eingeführt werden. Probleme treten weiterhin bei der Messung der restlichen Enzymaktivitäten auf. Grundsätzlich ist die Messung der Hydroxylase- / Expandase - und der Acetyltransferase- Aktivität möglich, erfordert jedoch einen erheblichen chromatographischen Aufwand.

3.7.2.4.1 Proteaseinhibitoren

Ein großes Problem bei der Messung von intrazellulären Proteinen ist das Auftreten einer hohen Proteaseaktivität im Kulturmedium. Diese ist einerseits auf das aktive Ausschleußen der Protease zurückzuführen, andererseits auch auf die zunehmende Zellyse während einer Kultivierung. Genaue Untersuchungen und Aktivitätsspektren finden sich bei Bäckermann /1996/.

Die hohe Proteaseaktivität erschwert es erheblich, geringe Konzentrationen in Enzymassays und anderen Protein relevanten Tests quantitativ zu charakterisieren. Gerade im Hinblick auf die sehr niedrige ACVS-Aktivität mußte ein Weg gefunden werden, um die Proteaseaktivität im Testansatz niedrig zu halten.

Hierzu wurden schon dem Aufschlußpuffer Proteaseinhibitorcocktails zugesetzt, um ein breites Spektrum abzudecken. Desweiteren wurden zahlreiche Tests mit alten Aufschlußproben durchgeführt, um den effektivsten Inhibitor zu finden. Es sind mehrere der gängigen Proteaseinhibitoren getestet wurden.

Inhibitor	Proteasen
EDTA	Metalloproteasen
PMSF/Pefabloc	Serinproteasen
Leupeptin	Serin-,Cysteinproteasen
Pepstatin	Aspartinproteasen
Bestatin	Aminopeptidasen
E64	Cysteinproteasen
Complete	alle genannten

Tab. 3.3 : Verwendete Proteaseinhibitoren

In den Tests zeigte sich, daß - im Hinblick auf die wichtige ACVS-Aktivität - der Einsatz von Pepstatin mit EDTA die effektivste Hemmung brachte. In der nachstehenden Graphik ist die relative Peakfläche gegen die eingesetzten Inhibitoren aufgetragen und gibt somit - bei genau gleicher Behandlung der Probe - Aufschluß über die gebildete Menge an ACV und somit bei vorausgesetzter gleicher Aktivität des Enzyms die beste Inhibitorleistung.

Ein nicht zu charakterisierendes Problem ist jedoch, daß nicht genau gesagt werden kann, inwieweit eine Überkonzentration der Inhibitoren sich negativ auf die Aktivitäten der einzelnen Enzyme auswirkt.

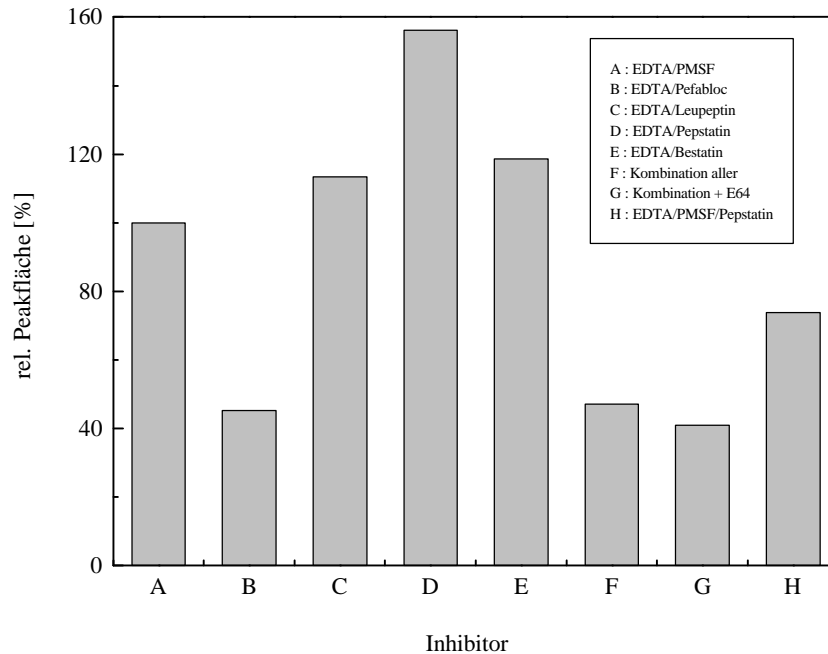


Abb. 3.8 : Relative Peakfläche der ACV-Konzentration

3.7.2.4.2 ACV-Synthetase (ACVS)

Die Messung der Enzymaktivität von ACV-Synthetase geht auf Banko /1986/ zurück. Dem Testansatz sind zusätzlich Serin-Protease-Inhibitoren PMSF und EDTA zugesetzt, um Nebenaktivitäten der IPNS zu verhindern. Diese Methode geht auf Beyer /1996/ zurück und wird hier, trotz der z.T. bereits im Aufschlußpuffer der Proben enthaltenen Inhibitoren, ebenfalls angewandt, um einen optimalen Vergleich zu ermöglichen. Alle Substanzen werden, wenn nicht anders angegeben, in 50mM TRIS/HCl (pH 7,5) gelöst. Die folgenden Tabelle stellt die Arbeitsschritte übersichtlich dar.

Verarbeitungsschritte	Anmerkungen
0,05ml 50mM AAA +0,01ml 50mM Cys +0,05ml 50mM Val +0,008ml 200mM DTT 5min Reaktion bei 25°C	neutral. mit 0,5µl/mg AS 4N NaOH neutral. mit 0,5µl/mg AS 4N NaOH neutral. mit 0,5µl/mg AS 4N NaOH
+0,025ml 200mM Magnesiumsulfat +0,132ml 50mM TRIS/HCl (pH7,5) +0,05ml 100mM ATP +0,02ml 25mM EDTA +0,005ml 100mM PMSF +0,15ml Zellfrei-Extrakt 0min bzw. 60min Reaktion bei 25°C	neutral. (1,3µl/mg 4N NaOH); immer frisch! in 2-Propanol lösen
+1ml MeOH	eiskalt; zum Abstoppen der Reaktion

Tab. 3.4 : Testansatz für die Bestimmung der ACVS-Aktivität

Die Quantifizierung der ACV erfolgt nach der reduziert/methylierten Methode der Aminosäure-HPLC .

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt in Units/g(Protein). Dabei werden die durch den Bradford-Test ermittelten Proteinwerte verwendet:

$$U_{\text{spez}} (\text{ACVS}) = [\Delta n_{\text{ACV}} \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot 1000] / [M_{\text{ACV}} \cdot 60\text{min} \cdot n_{\text{Prot}}]$$

Δn_{ACV} = Stoffmengendifferenz zw. 60min- und Nullproben in mg/ml

M_{ACV} = 363,44 g/mol

n_{Prot} = gemessene Proteinmenge aus Bradford in mg/l

Da die Enzymeinheit in $\mu\text{mol}/\text{min}$ angegeben wird, muß der Faktor $1000 \cdot 1000$ eingeführt werden, um die ACV-Stoffmenge in μmol umzurechnen. Außerdem muß eine Umrechnung der Proteinkonzentration aus der Bradfordmessung in g/l erfolgen, wodurch ein zusätzlicher Faktor 1000 notwendig ist.

3.7.4.2.3 Isopenicillin N-Synthetase (IPNS)

Die Bestimmung der Enzymaktivität von IPNS erfolgt nach der Vorschrift von Kupka *et al.* /1983/. Dabei kann nicht zwischen der gebildeten Menge an Penicillin N und Isopenicillin N unterschieden werden. Es wird daher der Summenpeak aus den beiden Produkten ausgewertet. Diese Vereinfachung ist zulässig, wenn von einer vernachlässigbaren Menge gebildeten Penicillin N ausgegangen wird, so daß die Vergrößerung des Peaks als alleiniges Ergebnis der Isopenicillin N-Produktion gedeutet wird. Als Standard wird eine Penicillin N-Probe mit $1\text{mg}/\text{ml}$ mitgeführt, die freundlicherweise von der Fa. Hoechst AG Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt wurde. Alle Substanzen sind, wenn nicht anders angegeben, in 50mM TRIS/HCl (pH 7,5) gelöst.

Verarbeitungsschritte	Anmerkungen
0,01ml 6,25mM bis-ACV +0,008ml 60mM DTT 15min Reaktion bei 25°C	neutralisieren
+0,01ml 10mM Eisensulfat +0,05ml 100mM KCl +0,05ml 100mM Magnesiumsulfat +0,034ml 10mM Ascorbinsäure +0,288ml 50mM TRIS/HCl (pH 7,5) +0,05ml Zellfrei-Extrakt bzw. Standard 0min bzw. 20min Reaktion bei 25°C	in bidest. Wasser gelöst neutralisieren
+1ml MeOH	eiskalt; zum Abstoppen der Reaktion

Tab. 3.5 : Testansatz für die Bestimmung der IPNS-Aktivität

Material und Methoden

Die Quantifizierung des IPN bzw. PEN erfolgt nach einer Methode für die gesamte Produkt- und Zwischenprodukt-Bestimmung der Fermentationen, die am Institut für Technische Chemie entwickelt wurde. Hiernach erfolgt die Detektion von PENN/IPN bei 220nm. Zur genauen Lokalisierung des Peaks wurden Vorfelduntersuchungen mit Testansätzen aus PENN, DTT und ACV durchgeführt. Diese ergaben die Notwendigkeit, die Flußrate auf 1,5ml/min zu reduzieren, um eine gute Trennung des PENN/IPN-Peaks vom DTT-Peak zu gewährleisten. Die folgende Übersicht zeigt die Spezifikationen der Methode.

Eluent	4,37g Natriumdihydrogenphosphat +6,99g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat ad 2l bidest. Wasser + 100ml MeOH
Trennsäule	Nucleosil 100 5 C ₁₈ (Macherey-Nagel, Düren);
125mm	
Flußrate	1,5ml/min
Dauer	40min
Temperatur	30°C
Injektionsvolumen	5µl
Detektion	UV 220nm (Gynkotek)

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt in Units/g(Protein). Dabei werden die durch Bradford-Test ermittelten Proteinwerte verwendet:

$$U_{\text{spez}} (\text{IPNS}) = [\Delta n_{\text{IPN}} \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot 1000] / [M_{\text{IPN}} \cdot 20\text{min} \cdot n_{\text{Prot}}]$$

Δn_{IPN} = Stoffmengendifferenz zw. 20min- und Nullproben in mg/ml

M_{IPN} = 359,4 g/mol

n_{Prot} = gemessene Proteinmenge aus Bradford in mg/l

3.7.4.2.4 Deacetoxycephalosporin C-Synthase (Expandase)/-Hydroxylase

Die durchgeführten Testansätze gehen auf die Vorschriften von Jensen *et al.* /1985/ zurück und wurden von Beyer /1996/ modifiziert. Die genaue Beschreibung ist dort zu finden. Der Expandase-Aktivitätstest erfolgt in 1,5ml Reaktionsgefäßen mit in TRIS-Puffer gelösten Substraten und Kofaktoren und ist grundsätzlich für Parallelbestimmungen geeignet. Der Hydroxylase-Aktivitätstest erfolgt nach der gleichen Verfahrensweise, jedoch mit einer DAOC-Stammlösung anstelle der Penicillin N-Stammlösung. Die schon von Beyer beobachteten, aufgetretenden Probleme konnten auch in dieser Arbeit nicht vollständig beseitigt werden. So erschwert der Einsatz der Proteaseinhibitoren die Lokalisierung und Quantifizierung des Penicillin N-Peaks und es treten weiterhin die Störpeaks durch Methanol und durch die eingesetzten Kosubstrate auf. Es konnten jedoch einige wertvolle Messungen durchgeführt werden, was man jedoch nicht als Routineanalytik bezeichnen kann. Erheblichen Einfluß auf die Durchführung dieses Aktivitätstests hat das Säulenmaterial und die Qualität des Eluenten. Beides sollte möglichst neu bzw. frisch angesetzt sein. Desweiteren kann man durch Variieren der Flußgeschwindigkeit zwischen 1 und 2,5 ml/min zu besseren Auftrennungen kommen, was allerdings zahlreichen Probenverschleiß mit sich bringt.

Verarbeitungsschritte	Anmerkungen
Stammlösung : Einsatz 0,4 ml 0,413ml 100mM KCl +0.13ml 100mM MgSO ₄ +0.022ml 10mM FeSO ₄ +0,154ml 100mM Ascorbinsäure +0,22ml 25mM α-Ketoglutarat +0,154ml 10mM PenN bzw. 10mM DAOC +3,025ml 50mM TRIS/HCl (ph 7,5) +0,055ml 100mM PMSF +0,1 ml Zellfreiextrakt 25 min inkubieren	gelöst im dest. H ₂ O neutralisiert ! neutralisiert ! gelöst in 2-Propanol
+1ml MeOH	eiskalt, Abstoppen der Reaktion

Tab. 3.6 : Testansatz für die Bestimmung der Expandase/Hydroxylase-Aktivität

Material und Methoden

Die chromatographische Analyse findet nach der Produktmethode unter variierenden Flußgeschwindigkeiten statt.

Zur Berechnung spezifischer Expandase-Aktivitäten wurde die im Reaktionsansatz gebildete Menge an DAOC und DAC auf die Inkubationsdauer (25min) sowie auf das im Ansatz vorliegende Protein bezogen, eventuelle Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

$$U_{\text{spez}}(\text{Expandase}) = [\Delta n_{(\text{DAOC}+\text{DAC})}] / [M_{(\text{DAOC}+\text{DAC})} \cdot 25 \cdot n_{\text{Prot}}]$$

$\Delta n_{(\text{DAOC}+\text{DAC})}$ = Stoffmengendifferenz zw. 20min- und Nullproben in mg/ml

$M_{(\text{DAOC}+\text{DAC})}$ = 754,29 g/mol

n_{Prot} = gemessene Proteinmenge aus Bradford in mg/l

Zur Berechnung spezifischer Hydroxylase-Aktivitäten wurde die im Reaktionsansatz gebildete Menge an DAC auf die Inkubationsdauer (25min) sowie auf das im Ansatz vorliegende Gesamtprotein bezogen.

$$U_{\text{spez}}(\text{Hydroxylase}) = [\Delta n_{(\text{DAC})}] / [M_{\text{DAC}} \cdot 25 \cdot n_{\text{Prot}}]$$

$\Delta n_{(\text{DAC})}$ = Stoffmengendifferenz zwischen 20min- und Nullproben in mg/ml

$M_{(\text{DAC})}$ = 385,13 g/mol

n_{Prot} = gemessene Proteinmenge aus Bradford in mg/l

3.7.4.2.5 Deacetylcephalosporin C-Acetyltransferase (Acetyltransferase)

Die Aktivitäten der AcetylCoA-Deacetylcephalosporin C Acetyltransferase wurden nach einer von Matsuyama *et al.* /1992/ entwickelten Methode bestimmt. Der Aktivitätstest wird mit einem Gesamtvolumen von 0,1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Verarbeitungsschritte	Anmerkungen
Stammlösung : Einsatz 0,09ml 0,836ml 100mM TRIS/HCl (pH7,5) +0,044ml 100mM MgSO ₄ +0,055ml 50mM DAC +0,055ml 100mM AcetylCoA +0,01ml Zellfreiextrakt 20min inkubieren bei 25°C	neutralisiert !
0,2ml MeOH	eiskalt zum Abstoppen der Reaktion
10min lagern und abzentrifugieren (15000upm)	Entproteinierung

Tab. 3.7 : Testansatz für die Bestimmung der Acetyltransferase-Aktivität

Zur Berechnung spezifischer Acetyltransferase-Aktivitäten wurde die im Reaktionsansatz gebildete Menge an Cephalosporin C auf die Inkubationsdauer sowie auf das im Ansatz vorliegende Gesamtprotein bezogen.

$$U_{\text{spez}}(\text{Acetyltransferase}) = [\Delta n_{(\text{CPC})}] / [M_{(\text{CPC})} \cdot 20 \cdot n_{\text{Prot}}]$$

$\Delta n_{(\text{CPC})}$ = Stoffmengendifferenz zw. 20min- und Nullproben in mg/ml

$M_{(\text{CPC})}$ = 415,2 g/mol

n_{Prot} = gemessene Proteinmenge aus Bradford in mg/l

4. Ergebnisteil

4.1 Kultivierungen in komplexen Medien

Die Kultivierungen im komplexen Medium werden in erster Linie zur Produktivitätssteigerung des verwendeten Hochleistungsstammes von *Acremonium chrysogenum* durchgeführt und sollen möglichst gleichzeitig Aufschluß über eventuelle Engpässe in der Biosynthese des Cephalosporin C bzw. über Produktivitätsgrenzen geben. Die gewählten Medienkompositionen liegen nahe an der Zusammensetzung des in der Industrie verwendeten Kulturmediums, um somit alle erhaltenen Ergebnisse einfacher übertragen zu können. Es werden zahlreiche Kultivierungen im 30L-Maßstab durchgeführt, deren Medienzusammensetzungen im Anhang zu finden sind. In den Arbeiten von Tollnick /1996/ und Beyer /1996/ sind mehrere Hypothesen aufgestellt worden, die genügend Ansatzpunkte geben, um eine weitere Verbesserung der Produktivität durch gezielte Medienzusammensetzungen zu erreichen. So ist deutlich zu erkennen, daß die aktive Produktionsphase in den verwendeten Medien relativ früh abgeschlossen war (nach ca. 90-100h, Seidel /1996/) und sich danach im Kulturmedium hauptsächlich Nebenprodukte anhäuferten. Nachdem gezielte Glucosezufütterungsexperimente zur Verlängerung der Produktionsphase durchgeführt worden sind, werden die in der Biosynthese des Cephalosporin C benötigten Aminosäuren genauer betrachtet. Da nach Beyer /1996/ zwar alle Aminosäuren intrazellulär in ausreichender Menge vorliegen, zeigten die Aufnahmeraten der extrazellulären Aminosäuren einen starken Bedarf an leicht zu metabolisierenden (L-Alanin) und zudem für die Produktbiosynthese direkt zu verwertenden Aminosäuren (L-Valin, L-Serin).

Als erstes wird ein Überblick über den Verlauf einer charakteristischen Kultivierung gegeben, die stellvertretend für alle durchgeführten Fermentationen in den mit Aminosäuren versetzten Medien steht. Der Verlauf der dargestellten Kultivierungsparameter kann für *Acremonium chrysogenum* in komplexen Medien dieser Art verallgemeinert werden, da durch Variation der Aminosäurezusammensetzung im Medium kaum Änderungen im zeitlichen Verlauf der Kultivierung - vor allem des Wachstums - nachzuweisen waren. In Hinblick auf die Produktion des Cephalosporin C stellten sich jedoch interessante Zusammenhänge heraus. Diese Unterschiede werden in späteren Kapiteln dargestellt, so daß im folgenden nur der Verlauf der Produktkonzentrationen betrachtet wird.

4.1.1 Charakteristischer Kultivierungsverlauf - Wachstumsparameter

Die Kultivierungen mit dem A3/2-Stamm von *Acremonium chrysogenum* zeigen einen einheitlichen Verlauf (Abb. 4.1). Der pH-Wert fällt nach dem Durchlaufen eines kleinen Maximums innerhalb der ersten 40 Stunden steil ab. Bei Erreichen des pH-Wertes von 5,75 setzt die Regelung ein, die den Wert konstant zwischen 5,8 und 6 hält. Der Ammoniakverbrauch dient als zusätzlicher Beobachtungspunkt, da er immer ähnlich erfolgt und somit Aufschluß über den Stand der Kultivierung gibt. Zum Ende der Kultivierung ist immer ein kurzer Anstieg des pH-Wertes zu verzeichnen, der auf die zunehmende Zellyse zurückzuführen ist. Zu diesem Zeitpunkt wird folglich auch kein Ammoniak mehr verbraucht. Der pO_2 -Wert fällt mit zunehmender Biomasse proportional ab und erreicht nach 60-70 Stunden die 60%-Grenzmarke, bei der die Regelung mit Preßluft und - bei Bedarf - Sauerstoff einsetzt. Auf diese Weise wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung garantiert. Die hier gezeigte NAD(P)H-Fluoreszenz wird eine zeitlang als Überwachungsmethode eingesetzt, dann aber durch die 2D-Fluoreszenz-Spektrometrie ersetzt. Zusätzlich ist das Fütterungsprofil für das Sojaöl dargestellt, aus dem deutlich wird, daß eine den Bedürfnissen des Pilzes angepaßte Dosierung gewählt wurde, d.h. die Sojaölzudosierung wird dem Biomassezuwachs mengenmäßig angepaßt.

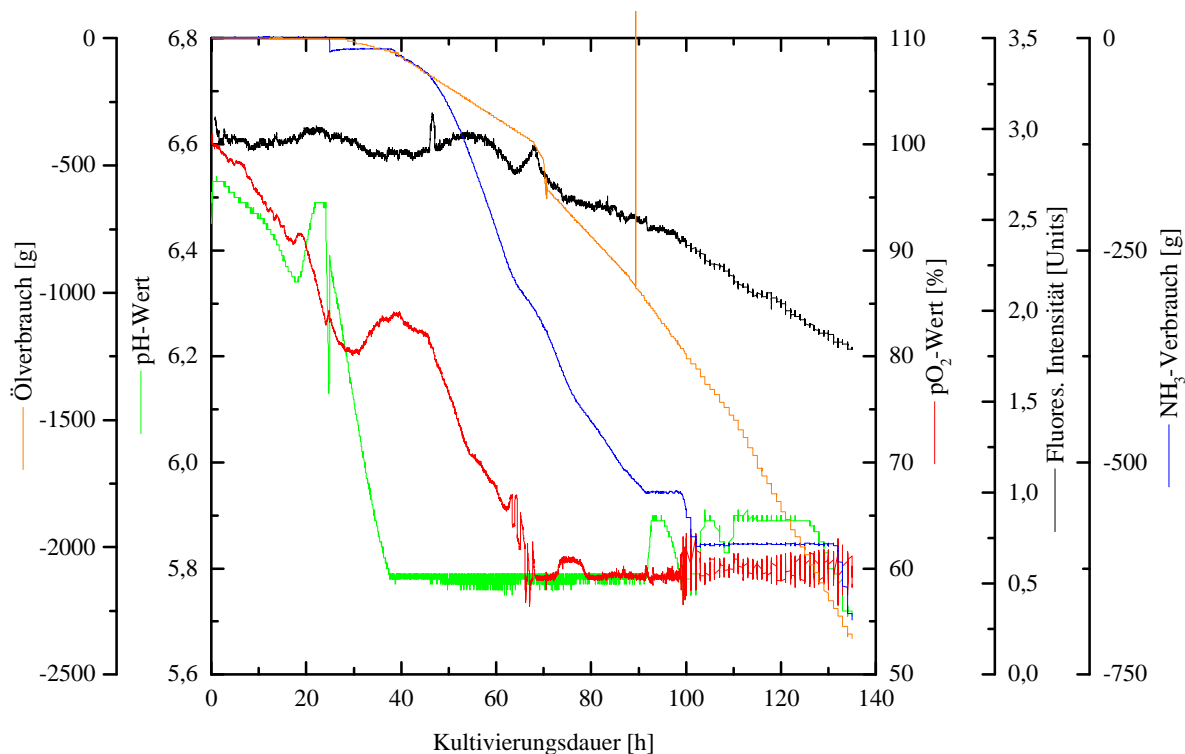


Abb. 4.1: Kultivierungsparameter (pH- und pO_2 - Wert, Öl- und Ammoniakverbrauch sowie die Fluoreszenzintensität)

Die off-line gemessenen Standardwerte für die extrazellulären NH_4^+ - und PO_4^{3-} -Konzentrationen sowie der Gesamtzuckergehalt zeigen das klassische Bild, wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist. In der exponentiellen Wachstumsphase des Pilzes werden aufgrund der Glucose-6-Phosphat-Synthese in der Zelle sowohl Zucker und Phosphat parallel aufgenommen und verstoffwechselt. Nach ca. 60 Stunden ist der Zucker verbraucht und es erfolgt die Umstellung auf andere Kohlenstoffquellen, wobei immer ein nicht verstoffwechselbarer Restanteil an Oligo- und Polysacchariden zurückbleibt. Zu dieser Zeit wird auch verstärkt Ammonium aufgenommen. Mit zunehmender Zellyse steigt die Phosphatkonzentration wieder an, während die Ammoniumkonzentration nahezu konstant bei 0,3g/l liegt und somit bewußt niedrig gehalten wird, um eventuellen Hemmechanismen in der Cephalosporin C-Biosynthese vorzubeugen.

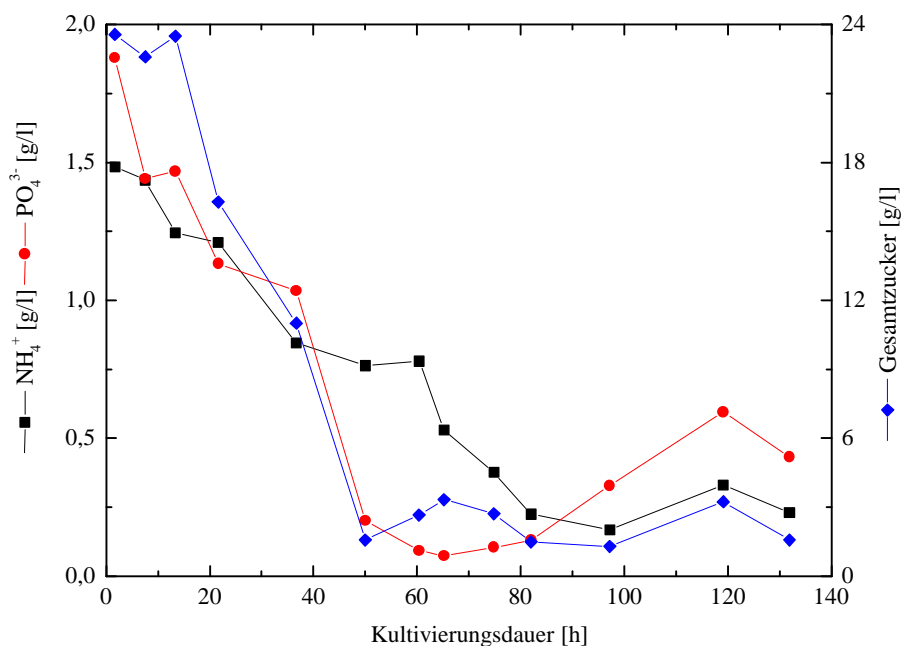


Abb. 4.2 : Ammonium-, Phosphat- und Gesamtzuckergehalt

Im komplexen Medium ist die Kontrolle des Wachstums bzw. die Bestimmung der Zellzahl ein großes Problem, da anhaftende Medienpartikel Meßwerte, wie z.B. die Biotrockenmasse verfälschen. Daher wird zur on-line Beobachtung die Kohlendioxidproduktionsrate (CPR) als Parameter für das Wachstum verwendet. In der folgenden Abbildung 4.3 sind anhand ihres Verlaufes, deutlich die unterschiedlichen Wachstumsphasen zu erkennen.

Nach einer kurzen Lagphase von ca. 10 Stunden folgt die exponentielle Wachstumsphase. Nach 20 Stunden ist die freie Glucose verbraucht und es folgt die Verstoffwechslung der komplexeren Zucker, die zunächst durch Amylasen gespalten werden müssen. Anschließend muß sich der Pilz auf Sojaöl als Kohlenstoffquelle umstellen (nach ca. 60 Stunden), was zunächst die Synthese von Lipasen bedeutet. Das typische diauxische Wachstum ist gut zu erkennen. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Sauerstofftransferrate (OTR). Nach Umstellen des Stoffwechsels auf Sojaöl sollte eigentlich eine stationäre Wachstumsphase zu erkennen sein, dies ist allerdings nur bedingt zu beobachten, was an einer Überdosierung des Sojaöls liegt. Hier wird auch der Vorteil deutlich, den eine on-line Sojaölbestimmung mit sich bringen würde. Durch die verzweigten Stoffwechselwege und komplexen Spaltprozesse der Sojaölverwertung kann auch der RQ-Wert keinen sinnvollen Aufschluß über den Zustand der Zellen geben. Er liegt in der Regel zwischen 0,4 und 0,7, was auf eine nicht optimale Respiration schließen läßt. Zusätzlich sind die Begasungsdaten aufgeführt, die verdeutlichen sollen, daß mit Beginn der Sojaölverstoffwechslung die Viskosität des Mediums stark zunimmt und somit die Gelöstsauerstoffkonzentration abnimmt, wenn nicht zusätzlich mit Sauerstoff begast würde. Die hohe Viskosität des Mediums ist zum einen auf die seifenartigen Spaltprodukte des Sojaöls, zum anderen auf die morphologischen Änderungen des Pilzes (Bildung von geschwollenen Hyphen und Arthrosporen) zurückzuführen.

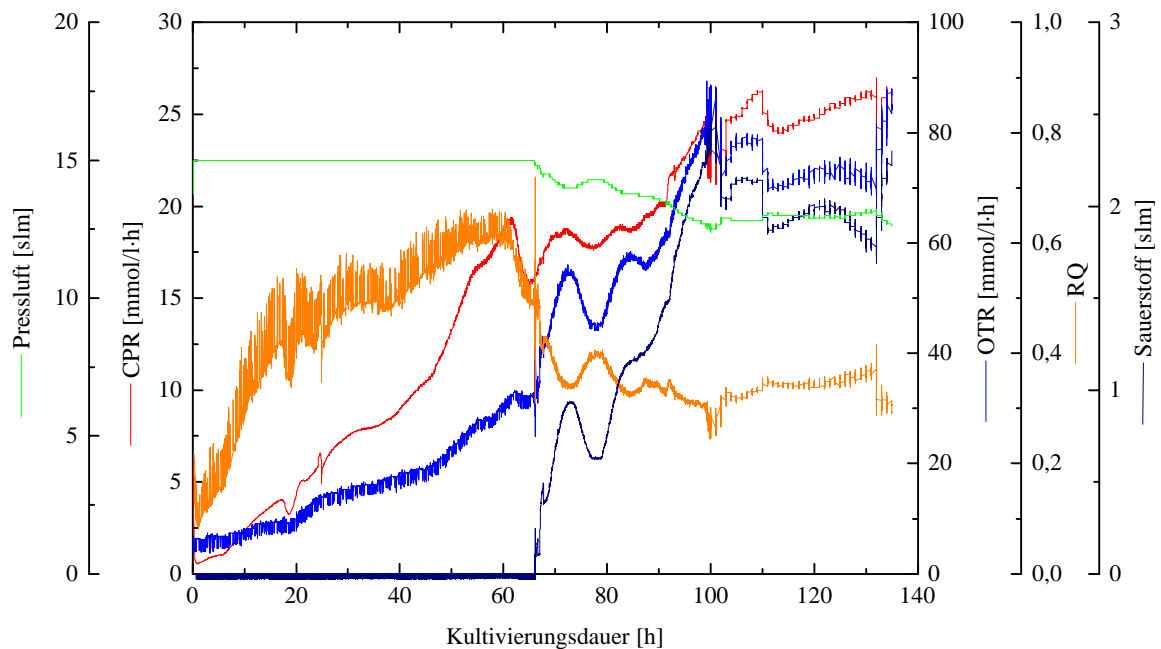


Abb. 4.3 : CPR, OTR, RQ und Begasung im komplexen Medium

Bei der Betrachtung der off-line gemessenen Werte für Sediment, Biofeucht- und Biotrockenmassen wird wiederum deutlich, daß aus diesen Daten nicht direkt auf die Zellmasse zurückgeschlossen werden kann. Auch wenn in allen Verläufen die typischen Wachstumsphasen auszumachen sind, so ist doch der Fehler der Feuchtigkeit bzw. der mitgetrockneten Festkörperpartikel zu groß, um quantitative Betrachtungen durchzuführen. Trotzdem kann die Biotrockenmasse als aussagekräftiger Wert für qualitative Fermentationskontrollen benutzt werden, da der Verlauf über alle durchgeführten Kultivierungen ähnlich und vor allem reproduzierbar ist.

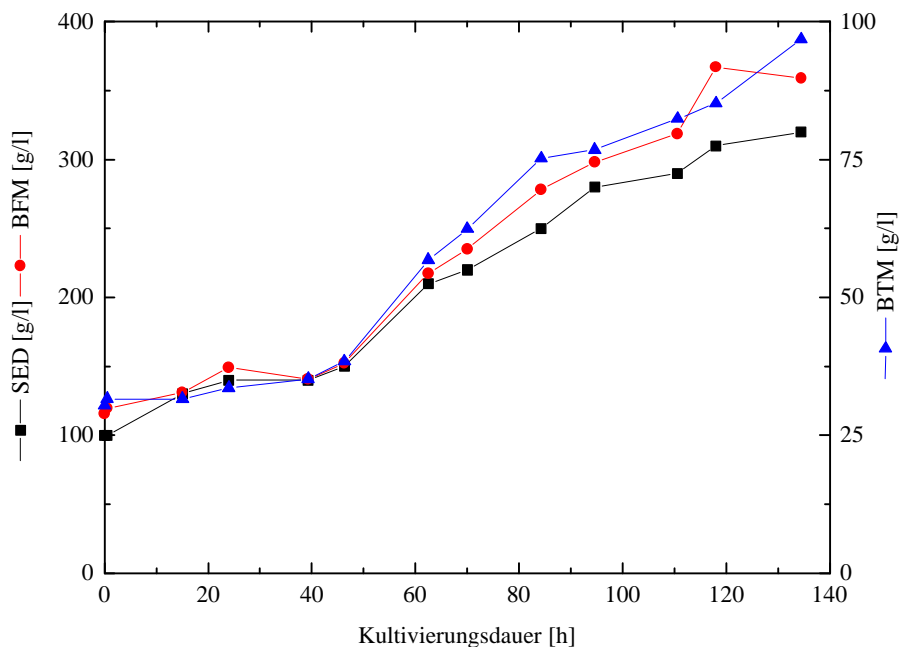


Abb. 4.4 : Sediment, Biofeucht- und Biotrockenmasse im komplexen Medium

Es lag folglich nahe, nach weiteren Biomasseparametern zu suchen, die direkt Aufschluß über Anzahl und Zustand der vorhandenen Zellen geben. Neben der Messung von Proteingehalten und des Gesamt-DNA-Gehaltes findet vor allem die RNA-Bestimmung Beachtung. Schon Kuenzi *et al.* /1979/ nutzten diese Methode zur Quantifizierung der Zellaktivität und auch in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Medien stellte sich die Methode als am besten geeignet heraus. Abbildung 4.5 zeigt die gute Korrelation der RNA-Werte mit der Biotrockenmasse und dem Proteingehalt. Da die mit dieser Methode bestimmte einsträngige RNA hauptsächlich in aktiven Zellen vorliegt, kann über diesen Wert eine Aussage über die tatsächliche Zellaktivität getroffen werden.

Es wird auch deutlich, daß zuvor getätigte Aussagen, die die Biotrockenmasse zur Grundlage haben, nicht als falsch anzusehen sind, da eine Umrechnung durchaus akzeptabel wäre.

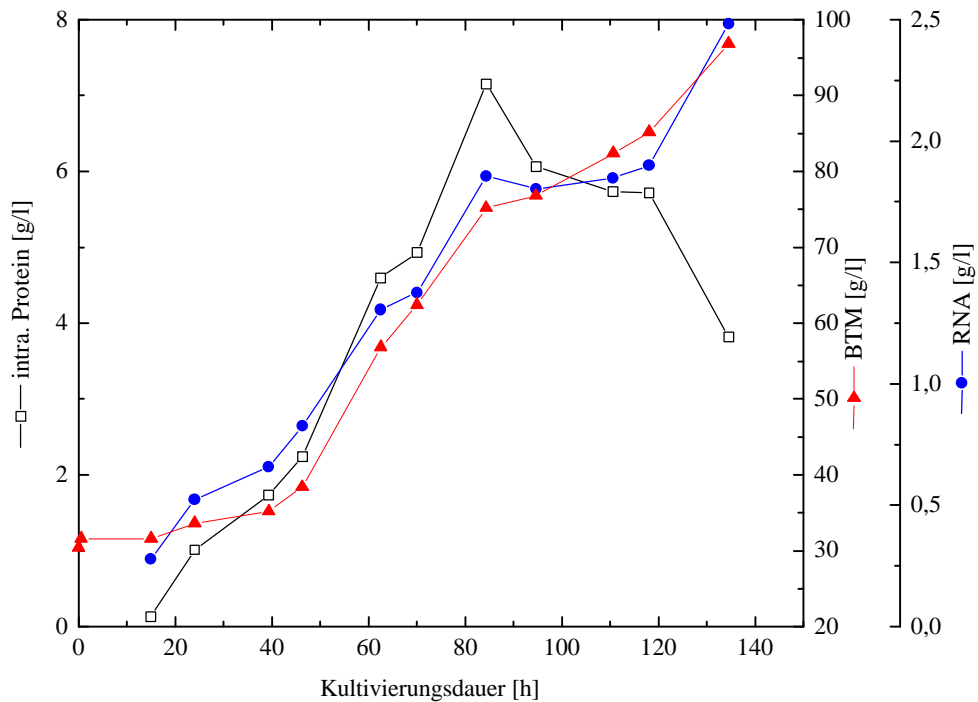


Abb. 4.5 : Intrazellulärer Proteingehalt, RNA und Biotrockenmasse in komplexen Medien

4.1.2 Betrachtung der extrazellulären Aminosäuren

In den folgenden Abbildungen 4.6 und 4.7 werden die typischen Verläufe der wichtigsten extrazellulären Aminosäuren für *Acremonium chrysogenum* dargestellt. Aminosäuren bilden einen entscheidenden Kreuzungspunkt zwischen anabolen und katabolen Reaktionen, so nimmt der Pilz sehr schnell die leicht verstoffwechselbare Aminosäure L-Alanin auf. L-Alanin kann auf einfachem Wege durch die Alanin-Aminotransferase in Pyruvat umgewandelt werden und stellt somit eine gute Energiequelle zu Beginn des Wachstums dar. Das dabei verbrauchte α -Ketoglutarat wird durch die Glutamat-Dehydrogenase zurückgewonnen. Es ergibt sich folgende Bilanz :



Wie im Theorieteil aufgeführt spielt α -Ketoglutarat in der Cephalosporin C-Biosynthese eine Rolle als Kofaktor, so daß neben der positiven Wachstumsbeeinflussung des Pilzes durch L-Alanin, auch auf eine mögliche Stimulierung der Biosynthese geschlossen werden kann.

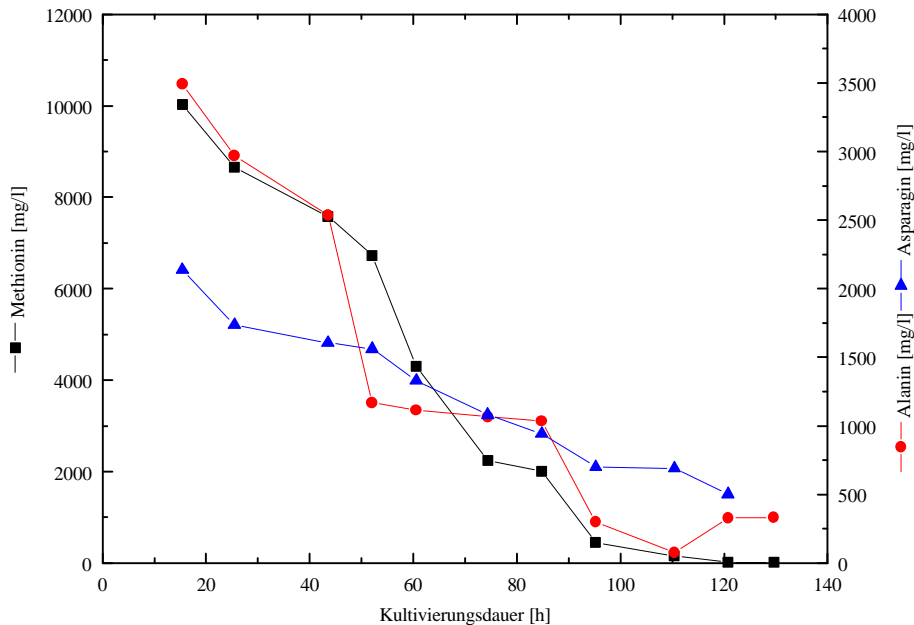


Abb. 4.6 : Verlauf der extrazellulären Methionin-, Alanin- und Asparaginkonzentrationen

Da es sich bei dem verwendeten A3/2-Stamm um einen Methionin abhängigen Stamm handelt, wird dem Medium diese Aminosäure in hoher Konzentration zugesetzt (max. 11g/l). Nach Matsumura *et al.* /1980/ stimuliert Methionin sowohl direkt die Cephalosporin C-Synthese als auch die als notwendig für die Produktion postulierte morphologische Veränderung zur Arthrospore. Tollnick /1996/ zeigte jedoch, daß der A3/2-Stamm auch ohne Methioninzusatz zur Produktion fähig ist und morphologische Betrachtungen zeigten, daß eine ausreichende Produktion auch ohne Arthrosporenbildung erreicht werden kann /Seidel 1996/. Wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, wird das zugesetzte Methionin in den ersten 90 Stunden der Kultivierung zügig aufgenommen und ist folglich zu Beginn der Produktionsphase nahezu vollständig verbraucht. L-Alanin wird ein wenig schneller aufgenommen, während das zugesetzte L-Asparagin langsamer verstoffwechselt wird. In früheren Kultivierungen wurde dem Medium Arginin zugesetzt, welches sich allerdings als nicht optimal herausstellte, da es im Laufe einer Kultivierung aktiv von *Acremonium chrysogenum* ausgeschieden wird und danach nur unter extremen Bedingungen als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle herangezogen wird.

L-Alanin kann zu Beginn einer Kultivierung somit als die bevorzugte Aminosäure angesehen werden.

Da der Stamm auch den Weg der Sulfatreduktion beschreiten kann, liegt es nahe, die Aminosäure L-Serin dem Medium zuzusetzen. Diese Aminosäure liegt üblicherweise intra- wie extrazellulär in sehr geringen Konzentrationen vor und wurde noch nicht mit der Biosynthese des Cephalosporin C in Verbindung gebracht, da ihr eine untergeordnete Rolle zugedacht wird. Allerdings kann durch die über Serin verlaufende Sulfatreduktion Cystein ebenfalls als essentielle Aminosäure für die Cephalosporin C-Biosynthese zur Verfügung gestellt werden (siehe Theorieteil). Aus der folgenden Abbildung 4.7 wird deutlich, daß gerade ab dem Moment als Methionin und Serin extrazellulär verbraucht sind, Cystein sich im Medium anreichert. Es kann also angenommen werden, daß intrazellulär eine ausreichende Menge vorliegt. Desweiteren ist zu diesem Zeitpunkt, wie später noch deutlich werden wird, das Optimum der ACV-Synthetaseaktivität schon erreicht, und es können nicht mehr alle anfallenden Aminosäuren weiterverwertet werden. Dieses gibt sich auch im aktiven Ausschleusen der α -Amino adipinsäure (AAA) zu erkennen, die sich ab der 80. Stunde im Medium anreichert.

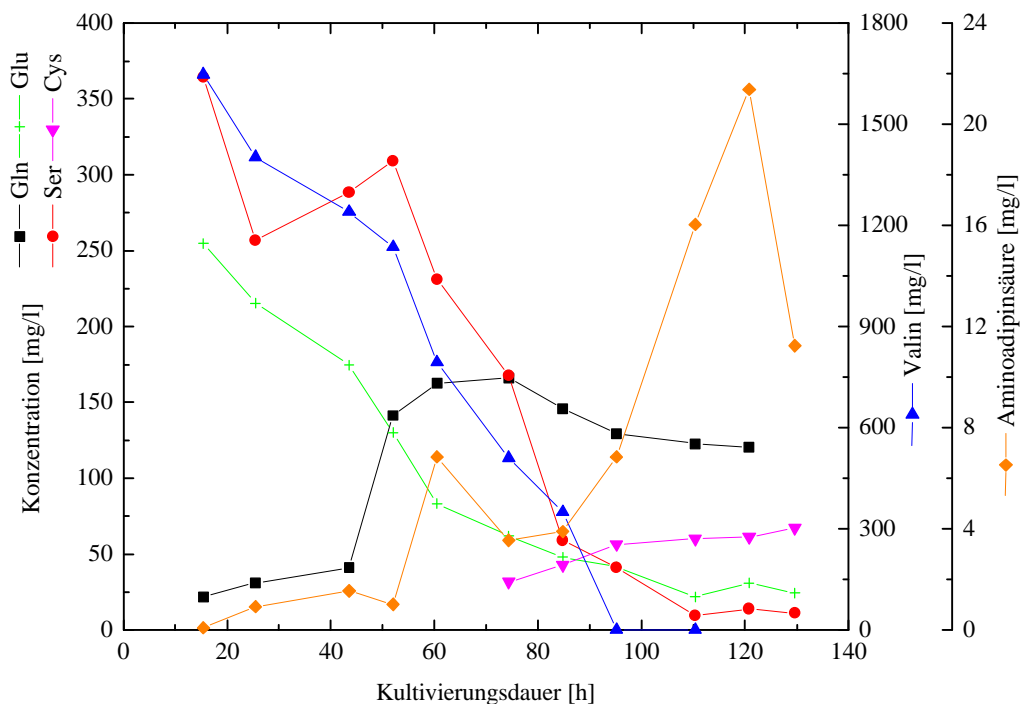


Abb. 4.7 : Verlauf ausgewählter extrazellulärer Aminosäurekonzentrationen

Der Abfall der AAA-Konzentration ganz am Ende der Kultivierung ist vermutlich auf das erneute Anwachsen der Kultur zurückzuführen, zeigt aber keinen Zusammenhang mit einer eventuellen Produktion. Die optimale Serinkonzentration wurde im Rahmen dieser Arbeit empirisch ermittelt und liegt bei 0,3 - 0,5g/l.

Deutlich zu erkennen ist auch, daß die gewählte Konzentration an Valin (0,8 -1g/l) hoch genug ist, um bis in die Produktionsphase eine ausreichende Versorgung zu garantieren. Da Valin für die Produktbiosynthese eine entscheidende Funktion besitzt, kann durch Bereitstellung dieser Aminosäure im Medium die Cephalosporin C-Biosynthese stimuliert werden. Zudem kann der Pilz die intrazelluläre Synthese des Valins vernachlässigen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Valinaufnahme und dem Methioninverbrauch konnte nicht festgestellt werden, beide Aminosäuren können parallel verstoffwechselt werden.

Das Glutamin - Glutamat System zeigt einen erwarteten Verlauf. Die Glutamatkonzentration nimmt steil ab, da Glutamat intrazellulär für die Assimilation des vorliegenden Ammoniums gebraucht wird. Es ist weiterhin anzunehmen, daß dabei entstehendes und überschüssiges Glutamin zunächst wieder an das Medium abgegeben wird, was den Anstieg der Konzentration zwischen der 40. und 70. Stunde erklären kann. Danach wird Glutamin langsam wieder aufgenommen, um den Aminosäurepool aufzufüllen.

4.1.3 Betrachtung der extrazellulären organischen Säuren

Ebenso wie die extrazellulären Aminosäuren in Hinsicht auf ihre Verstoffwechslung ein interessantes Bild zeigen, lassen sich auch in der genauen Betrachtung der ausgeschleusten organischen Säuren einige aufschlußreiche Beobachtungen machen. Am Anfang und in der exponentiellen Wachstumsphase einer jeden Kultivierung ist ein extremer pH-Shift zu verzeichnen, der bisher auf den Stickstoffhaushalt von *Acremonium chrysogenum* zurückgeführt wurde /Tollnick 1996/. Die Messung der Konzentration der organischen Säuren im Kulturmedium macht jedoch deutlich, daß der Pilz einige organische Säuren aus der Zelle freigibt (Abb.4.8). Die parallel zur exponentiellen Wachstumsphase steigend verlaufenden Konzentrationen von Acetat, Succinat und etwas zeitversetzt Formiat können nun zur Erklärung dieser pH-Wert Änderung herangezogen werden. Selbst das am leichtesten zu verstoffwechselnde Pyruvat liegt zunächst im Überschuß vor und reichert sich bis zum Ende der Wachstumsphase nach 80 Stunden im Medium an.

Diese Konzentrationserhöhung im Medium läßt sich erklären, wenn davon ausgegangen wird, daß der Pilz in jedem Medium mit Substraten im Überschuß versorgt ist, so daß praktisch erst eine Art „Vorratspool“ an wichtigen energieliefernden Metaboliten gebildet werden kann.

Mit Verbrauch des Zuckers und der Aminosäuren als Hauptkohlenstoffquellen stellt sich ein anderes Verhältnis ein und *Acremonium chrysogenum* nimmt die notwendigen organischen Säuren aus dem Medium wieder auf und kann diese sofort an wichtigen Punkten im Citratzyklus (Pyruvat, Succinat, Acetyl-CoA) oder der Produktbiosynthese (Acetyl-CoA) wieder einbringen. Gut zu erkennen ist hier unter anderem die Periodizität des Citratzyklusses - erst erfolgt die Aufnahme von Pyruvat und zeitversetzt wird Succinat aufgenommen. Nach Demain *et al.* /1983/ kann der Pilz Acetat einfach in Acetyl-CoA umwandeln, welches als Kofaktor in der Produktbiosynthese Verwendung findet. Zudem muß beachtet werden, daß kleine Moleküle wie Pyruvat nahezu ungehindert durch die Zellmembran wandern können.

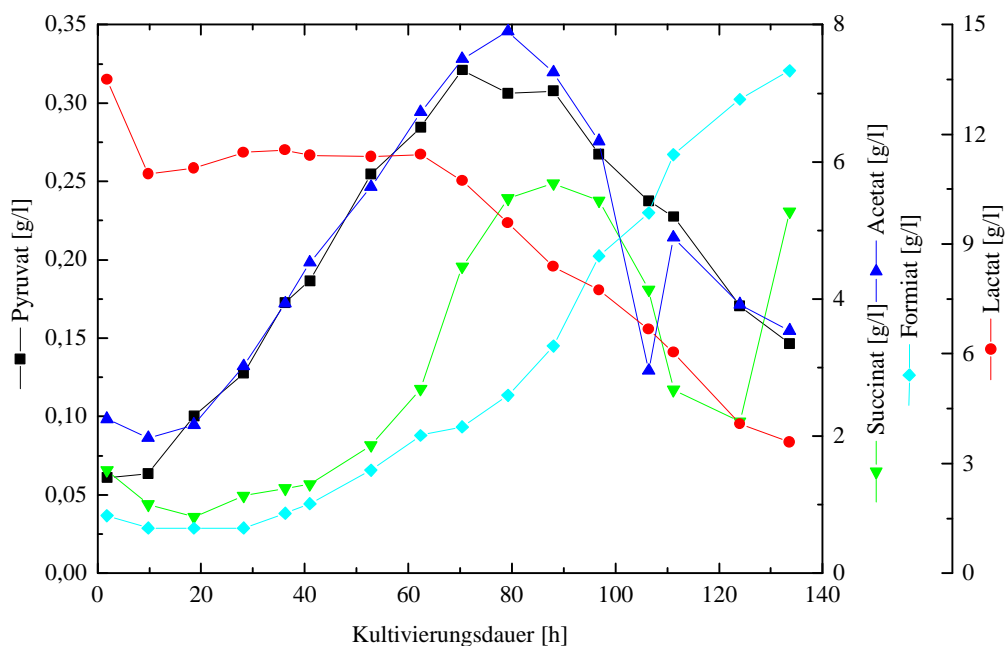


Abb. 4.8 : Verlauf der meßbaren extrazellulären organischen Säuren

Interessant ist weiterhin die hohe Konzentration an Formiat mit 7,2g/l am Ende der Kultivierung, die genaue Herkunft dieser einfachen organischen Säure konnte bisher noch nicht geklärt werden. Als Folge dieser hohen Konzentration an Formiat ist das Absinken des pH-Wertes im Medium anzusehen. Dies erfordert eine ständige Basenzugabe. Anzunehmen ist, daß das freigesetzte Formiat bei einer Spaltungsreaktion (z.B. der Sojaölverwertung durch Lipasen) als Endprodukt anfällt und nicht weiter verwertet werden kann.

Lactat wird von dem Pilz als Kohlenstoffquelle nicht bevorzugt aufgenommen und findet folglich auch erst nach Umstellung des Stoffwechsel auf andere Substrate Beachtung. Vermutlich wird es auch durch den Stoffwechsel in *Acremonium chrysogenum* zum Pyruvat metabolisiert.

4.1.4 Betrachtung der intrazellulären Aminosäuren

Bei der Betrachtung des Verhältnisses der intrazellulären Aminosäuren wird deutlich, daß *Acremonium chrysogenum* zu Beginn der Wachstumsphase einen extremen Bedarf an Aminosäuren hat. Diese werden - wie im vorherigen Kapitel gesehen - sehr schnell aus dem Medium aufgenommen und so schnell verstoffwechselt, daß die Konzentrationen intrazellulär bis zur 90. Stunde so niedrig sind, daß eine Erfassung äußerst problematisch ist. Aus den folgenden drei Abbildungen 4.9 - 4.11 wird der Unterschied bei der Verstoffwechslung der Aminosäuren im Primär- und Sekundärstoffwechsel deutlich. Während die Aminosäuren hauptsächlich in den extremen Wachstumsphasen zur Energiegewinnung dienen und folglich in alle Stoffwechselwege eingebracht werden, zeigt sich nach Umstellung auf den Sekundärstoffwechsel, daß die Aminosäuren im Überschuß synthetisiert werden, was zu einer intrazellulären Anreicherung führt.

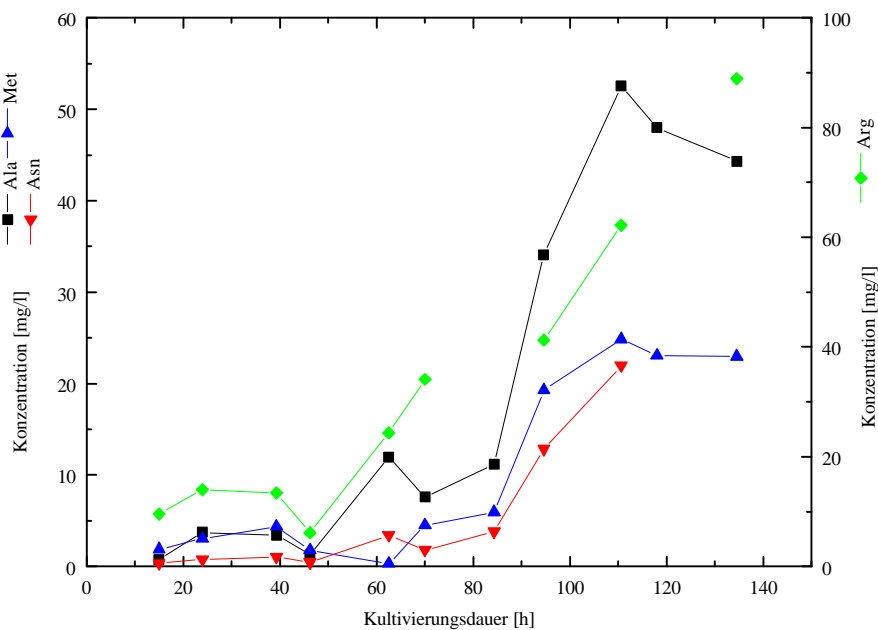


Abb. 4.9 : Intrazelluläre Konzentrationen von Ala, Asn, Met und Arg

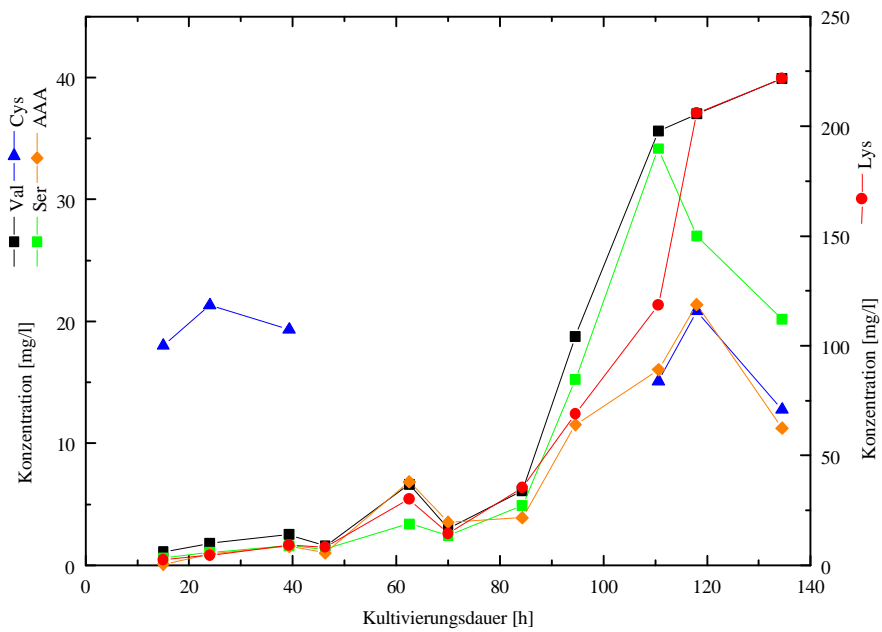


Abb. 4.10 : Intrazelluläre Konzentrationen von Val, Ser, Cys, AAA und Lys

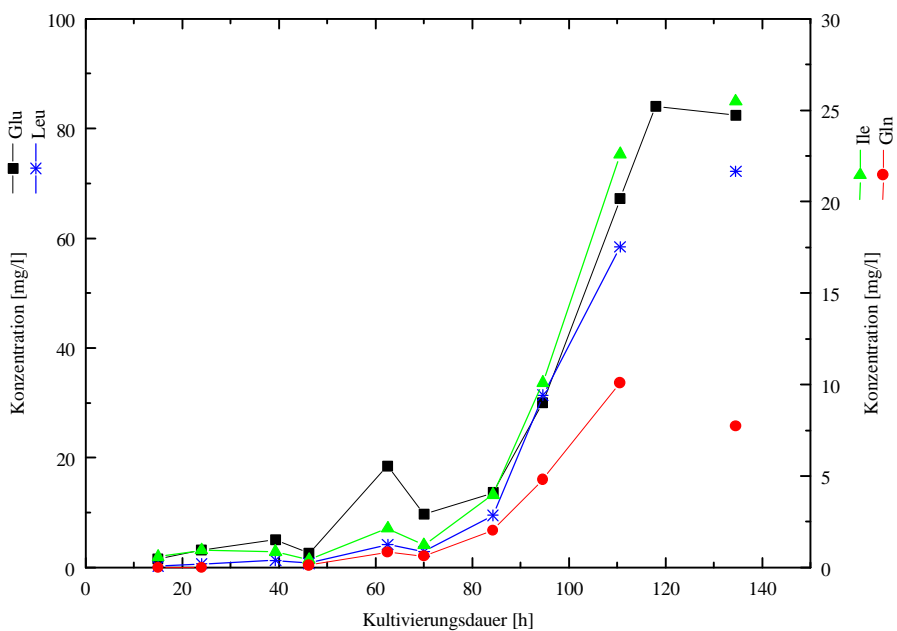


Abb. 4.11 : Intrazelluläre Konzentrationen von Glu, Leu, Ile und Gln

Vor allem die Precursor-Aminosäuren Cystein, Valin und α -Aminoadipinsäure müssen in Bezug auf die Cephalosporin C-Bioynthese genauer betrachtet werden. Dabei zeigt sich ein interessantes Bild. Wie noch deutlich werden wird, besitzt die ACV-Synthetase ihr Aktivitätsmaximum während der exponentiellen Wachstumsphase von *Acremonium chrysogenum* (siehe Kap. 4.1.5). Zu diesem Zeitpunkt existiert folglich eine Konkurrenz zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel um diese drei Substrate. Es muß also gewährleistet werden, daß die ACV-Synthetase zu diesem Zeitpunkt die drei Aminosäuren in ausreichender Menge vorfindet, um die Bildung des Tripeptids ACV zu garantieren. Wie aus den intrazellulären Daten deutlich wird, sind die Konzentrationen zu dieser Zeit allerdings relativ niedrig, was jedoch nicht auf eine Unterversorgung sondern auf die sehr schnelle Umsetzung zum Tripeptid ACV zurückgeführt wird, welches sich zu diesem Zeitpunkt anreichert.

4.1.5 Enzymaktivitäten

Eine der wichtigsten gemessenen Größen für die Beurteilung des Engpasses in der Biosynthese zum Cephalosporin C sind die intrazellulären Enzymaktivitäten, da die produktbildenden intrazellulären Enzymaktivitäten in Hinsicht auf Exprimierungszeitpunkt und -ausmaß entscheidend die Produktivität des Stammes beeinflussen. Besondere Beachtung gilt der Aktivität der ACV-Synthetase, die nach Beyer /1996/ als Hauptengpaß angesehen wird. Andere Autoren sehen auch in der Acetyltransferase einen möglichen Engpaß der Synthese /Martin *et al.*, 1997/. In der folgenden Abbildung 4.12 ist der Verlauf der ACV-Synthetase-Aktivität bei der gleichen Kultivierung zu sehen, aus der auch die vorhergehenden exemplarischen Daten stammen. Zusätzlich sind beispielhaft die ACV-Konzentrationen im Testansatz und die intrazellulären Proteingehalte dargestellt. Für alle anderen Enzyme sind nur die Aktivitäten aufgeführt, da die Konzentrationen im Testansatz irrelevant sind. Die Einheit der Enzymaktivitäten muß – aufgrund eines Geheimhaltungsabkommens - in „relative UNITS [rU]“ erfolgen und ist gleich zusetzen einer Angabe in Units bezogen auf eine Massenangabe. Eine Aktivität der ACVS ist ab der 20. Stunde meßbar, von da beginnt ein steiler Anstieg, der sein Maximum nach 75 Stunden erreicht. Ab diesem Zeitpunkt fällt die Aktivität des Enzyms kontinuierlich ab. Aus dem Verlauf der ACVS-Aktivität ist deutlich zu erkennen, daß das Enzym sein Aktivitätsmaximum in der exponentiellen Wachstumsphase hat und - anders als von Beyer /1996/ beschrieben - durchaus über einen langen Zeitraum, wenn nicht sogar über die ganze Kultivierung, aktiv ist.

Es ist nicht verwunderlich, daß ein Enzym, welches am Anfang einer Syntheseriehe steht, nach einer gewissen Zeit weniger exprimiert wird. Durch die vielfältigen Regulierungsmechanismen im Ablauf des Zellstoffwechsels wird meistens der „committed step“ einer Synthese zuerst gehemmt, um die Energieumsetzung in eine andere Richtung zu lenken. Das Ziel eines Screenings müßte nach diesem Verlauf zu urteilen, in der Überexprimierung der ACVS in der stationären Phase bestehen.

Inwieweit es dadurch zu Konkurrenzmechanismen mit der Expressierung von Lipasen kommt, kann hier nicht beurteilt werden. Anzunehmen ist jedoch, daß *Acremonium chrysogenum* aufgrund der Stoffwechselumstellung auf Sojaöl es für notwendig erachtet, die für den Sekundärmetabolismus entscheidenden Enzyme zurückzustellen und ein breites Spektrum an Lipasen zu entwickeln. Sollte es funktionieren die Stoffwechselumstellung zu umgehen bzw. sie etwas schonender einzuleiten, so ist es durchaus denkbar, daß die Aktivität der ACVS keinen so großen Abfall erlebt wie bisher.

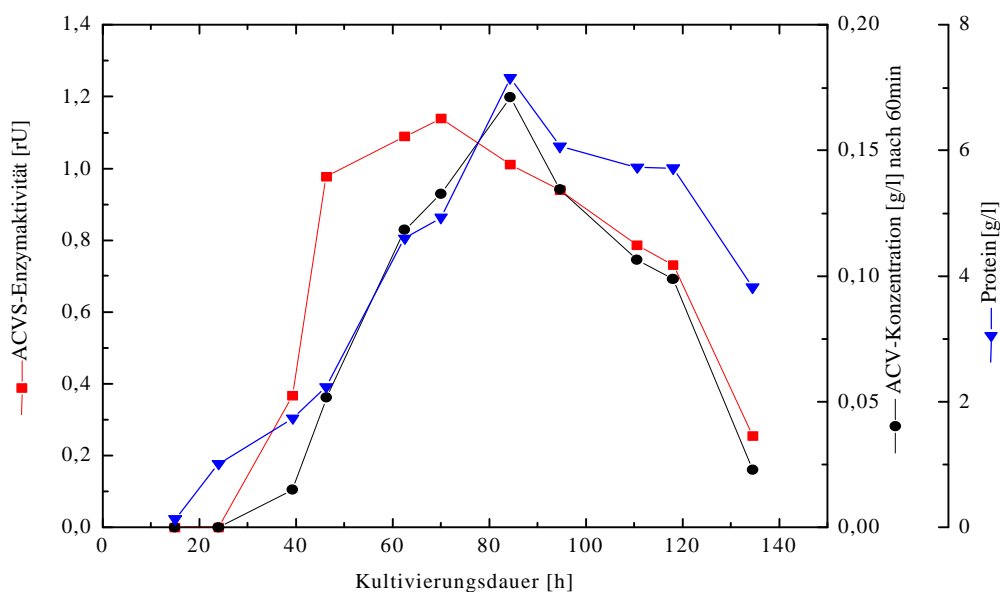


Abb. 4.12 : ACVS-Aktivität, ACV-Konzentration und der intrazelluläre Proteingehalt

In Abbildung 4.13 sind die Enzymaktivitäten, der in der Biosynthese des Cephalosporin C beteiligten Enzyme gegenübergestellt. Der Verlauf der Enzymaktivitäten spiegelt ein grundsätzlich ähnliches Bild der Verhältnisse wieder, die Beyer /1996/ und auch Zhang *et al.* /1987/ erforscht haben.

Die ACVS-Aktivität weist die deutlich niedrigste Aktivität über den gesamten Kultivierungszeitraum auf. Zum Vergleich sind Verläufe der ACVS-Aktivität aus zwei unterschiedlichen Kultivierungen (UD22 und UD26) dargestellt, was verdeutlichen soll, daß der Verlauf des Aktivitätsspektrum ähnlich ist, die absoluten Werte jedoch schwanken können. Der Vergleich der Verläufe der anderen Enzymaktivitäten untereinander verdeutlicht, daß der Einsatz von Proteaseinhibitoren durchweg zu höheren Aktivitätswerten führt. Was vor allem in den hohen Aktivitätswerten der Acetyltransferase (maximal 80 rU) und der ACVS-Aktivität zum Ausdruck kommt, also genau bei den beiden Enzymen, die als Engpaß angesehen werden. Durch die hohe Aktivität der Acetyltransferase in allen betrachteten Kultivierungen kann ein Engpaß im verwendeten A3/2 Stamm an dieser Stelle der Biosynthese ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu dürfte durch die niedrige ACVS-Aktivität (maximal 1,3 rU) bestätigt sein, daß hier der Engpaß im Hochleistungsstamm liegt.

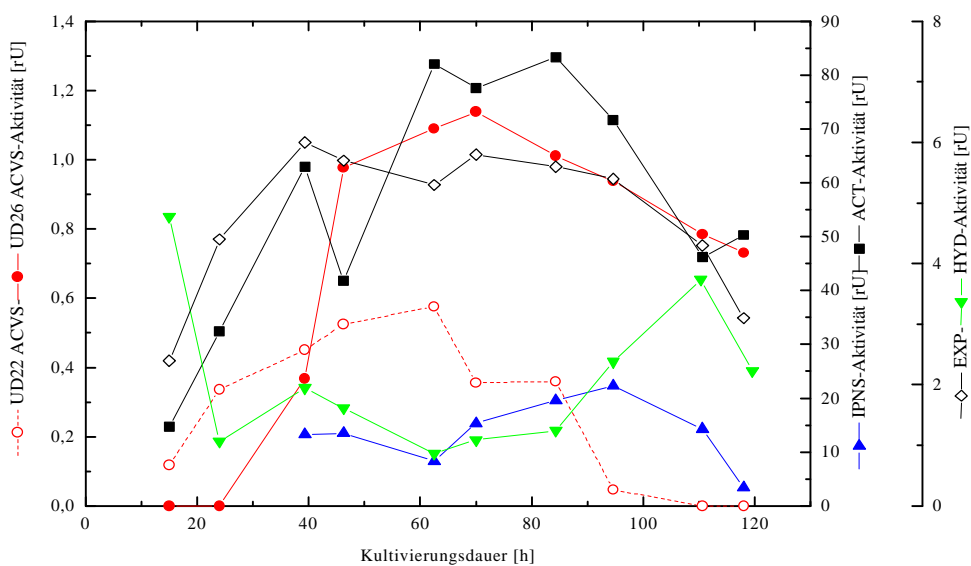


Abb. 4.13 : Charakteristischer Verlauf der Enzymaktivitäten in *Acremonium chrysogenum*

Die IPNS zeigt die zweithöchste Aktivität der betrachteten Enzyme. Die Aktivität ist ab der 40. Stunde deutlich meßbar und steigt nach 90 Stunden auf ein Maximum von 20 rU an, was aufgrund der neuen Penicillin N Standards, die Vermutung bestätigt, daß alte Penicillin N Standards zu verfälschten - zu hohen - IPNS-Werten in der Vergangenheit führten /Beyer 1996/.

Deutlich niedriger fallen die Aktivitäten der DAOC-Synthase (Expandase) und der DAOC-Hydroxylase aus. Im Verlauf dieser beiden Aktivitäten ist der Widerspruch zur Bifunktionalität des Enzyms nicht zu übersehen. Die Expandaseaktivität steigt in der Wachstumsphase des Pilzes bis zur 40. Stunde schnell an und bleibt auf diesem Niveau von 5 rU fast über den gesamten Kultivierungsverlauf. Erst ab der 110. Stunde ist ein leichter Abfall zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu bleibt die Hydroxylase-Aktivität zuerst relativ niedrig und beginnt erst ab der 80. Stunde zu steigen. Das Maximum wird bei 110 Stunden mit 4 rU erreicht. Nach Scheidegger *et al.* /1984/ und Zhang *et al.* /1987b/ sollte die Expandase- und Hydroxylase-Aktivität einen korrelierenden Verlauf zeigen, mit einem spät in der Kultivierung liegenden Maximum.

Basierend auf diesen vorgestellten Enzymaktivitäten und der Einbeziehung der von Malmberg *et al.* /1992/ durchgeführten kinetischen Modellansätze für *Acremonium chrysogenum* C-10, kann die Hypothese gefestigt werden, daß in dem verwendeten Hochleistungsstamm *Acremonium chrysogenum* A3/2 der primäre Engpaß für eine Umsatzlimitierung bei der Cephalosporin C-Biosynthese bei der Aktivität der ACVS zu suchen ist. Als sekundärer Engpaß muß die Expandase/Hydroxylase-Aktivität angesehen werden.

4.1.6 Cephalosporin C-Produktion in komplexen Medien

In allen durchgeführten Kultivierungen zeigt *Acremonium chrysogenum* das typische Bild eines im Sekundärmetabolismus produzierenden Mikroorganismus. Allerdings ist der durch genetisches Screening verbesserte Stamm fähig, schon während der exponentiellen Wachstumsphase die Biosynthese des Cephalosporin C zu starten. Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen ist, findet nach 40 Stunden eine erste Anreicherung des Hauptproduktes im Medium statt, welche bis zum Ende der Kultivierung anhält und schließlich 129,79 % CPC liefert. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf eine Standardausbeute von 100 % (vgl. Kap. 4.1.7).

Ergebnisteil - Kultivierungen in komplexen Medien

Die Ausschleusung der Nebenprodukte beginnt etwas zeitversetzt und ist Indiz für die diskutierten Enzymaktivitäten der in der Biosynthese involvierten Enzyme.

Nach Tollnick /1996/ ist die Anreicherung von DAC im Medium auf eine Hydrolyse des Cephalosporin C zurückzuführen, welche mit einer Kinetik erster Ordnung beschrieben werden kann. Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bei mehreren Kultivierungen bestätigt werden. Die Konzentration des Penicillin N ist in erster Linie von der Aktivität der Expandase abhängig, die am Ende der Kultivierung ein Minimum aufweist und somit als zweiter Engpaß angesehen werden kann. Ebenso ist die Anreicherung des DAOC durch die Hemmung der DAOC-Synthase/ -Hydroxylase zu erklären.

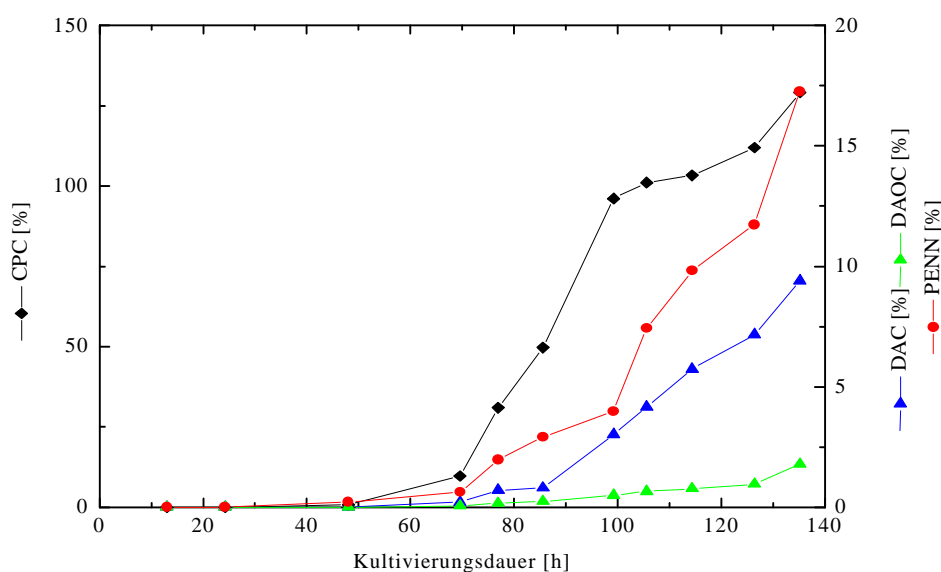


Abb. 4.14 : Verlauf der Neben- und Hauptproduktkonzentrationen

Bei dem Verlauf der Produktbildungsraten (Abb. 4.15) wird schnell ersichtlich, warum die Produktivität bei dem verwendeten Stamm nur noch schwer zu steigern ist. Das Maximum der CPC-Bildung liegt in der 80. Stunde, zu einem Zeitpunkt, an dem sich der Pilz also gerade in der Stoffwechsellumstellung befindet. Durch diese Änderung im Energiestoffwechsel kommt es zu einem erheblichen Eingriff in den Fluß der Produktbiosynthese. Ziel ist es, dieses Maximum der Produktivität zu verlängern, was sich aber als äußerst schwierig herausstellen sollte. Die Stoffwechsellumstellung müßte "sanfter" ablaufen, so daß die Produktbiosynthese nicht gestört wird. Dies konnte z.B. durch die Glucosezufütterung zu diesem Zeitpunkt erreicht werden.

Durch Zusatz der Aminosäuren zum Medium konnte das Maximum auf 0,51g/l·h gesteigert werden, welches aber im Zusammenspiel mit einer Glucosezufütterung nicht erzielt werden konnte.

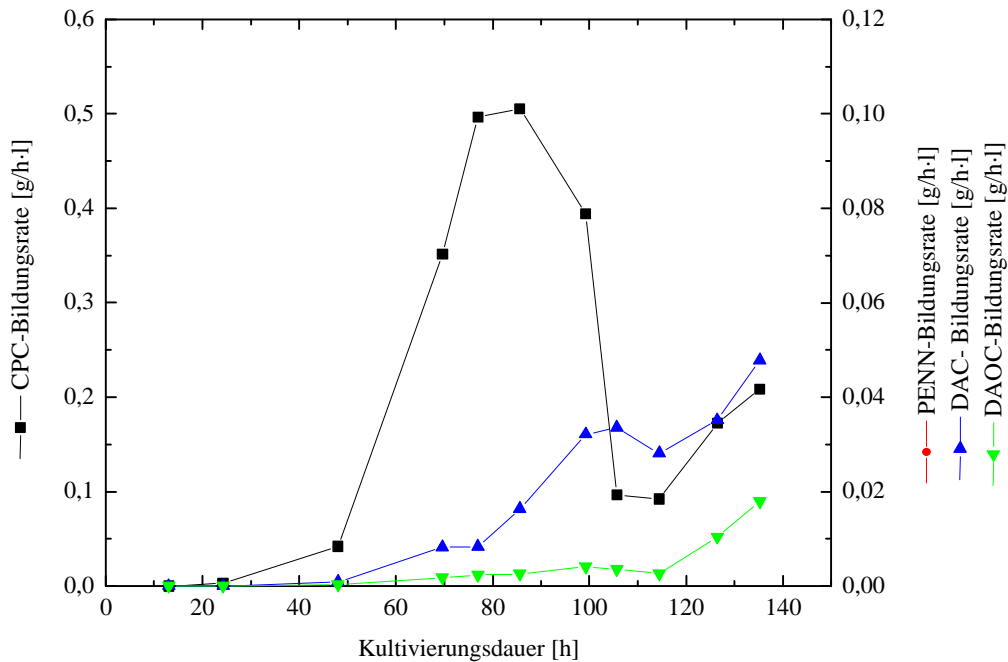


Abb. 4.15 : Verlauf der Produktbildungsraten im komplexen Medium

Nach 120 Stunden folgt noch einmal ein langsamer Anstieg in der CPC-Bildungsrate, was vermutlich auf das stärkere Nachwachsen von aktiven Zellen zurückzuführen ist, welche allerdings gegenüber den absterbenden bzw. nicht produzierenden Zellen zurückbleiben. Deutlich zu erkennen ist auch, daß die Penicillin N-Anreicherung im Medium erst beginnt, nachdem die Cephalosporin-Bildung ein wenig stagniert (85. Stunde), zum Ende kommt es aufgrund des Stoppens der Biosynthese zum sprunghaften Anstieg der Penicillin N-Bildungsrate. Zu diesem Zeitpunkt zeigt auch die Bildungsrate für DAC und DAOC einen deutlichen Anstieg (120. Stunde).

4.1.7 Vergleich der durchgeführten Kultivierungen in komplexen Medien

Wie schon mehrmals deutlich wurde, sind im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Kultivierungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen bzw. unterschiedlichen Konzentrationen an Aminosäuren durchgeführt worden. Ausgehend von einer älteren Kultivierung (Tollnick 1996) sind Versuche unternommen worden, um die Produktivität des Stammes zu steigern. Hierzu werden zunächst Glucosezufütterungsexperimente durchgeführt, um die Stoffwechsellage auf Sojaöl und den damit verbundenen Einbruch in der Biosynthese des Cephalosporin C zu beeinflussen. Parallel werden Kultivierungen mit Aminosäurezusätzen durchgeführt, zudem wird eine Kombination von Glucosezufütterung und Valinzusatz erläutert.

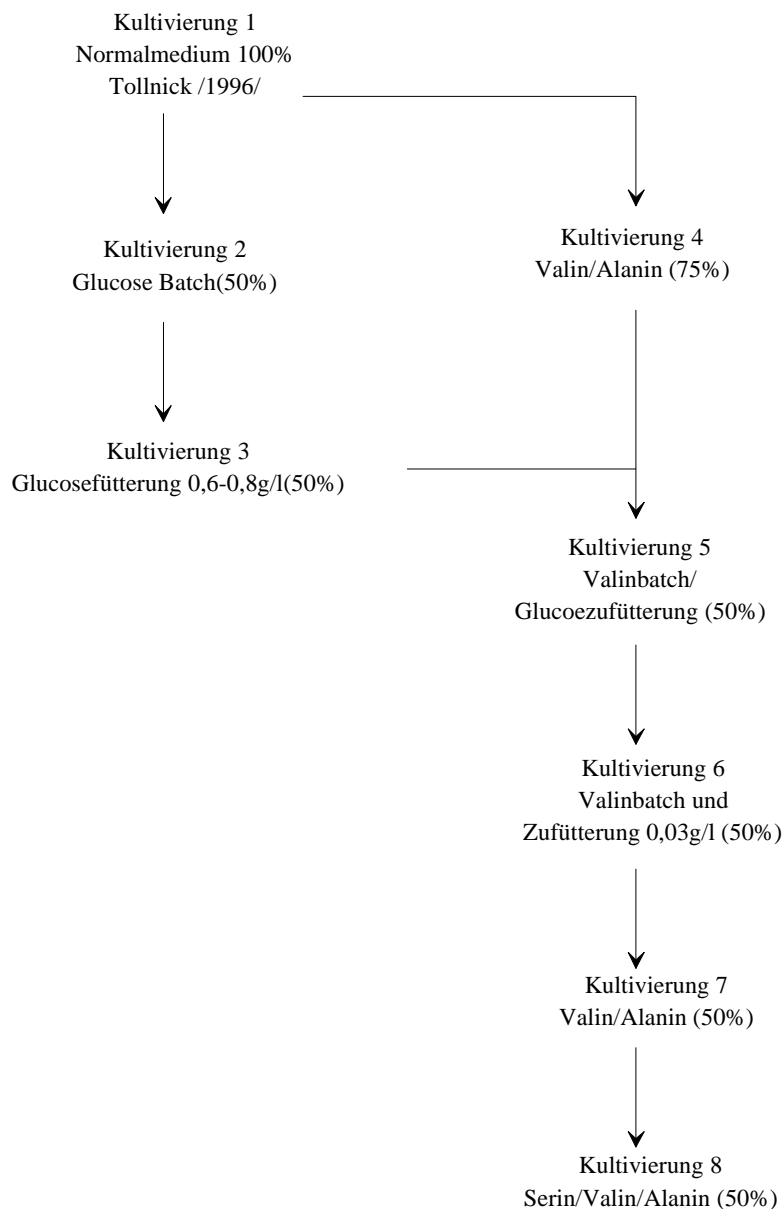


Abb. 4.16 : Die wichtigsten durchgeführten Kultivierungen

Ergebnisteil - Kultivierungen in komplexen Medien

Kultivierung	maximale CPC-Konzentration [%]
1 (100%)	100
2 (50% Glucosebatch)	50,88
3 (50% und Glucosezufütterung)	83,59
4 (75% Valin/Alanin)	104,57
5 (50% Valin und Glucosezufütterung)	89,41
6 (50% Valin und Valinzufütterung))	90,44
7 (50% Valin/Alanin)	129,79
8 (50% Valin/Alanin/Serin)	136,43

Tab. 4.1 : Maximal erreichte Cephalosporin C Konzentrationen bei den berücksichtigten Kultivierungen

Die Tabelle 4.1 zeigt die maximal erreichten Cephalosporin C-Konzentrationen in [%] bezogen auf eine Standardausbeute von 100 % in Kultivierung 1. Aus den normierten Konzentrationen ist ein deutlicher Trend abzulesen. Neben der Verdünnung des Mediums, bringt auch der gezielte Zusatz der Aminosäuren eine extreme Ausbeutesteigerung mit sich. So wird beispielsweise im halbkonzentrierten Medium der Kultivierung 8 fast 37% mehr Cephalosporin C produziert als im 100%-igen Medium. Dies macht deutlich, wie sehr die Produktivität durch gezielte Variation des Aminosäurespektrums noch zu steigern ist.

Die durchaus positiven Ergebnisse sollen anhand zweier ökonomisch wichtigen Parameter belegt werden. Eine wichtige Größe bzw. ein aussagekräftiger Parameter für die Bewertung eines Prozesses ist die Raum-Zeit-Ausbeute des gewünschten Hauptproduktes bezogen auf die Kultivierungszeit (Abb. 4.18), da mit der Länge einer Kultivierung eine der wichtigsten industriell relevanten Größen – die Zeit – erfaßt wird. Natürlich ist der Wert nur im Zusammenhang mit Selektivitäten und dem im folgenden berechneten Ausbeutekoeffizienten zu sehen. Die Prozentangaben in den nachfolgenden Legenden beziehen sich auf die Substratkonzentrationen, die im Medium vorgelegt worden sind und geben damit auch Aufschluß über die Viskosität des Mediums. Die genauen Medienzusammensetzungen finden sich im Anhang. Aus der Darstellung der Raum-Zeit-Ausbeuten wird sehr schnell erkennbar, daß die als Normalmedium bezeichnete Kultivierung deutlich hinter denen in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen zurückbleibt. Eine Ausnahme bildet nur die Fermentation, die mit einer hohen Startkonzentration an Glucose durchgeführt wurde.

Diese diente lediglich dazu, die Biomassebildung unter hoher Zuckerkonzentration zu beobachten. Es ist wie erwartet zu einer starken Biomassebildung mit verspätet einsetzender Produktion gekommen, da zuerst alle Energie in den Wachstumsprozeß investiert wird. Die darauf folgende Glucose-fed-batch-Kultivierung macht deutlich, daß durch gezielte Glucoseimpulse die Produktion früh angeregt werden kann, d.h. am Anfang der Kultivierung wird die Konzentration niedriger als gewohnt gehalten, was eine geringere Biomassebildung und eine frühere Stoffwechselumstellung mit sich bringt. Zu diesem Zeitpunkt einsetzende Glucose-zufütterungen können eine sanftere Umstellung bewirken und gleichzeitig den Energiehaushalt hoch halten. Die Zellen bleiben damit aktiv im Primär- und Sekundärstoffwechsel. Diese Glucosefütterungsexperimente wurden mit einer Glucosekonzentration zwischen 0,6 und 0,8g/l Glucose im Medium durchgeführt, um eventuelle Hemmungen der Cephalosporin C-Biosynthese - durch Verbrauch von essentiellen ATP - zu unterdrücken. Somit lag die Glucosekonzentration immer etwas unter der vorher bestimmten Aufnahme rate durch die aktiven Pilzzellen (Abb. 4.17). Die Bezeichnungen in der Legende der Abbildung beziehen sich auf frühere Kultivierungen. Ausführliche Fermentationsdaten finden sich in Seidel /1996/ und Tollnick /1996/.

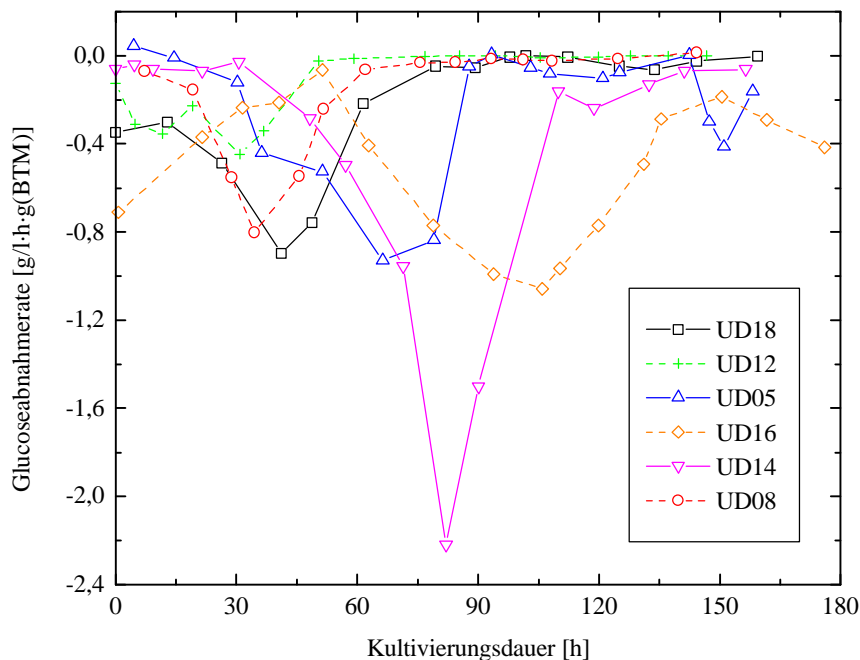


Abb. 4.17 : Glucoseabnahmeraten im Medium bei einigen früheren Kultivierungen

So früh wie in dieser Kultivierung - nach 90 Stunden – konnte das Maximum an Produktivität nie wieder erreicht werden. Als nächste Kultivierung in Abbildung 4.18 ist eine Batchkultivierung mit erhöhten Konzentrationen an Valin und Alanin aufgeführt. Aufgrund der höher gewählten Medienkonzentration ist eine höhere Raum-Zeit-Ausbeute nicht weiter verwunderlich, denn in dem 75%-igen Medium wird wesentlich mehr produziert, als durch den Zeitvorsprung der anderen Kultivierungen “aufgefangen” werden kann. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit wurden alle anderen Medien 50%-ig gewählt.

Weiterhin ist deutlich zu erkennen, daß die Batch-Zugabe aller drei Aminosäuren zum Medium eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute von fast 50 % ($0,128 \rightarrow 0,191\text{g/l}\cdot\text{h}$) liefert, was allerdings nicht überbewertet werden darf, da die verkürzte Produktion eine wichtige Rolle spielt. Die Netto-Ausbeute kann erst nach Berücksichtigung des Ausbeutekoeffizienten betrachtet werden. Zudem sind die hohen Preise der Aminosäuren zu bedenken, so daß erst eine Optimierung des Preis-Leistungsverhältnisses durchgeführt werden muß. Festzustellen ist jedoch, daß durch Zugabe dieser essentiellen Aminosäuren die Produktivität in Bezug auf die Raum-Zeit-Ausbeute deutlich gesteigert werden kann.

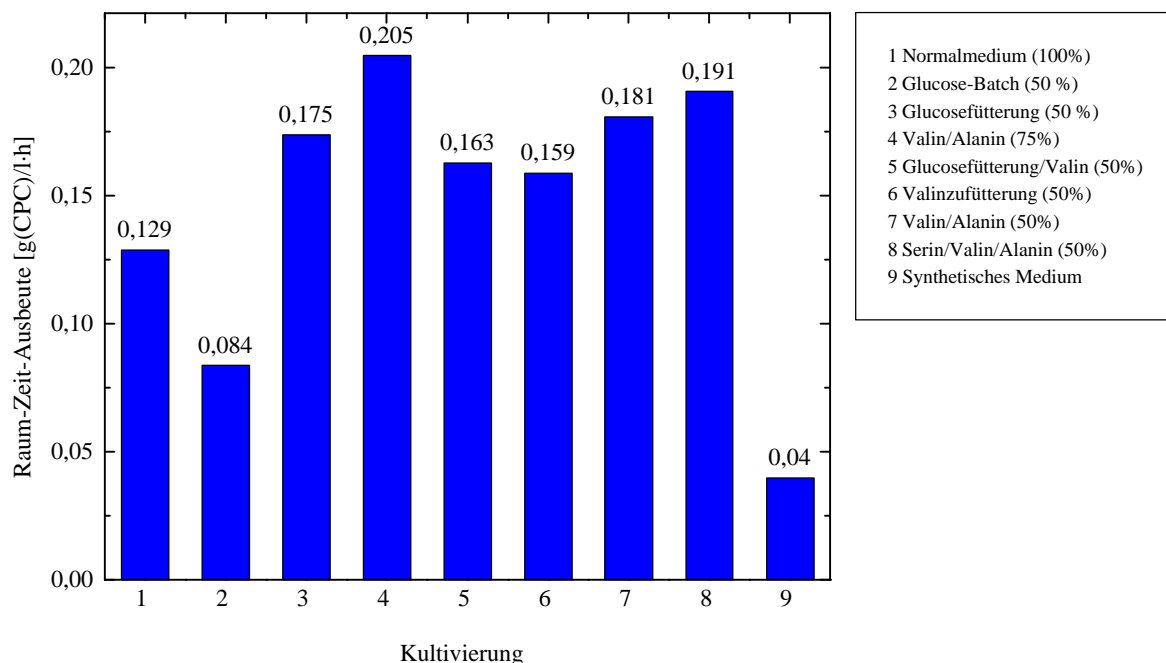


Abb. 4.18: Raum-Zeit-Ausbeute bei den wichtigsten durchgeführten Kultivierungen in komplexen Medien

Zusätzlich ist im Vergleich das synthetische Medium aufgenommen worden, um zu zeigen, daß im Minimalmedium die Produktion sehr zeitversetzt abläuft. Zudem ist die Konzentration an Cephalosporin C im Vergleich zu den komplexen Medien so gering, daß ein direkter Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten hier nicht sinnvoll erscheint.

In der nächsten Graphik 4.19 sind die Ausbeutekoeffizienten der gleichen betrachteten Kultivierungen dargestellt. Der Ausbeutekoeffizient wird auf die Biotrockenmasse bezogen, da so am besten ein Vergleich mit früheren Kultivierungen durchgeführt werden kann.

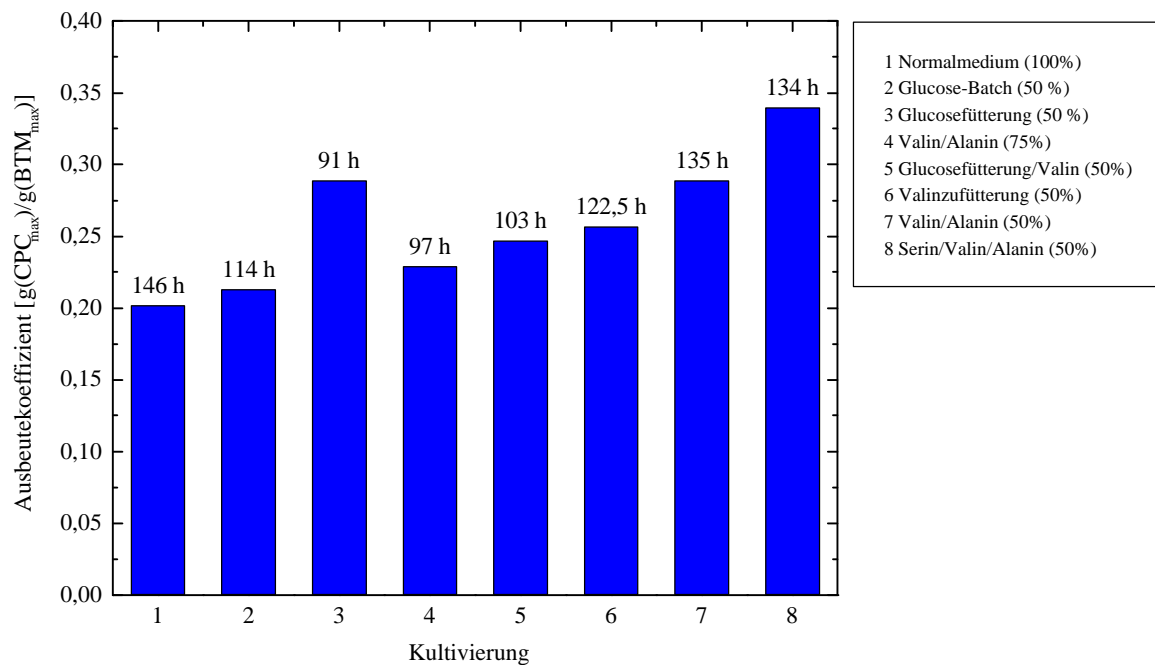


Abb. 4.19 : Ausbeutekoeffizienten ausgewählter Kultivierungen

Die Ausbeutekoeffizienten der ausgewählten Kultivierungen zeigen einen fast einheitlichen Verlauf von links nach rechts betrachtet, was durchaus überraschend ist, da eine Produktivitätssteigerung in diesem Maße nicht zu erwarten war. Aus der Reihe fällt nur die Glucose-fed-batch-Kultivierung heraus, da hier im Vergleich extrem wenig Biomasse, durch die sehr niedrige Glucosekonzentration zu Beginn der Fermentation, gebildet wurde. Die Angabe in Stunden auf den Balken bezieht sich auf die Zeit, zu der das Cephalosporin C seine maximale Konzentration im Medium erreichte.

Es ist klar auszumachen, daß im Vergleich zu früheren Fermentationen das Maximum immer früher erreicht wurde (bei Kultivierung 1 nach 146 Stunden, im Gegensatz dazu bei Kultivierung 5 nach 103 Stunden), was ein Indiz dafür ist, daß die Cephalosporin C Fermentation in der Vergangenheit immer über den optimalen Zeitpunkt hinaus durchgeführt wurde, was negative Kosten und Zeitaufwand verursacht. Es ist also generell zu überdenken, ob auch großtechnisch - bzw. im industriellen Prozeß - die Dauer der Fermentation bei gleichbleibender Produktivität durch den Zusatz von Aminosäuren verkürzt werden könnte. Dies ist in erster Linie von dem aktuellen Preis der benötigten Aminosäuren abhängig, da diese Neukosten den eingesparten Summen gegenüberzustellen sind. Bei Betrachtung des Verlaufes der Ausbeutekoeffizienten ist deutlich zu erkennen, daß jeder Zusatz einer weiteren Aminosäure eine erhebliche Steigerung in der Gesamtproduktivität mit sich bringt.

Ein weiteres wichtiges Problem bei der industriellen Produktion von Cephalosporin C ist das bei der Aufreinigung schwer zu entfernende DAOC, welches aufgrund seiner toxischen Eigenschaften nur zu geringen Mengen im Endprodukt enthalten sein darf. Es gilt folglich die Konzentration an DAOC schon im Kultivierungsprozeß möglichst niedrig zu halten. Auch hier brachte der Einsatz der Aminosäuren leichte Verbesserungen, wie aus Graphik 4.20 deutlich ersichtlich ist. So zeigt die Kultivierung mit Serin-, Valin- und Alaninzusatz zum Ende der Kultivierung die niedrigste im Forschungsmaßstab gemessenen DAOC-Konzentration.

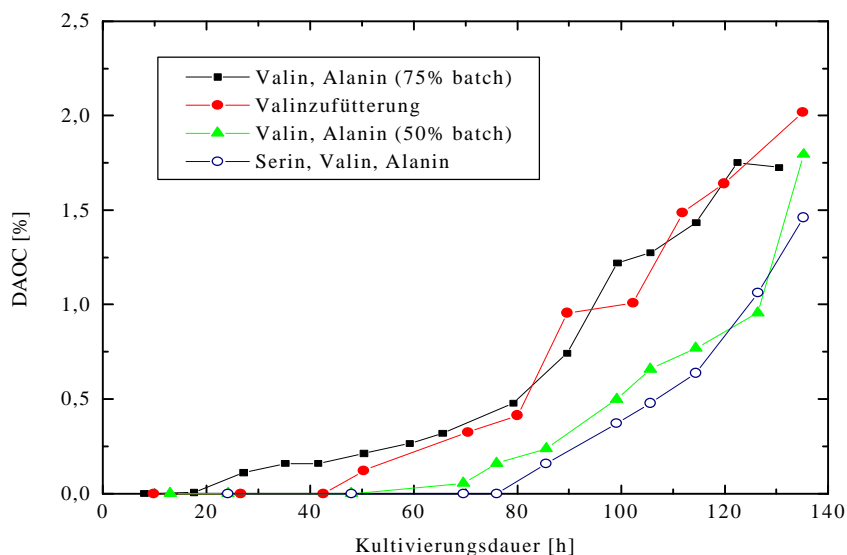


Abb. 4.20 : Verlauf der DAOC-Konzentration bei den wichtigsten Kultivierungen

4.1.8 Vereinfachte Kohlenstoffbilanz im komplexen Medium

Entscheidend für eine Bilanzierung in jeglicher Form ist neben den erfassbaren Substanzen im Medium und der Abluft, die Kenntnis über die Zusammensetzung des Pilzmycels auf Elementarbasis. In komplexen Medien entsteht hier der größte Fehler durch anhaftende Festkörper, die mit zur Verbrennungsanalyse gegeben werden und somit das Bild verfälschen können. Dies ist auch bei dem hier dargestellten Verfahren zu berücksichtigen, da eine vollständige Trennung von Zellen und Medienbestandteilen nicht durchgeführt werden kann. Die getrocknete Biomasse wurde in einem Mörser feingemahlen und freundlicherweise von der Hoechst AG weiter zur Elementaranalyse gegeben. Die hohen Kosten für solche Analysen schränken den Einsatz von Bilanzen jedoch in beträchtlichem Maße ein, so daß hier nur eine Kultivierung exemplarisch betrachtet werden soll. Nachdem von Tollnick /1996/ schon eine Schwefelbilanz erstellt wurde, bietet es sich an, nun den Kohlenstoffgehalt genauer zu analysieren. Die bei der Verbrennungsanalyse erhaltenen Werte für den S-, O-, N- und C-Gehalt bei einer Kultivierung mit erhöhter Valinkonzentration sind in der folgenden Abbildung 4.21 dargestellt.

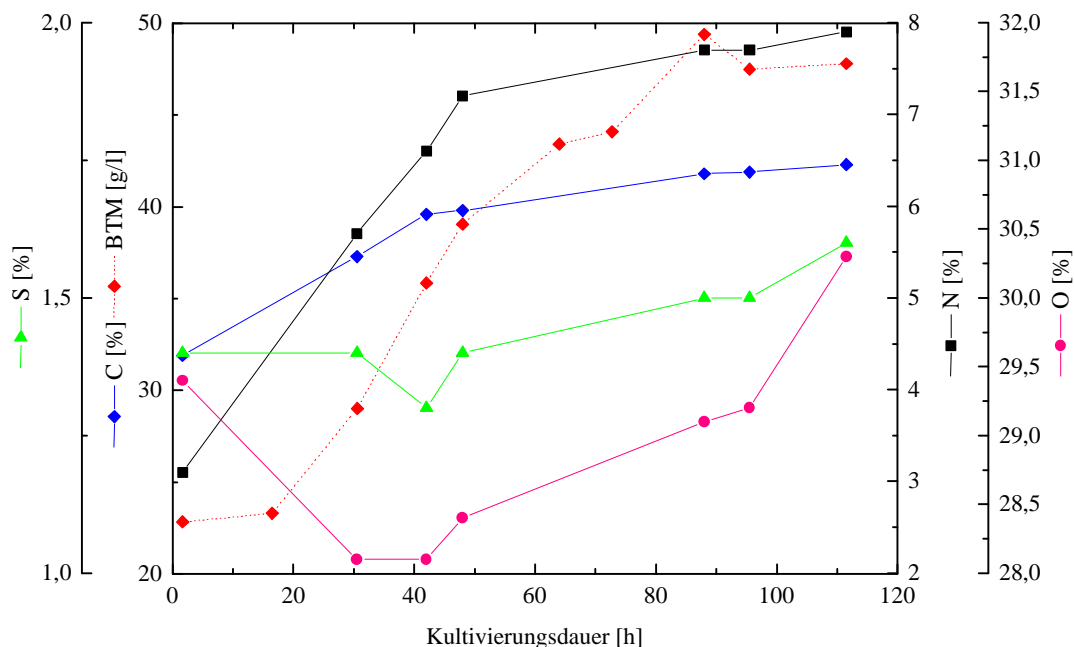


Abb. 4.21 : BTM, S-, N-, O- und C-Gehalt bei einer Kultivierung mit erhöhter Valinkonzentration

Die Verläufe des Stickstoff- und Kohlenstoffgehaltes spiegeln deutlich die - gegenüber den Medienbestandteilen - wachsende Zunahme an Biomasse zu Beginn der Kultivierung wieder. Kohlenstoff und Sauerstoff bilden den Hauptanteil am Elementargehalt, und der Verlauf des Schwefelgehaltes zeigt ein ähnliches Bild wie bei Tollnick /1996/ und kann vermutlich auf den hohen Schwefelgehalt im Medium (anorganisches Sulfat) zurückgeführt werden.

Die durchgeführte Bilanz soll in erster Linie Aufschluß darüber geben, inwieweit die bestehende Analytik ausreicht, um eventuell Stoffflüsse zu charakterisieren oder aber Modellierungen durchzuführen. Da z.B. Versuche mit radioaktiv markiertem Kohlenstoff fehlen, muß auf Basis von Summationen der analysierten Substanzen auf mögliche Verteilungswege geschlossen werden. Hierzu wurde neben den Gehalt an Kohlenstoff in der Biotrockenmasse der Gelöstkohlenstoffgehalt (DOC) im Medium sowie der CO₂-Gehalt im Abgas berücksichtigt. Die folgende Abbildung 4.22 zeigt, daß über den gesamten Zeitraum einer Kultivierung die gemessenen Werte immer mit den durch die Einwaage bestimmten möglichen Kohlenstoffmengen in Einklang zu bringen sind. Ein relativ geringer Fehler einer erhöhten Wiederfindungsrate tritt in der exponentiellen Wachstumsphase (40-90h) der Kultivierung auf.

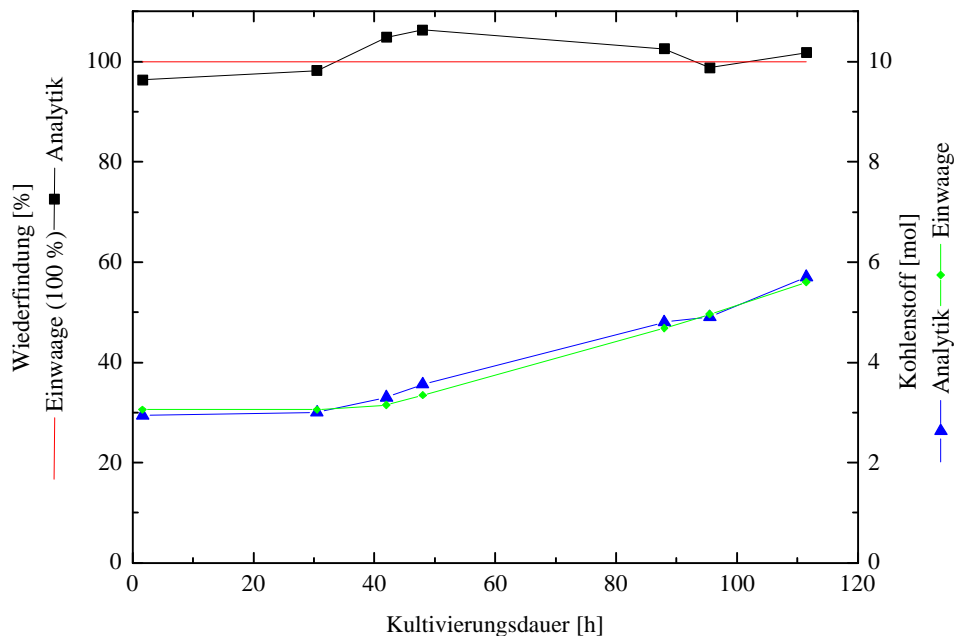


Abb. 4.22 : Einfache Kohlenstoffbilanz für eine Kultivierung mit erhöhter Valinkonzentration

Von besonderem Interesse ist, ob mit der vorhandenen Analytik alle löslichen Bestandteile erfaßt werden. Folglich wurde hierzu das zellfreie Medium auf seine Kohlenstoffverteilung genauer untersucht. In der folgenden Abbildung 4.23 ist die Aufteilung des Gelöst-kohlenstoffs in typische Gruppen, die routinemäßig gemessen werden, dargestellt. Als 100%-Wert ist der mit dem TOCOR gemessene Kohlenstoffgehalt anzusehen. Es ist zu erkennen, daß ab der 50. Stunde der β -Lactam-Anteil im Medium stark zunimmt und zu diesem Zeitpunkt Zucker und Aminosäuren eine untergeordnete Rolle spielen. Die erstmals quantitativ, zusätzlich miterfaßten, organischen Säuren stellen nahezu immer um die 20% des Gesamtanteiles dar. Festzustellen ist weiterhin, daß gerade in der entscheidenden Phase der Stoffwechselumstellung der Anteil an noch nicht genau charakterisierten bzw. nicht meßbaren Substanzen extrem hoch ist. Es kann zu diesem Zeitpunkt also nur schwer gesagt werden, in welcher Form der Kohlenstoff vorliegt. Dieses erschwert erheblich die Möglichkeit ein Black-Box-Modell für Stoffflüsse aufzustellen, da der Fehler bei 20% liegen würde. Hier sind genauere Metabolit-Untersuchungen von Nöten, da der Großteil dieser „unbekannten Substanzen“ im Proteinbereich und in den Primärstoffwechselprodukten zu suchen ist. Inwieweit völlig neue Zwischenprodukte zu erwähnen sind, kann hier nicht beurteilt werden.

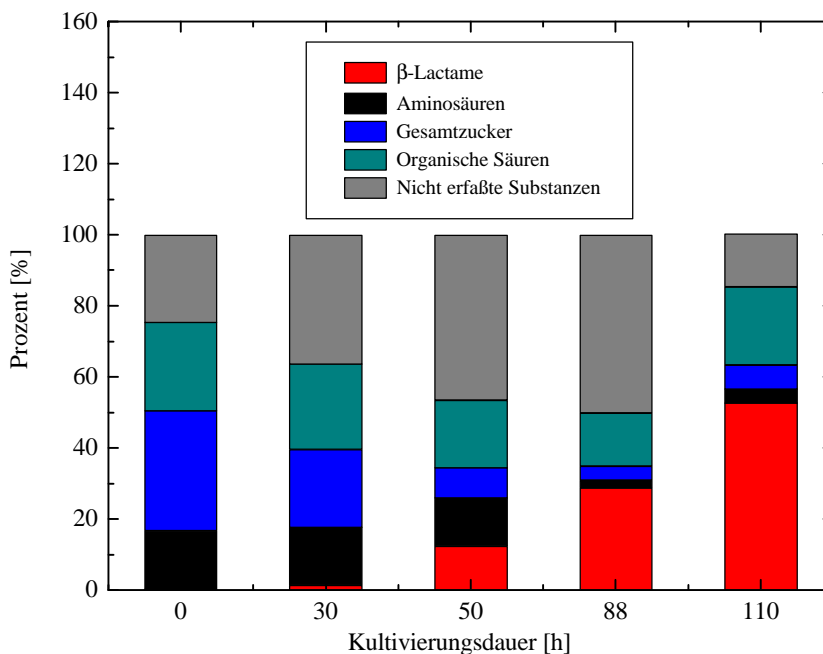


Abb. 4.23 : Verteilung des Gelöstkohlenstoffs (DOC) auf erfaßte Analysegruppen

Festzuhalten bleibt bei dieser Analyse jedoch, daß der Großteil des zu Beginn der Kultivierung zur Verfügung stehenden Kohlenstoffs im Laufe der Kultivierungszeit zu Biomasse und β -Lactamen umgesetzt wird und davon ausgegangen werden kann, daß es keine Unterversorgung an C-Quellen im komplexen Medium gibt.

4.1.9 Modellierung der Cephalosporin C-Biosynthese in komplexen Medien

Ziel dieses Modellierungsansatzes ist es, künftig Prognosen über Produktverläufe - bei leichten Veränderungen des Kultivierungsschemas - zu machen. Der Verlauf der Biosynthese des Cephalosporin C - und die Beeinflussung dieser durch Kofaktoren - ist ausführlich im Theorieteil (Kap. 2.2) dieser Arbeit beschrieben. Entscheidend für eine Modellierung ist zunächst die Betrachtung der Kinetik der einzelnen enzymatisch katalysierten Umwandlungen. Zu diesem Zweck wurde eine mathematische Beschreibung dieser Enzymreaktionen vorgenommen und somit ein kinetisches Modell erstellt. In diesen Modellen und den folgenden Massenbilanzen werden viele Parameter und Konstanten verwendet. Um eine Simulation durchzuführen, werden die in der Literatur erwähnten Werte verwendet, bzw. wenn vorhanden auf die experimentellen Daten dieser Arbeit zurückgegriffen. Bei einigen benötigten Daten müssen Schätzwerte benutzt werden, die später über die Modellierung bestätigt und identifiziert werden können und so eine ausreichende Genauigkeit für die vorgestellten Ergebnisse bieten. Die Modellierung wird nach der vierten Runge-Kutta-Methode (Program Promote „process modelling“, Institut für Technische Chemie) durchgeführt. Die verwendeten Parameter und Konstanten sind in der Tabelle 4.2 zusammengestellt. Zur Simulation werden die *in vivo* gemessenen Enzymaktivitäten (mUnits/mg Protein) zu der Einheit [mMol/h/ml cell] unter der Verwendung von 2ml cell/g BTM /Malmberg *et al.*, 1992/ und 76mg intrazelluläres Protein/g BTM im Komplexmedium umgerechnet.

Daraus folgt,

$$1 \text{ mU/mg Prot} = 228/100000 \text{ mM}/(\text{mg Prot} \cdot \text{h} \cdot \text{mL cell})$$

Die nachfolgenden Gleichungen erfassen die Reaktion in der Biosynthese des Cephalosporin C. Die verwendeten Abkürzungen werden der Übersicht halber im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Ergebnisteil - Kultivierungen in komplexen Medien

Parameter	Wert	Literatur	Parameter	Wert	Literatur
k_{ACV}	-	geschätzt	A_{HYD}	exp.	
A_{ACVS}	exp.		K_{DAOC}	0,02 mM	/Dotzlaf 1989/
K_{AAA}	1,5 mM	/Beyer 1996/	k_{CPC}	-	geschätzt
K_{CYS}	0,2 mM	/Beyer 1996/	A_{ACT}	exp.	
K_{VAL}	0,75 mM	/Beyer 1996/	K_{DAC}	0,22mM	/Beyer 1996/
k_{IPN}	-	geschätzt	$K_{inhPENN}$	-	geschätzt
A_{IPNS}	exp.		$K_{inhDAOC}$	-	geschätzt
K_{ACV}	0,52 mM	/Beyer 1996/	k_{secACV}	-	geschätzt
k_{DAOC}	-	geschätzt	$k_{secPENN}$	-	geschätzt
A_{EXP}	exp.		$k_{secDAOC}$	-	geschätzt
K_{PENN}	0,029 mM	/Dotzlaf 1989/	k_{secDAC}	-	geschätzt
K_{O_2}	0,1525 mM	/Zhou 1992/,	k_{secCPC}	-	geschätzt
k_{DAC}	-	geschätzt	RhoSp	2 mL cell/g BTM	/Malmberg 1992/

Tab. 4.2 : Parameter für die Modellierungen

ACV-Synthetase (ACVS)

$$R_{ACVS} = \frac{k_{ACV} \cdot A_{ACVS}}{1 + K_{AAA} / AAA_{int} + K_{CYS} / CYS_{int} + K_{VAL} / VAL_{int}} \quad -1-$$

Isopenicillin N-Synthetase (IPNS, Cyclase)

$$R_{IPNS} = \frac{k_{IPN} \cdot A_{IPNS}}{1 + K_{ACV} / ACV_{int}} \quad -2-$$

Isopenicillin N-Epimerase (EPM)

a) Isopenicillin N → Penicillin N

$$R_{EPMF} = \frac{k_{PENN} \cdot A_{EPMF}}{1 + K_{IPN} / IPN_{int}} \quad -3a-$$

b) Penicillin N → Isopenicillin N

$$R_{\text{EPMR}} = \frac{K_{\text{IPN}} \cdot A_{\text{EPMR}}}{1 + K_{\text{PENN}} / \text{PENN}_{\text{int}}} \quad -3b-$$

Expandase (EXP)

$$R_{\text{EXP}} = \frac{k_{\text{DAOC}} \cdot A_{\text{EXP}}}{(1 + K_{\text{PENN}} / \text{PENN}_{\text{int}}) \cdot (1 + K_{\text{O}_2} / \text{O}_{2\text{int}})} \quad -4-$$

Hydroxylase (HYD)

$$R_{\text{HYD}} = \frac{K_{\text{DAC}} \cdot A_{\text{HYD}}}{1 + K_{\text{DAOC}} / \text{DAOC}_{\text{int}}} \quad -5-$$

Acetyltransferase (ACT)

$$R_{\text{ACT}} = \frac{k_{\text{CPC}} \cdot A_{\text{ACT}}}{(1 + K_{\text{DAC}} / \text{DAC}_{\text{int}}) \cdot (1 + \text{PENN}_{\text{int}} / K_{\text{inhPenN}} + \text{DAOC}_{\text{int}} / K_{\text{inhDAOC}})} \quad -6-$$

Auf der Basis der beschriebenen biosynthetischen Reaktionen lassen sich die Massenbilanzen für jeden Metaboliten der Cephalosporin C-Biosynthese wie folgt beschreiben /Pissara *et al.*, 1996/ :

$$\frac{d\text{MET}_{\text{int}}}{dt} = \sum Y_i \cdot R_{\text{ENZ}} - \mu \cdot \text{MET}_{\text{int}} \quad -7-$$

Hierbei ist MET_{int} die intrazelluläre Konzentration des Metabolites, z.B. CPC_{int} , während R_{ENZ} die Aktivität des jeweiligen Enzyms darstellt. Der Koeffizient Y_i ist positiv für das Produkt, aber negativ für den Reaktanten.

Das spezifische Zellwachstum μ lässt sich allgemein wie folgt beschreiben :

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad -8-$$

Dabei ist X, die in diesem Fall off-line gemessene Biotrockenmasse. Die in der Zelle gebildeten Metabolite können durch die Zellmembran in das Medium exkretiert werden. Diese Exkretion kann auch durch die Diffusion erfolgen, deren Kinetik wie folgt beschrieben werden kann /Malmberg *et al.*, 1992a/ :

$$R_{\text{sec MET}} = k_{\text{sec MET}} \cdot (\text{MET}_{\text{int}} - \text{MET}_{\text{ext}}) \quad -9-$$

Die nachfolgenden Gleichungen beschreiben vereinfacht die Massenbilanzen für jeden intrazellulären und extrazellulären Metaboliten. Zur Berechnung der Penicillin N-Konzentration wird angenommen, daß die Reaktion zwischen IPN und PENN sehr schnell ist und ein nahezu äquimolares Verhältnis zwischen IPN und PENN vorliegt /Malmberg *et al.*, 1992/.

Für LLD-ACV :

$$\frac{d\text{ACV}_{\text{int}}}{dt} = (R_{\text{ACVS}} - R_{\text{IPNS}} - R_{\text{sec PENN}}) - \mu \cdot \text{ACV}_{\text{int}} \quad -10a-$$

$$\frac{d\text{ACV}_{\text{ext}}}{dt} = X \cdot \text{RhoSp} \cdot k_{\text{sec ACV}} \cdot (\text{ACV}_{\text{int}} - \text{ACV}_{\text{ext}}) \quad -10b-$$

Für PENN (=IPN) :

$$\frac{dPENN_{int}}{dt} = 0.5 \cdot (R_{IPNS} - R_{exp} - R_{sec\ PENN}) - \mu \cdot PENN_{int} \quad -11a-$$

$$\frac{dPENN_{ext}}{dt} = X \cdot RhoSp \cdot k_{sec\ PENN} \cdot (PENN_{int} - PENN_{ext}) \quad -11b-$$

Für DAOC :

$$\frac{dDAOC_{int}}{dt} = (R_{EXP} - R_{HYD} - R_{sec\ DAOC}) - \mu \cdot DAOC_{int} \quad -12a-$$

$$\frac{dDAOC_{ext}}{dt} = X \cdot RhoSP \cdot k_{sec\ DAOC} \cdot (DAOC_{int} - DAOC_{ext}) \quad -12b-$$

Für DAC :

$$\frac{dDAC_{int}}{dt} = (R_{HYD} - R_{ACT} - R_{sec\ DAC}) - \mu \cdot DAC_{int} \quad -13a-$$

$$\frac{dDAC_{ext}}{dt} = X \cdot RhoSp \cdot k_{sec\ DAC} \cdot (DAC_{int} - DAC_{ext}) \quad -13b-$$

Für CPC :

$$\frac{dCPC_{int}}{dT} = (R_{ACT} - R_{sec\ CPC}) - \mu \cdot CPC_{int} \quad -14a-$$

$$\frac{dCPC_{ext}}{dt} = X \cdot RhoSP \cdot k_{sec\ CPC} \cdot (CPC_{int} - CPC_{ext}) \quad -14b-$$

Die verwendeten experimentellen Daten entstammen einer Kultivierung, die mit erhöhter Valinkonzentration durchgeführt wurde. Der Verlauf der Enzymaktivitäten ist in Kapitel 4.5 dargestellt und ausführlich erläutert. Der für die Simulation verwendete Verlauf der intrazellulären Konzentrationen der drei Precursoraminosäuren ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

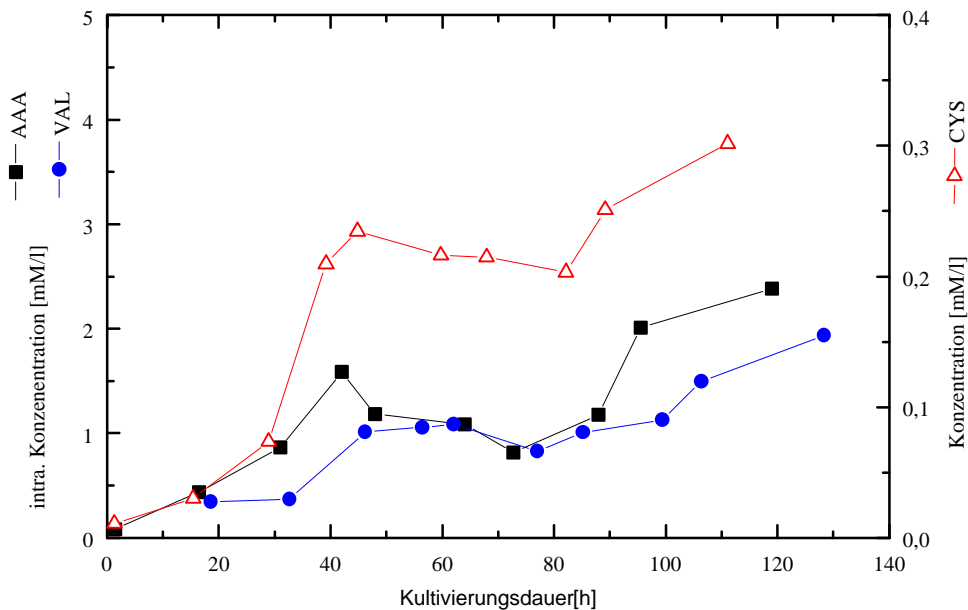


Abb. 4.24 : Verlauf der intrazellulären Konzentrationen von α -AAA, Cys und Val

In den nachfolgenden zwei Abbildungen (Abb. 4.25 und 4.26) sind die simulierten Verläufe der Produktkonzentrationen den mit der HPLC bestimmten off-line Werten gegenübergestellt. Zusätzlich ist in Abbildung 4.25 der Verlauf der Biotrockenmasse bei dieser Kultivierung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß das entwickelte Modell noch mit Fehlern behaftet ist, es aber schon eine ausreichende Genauigkeit in Bezug auf die Verläufe der Penicillin N-, DAOC-, DAC- und Cephalosporin C-Konzentration liefert. Der Fehler bei der ACV-Konzentration kann in der überhaupt sehr geringen Menge an extrazellulär meßbaren ACV liegen, was demnach eine hohe Fehlergrenze bedeutet. Erkennbar ist eine gute Übereinstimmung von simulierten zu experimentellen Werten in der exponentiellen Wachstumsphase des Pilzes.

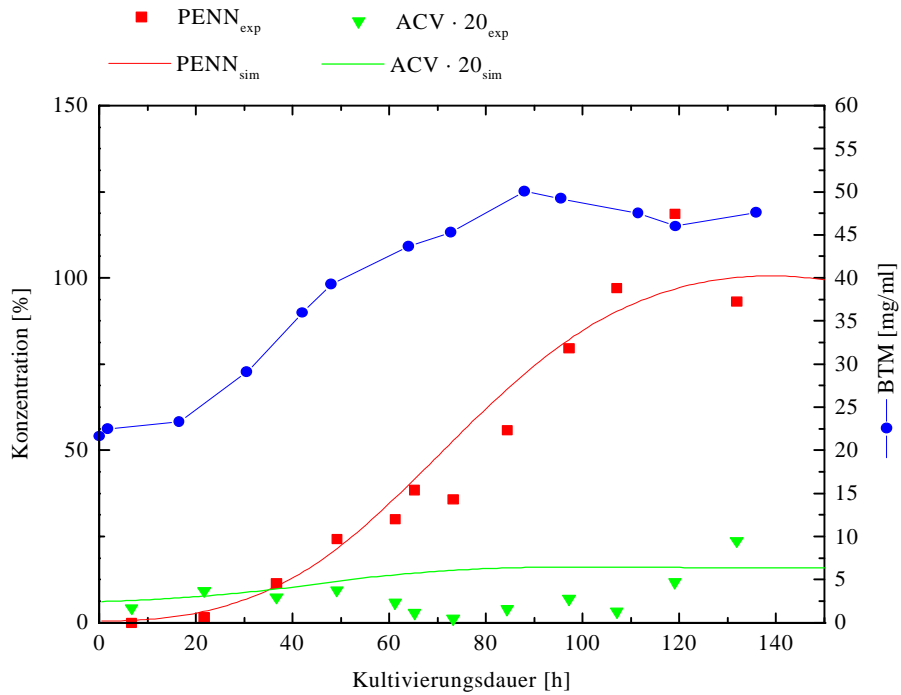


Abb. 4.25 : Simulation der PENN- und ACV-Konzentration

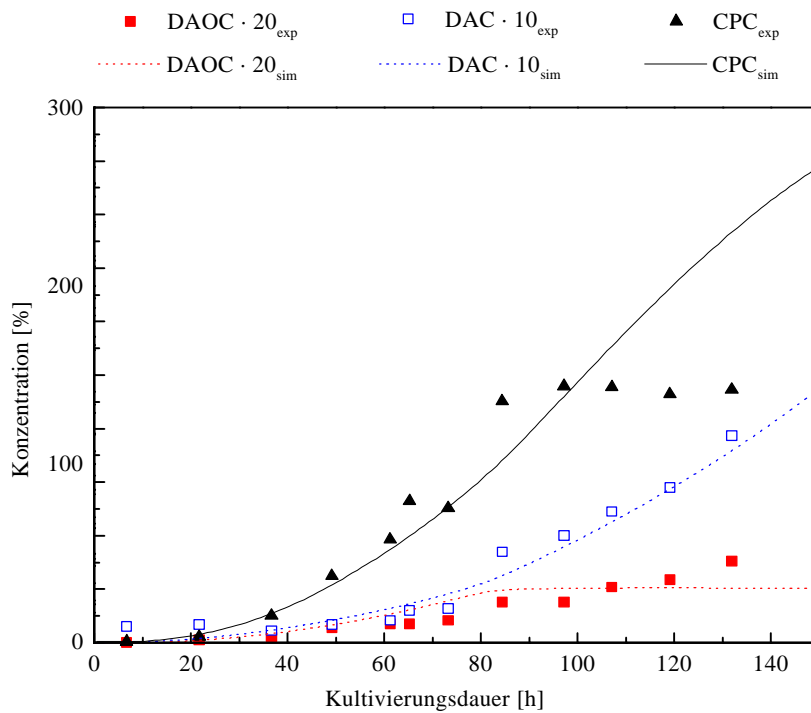


Abb. 4.26 : Simulation der DAOC-, DAC- und CPC-Konzentration

Im Hinblick auf die Hauptproduktkonzentration des Cephalosporin C liefert das Modell in den ersten 100 Stunden gute Werte, danach werden allerdings schnell die Grenzen aufgezeigt, da es nicht möglich ist, die Stagnation der Produktion hier zu erfassen, was auf fehlende Daten zurückzuführen ist. Bei Betrachtung der vorher durchgeführten Kohlenstoffbilanz zeigt sich, daß beide Modelle zur gleichen Zeit Probleme aufweisen, was auf die mangelnde Charakterisierung der Zwischenprodukte zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist.

Aus den dargestellten Meßwerten und Simulationen können jedoch die oben als geschätzte Parameter eingebrachten Werte charakterisiert und wie folgt angegeben werden.

Parameter	Wert	Parameter	Wert
k_{ACV}	8000.1	$K_{inhDAOC}$	1,43 mM
k_{IPN}	3,909	k_{secACV}	0,00024 1/h
k_{DAOC}	0,7809	$k_{secPENN}$	0,00549 1/h
k_{DAC}	5,527	$k_{secDAOC}$	0,00102 1/h
k_{CPC}	0,206	k_{secDAC}	0,00101 1/h
$K_{inhPENN}$	0,86 mM	k_{secCPC}	0,0853 1/h

Tab. 4.3 : Aus dem Modell identifizierte Parameter

Neben der kinetischen Analyse der Biosynthese des Cephalosporin C kann mit Hilfe der gewonnenen Daten der Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Produktion von PENN und CPC untersucht werden. Die Produktion der Antibiotika wurde in unterschiedlichen Gelöstsauerstoffkonzentrationen (5% (= 0,0211mM), 10% (= 0,03329mM), 20% (=0,05769mM), 40% (=0,10649mM), 50% (=0,0211mM) und 70% (=0,1797mM)) simuliert und bestätigt die experimentell gewonnenen Erkenntnisse /Zhou *et al.*, 1992/.

Die Penicillin N-Konzentration (Abb.4.27) zeigt den gewohnten sigmoiden Verlauf. Bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 5% bildet sich mehr als die dreifache Menge dieses Nebenproduktes, als bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 70%. Deutlich zu erkennen ist die hierzu umgekehrt verlaufende Konzentration an Cephalosporin C (Abb. 4.28), bei der sich die entsprechende bessere Sauerstoffversorgung (70% gegenüber 5%) in einem bis zu sechs mal höheren Antibiotikatiter äußert.

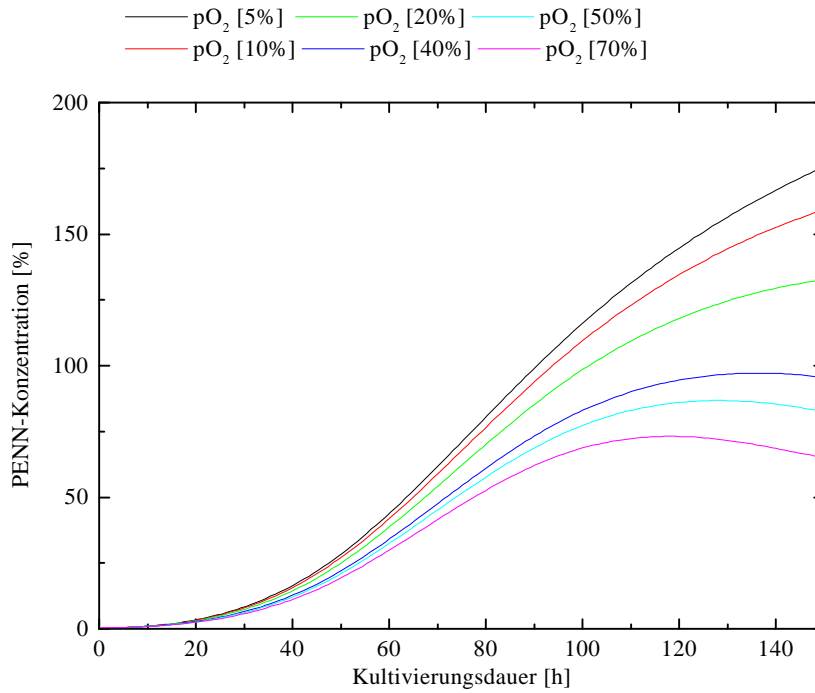


Abb. 4.27 : Simulation der Penicillin N-Konzentration bei unterschiedlichen Gelöstsauerstoffkonzentrationen

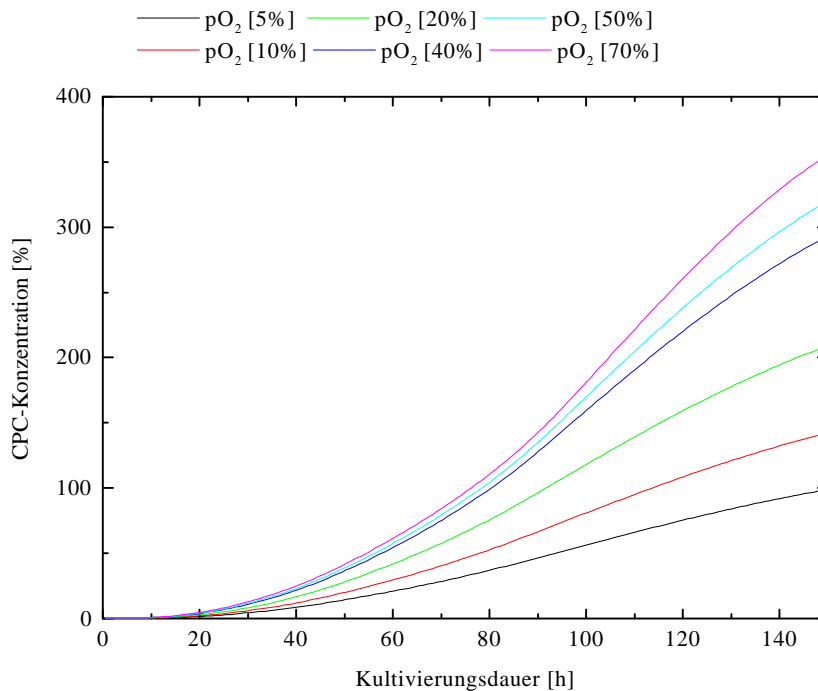


Abb. 4.28 : Simulation der Cephalosporin C-Konzentration bei unterschiedlichen Gelöstsauerstoffkonzentrationen

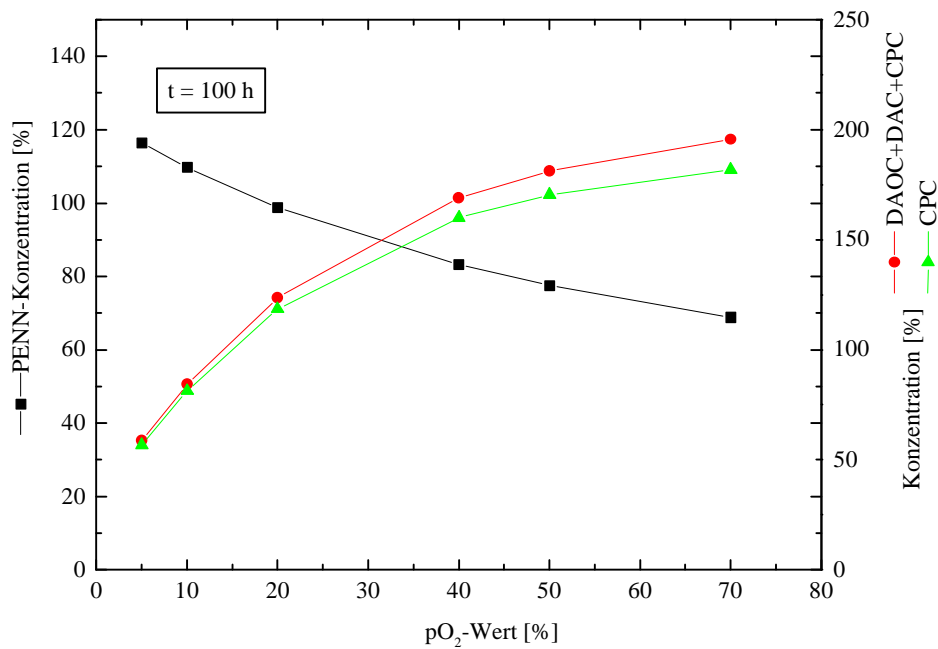


Abb. 4.29 : Einfluß der Variation des pO₂-Wertes bei t=100h auf die β -Lactam-Verteilung

Abbildung 4.29 zeigt noch deutlicher den Zusammenhang zwischen β -Lactam-Konzentrationen und dem pO₂-Wert. In der Hauptproduktionsphase nach 100 Stunden einer Kultivierung macht die Variation der Gelöstsauerstoffkonzentration klar, wie wichtig eine ausreichende Sauerstoffversorgung für das Lenken der Produktion zum Hauptprodukt Cephalosporin C hin ist. Hier wird deutlich, daß die Unterversorgung des Systems mit Sauerstoff dazu beitragen kann, daß sich Penicillin N anreichert. Ausschlaggebend hierfür ist meistens die hohe Viskosität des Produktionsmediums, welches schon allein aufgrund dieser Tatsache verdünnt werden muß.

4.2 Kultivierungen in synthetischen Medien

4.2.1 Entwicklung, Probleme und erste Anwendungen

Während der Diplomarbeit von Jürgens /1997/ wurde ein synthetisches, chemisch genau definiertes Medium für Schüttelkulturen entwickelt. Dieses Medium wird im Rahmen dieser Arbeit über Kultivierungen im 10L-Maßstab auf den 30L fassenden Pilotfermenter übertragen. Diese Strategie ist nicht völlig neu, da auch schon früher in synthetischen Medien mit *Acremonium chrysogenum* gearbeitet wurde. Allerdings standen den Laboratorien damals wie auch heute fast nur niedrigproduzierende Stämme zur Verfügung, so daß hier erstmals das Verhalten eines Produktionsstammes in Minimalmedien und dessen mögliche Anpassung an seine Umgebung untersucht werden konnte. Der Ansatz diente dazu, die im Komplexmedium auftretenden Probleme wie die Biomassebestimmung zu umgehen bzw. neue optische Analysemethoden einzusetzen. Durch spätere Vergleiche und Umrechnungen sollte es möglich sein, fehlende Daten des Komplexmediums durch simulierte oder berechnete Daten aus dem Vergleich mit dem synthetischen Medium zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde die Zusammensetzung des synthetischen Mediums möglichst nahe am Komplexmedium gewählt, d.h. alle Grundkomponenten mit Ausnahme des Corn-Steep-Liquors werden verwendet. Zudem wird der enthaltene Trockenglucosesirup durch reine Glucose ersetzt.

Der Einsatz von Schüttelkulturen bringt für solche Kultivierungen typische Probleme mit sich, auf die im folgenden kurz eingegangen wird. Die größten Schwierigkeiten treten bei der pH-Wert-Kontrolle und der Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf, welches essentielle Werte für die Cephalosporin C-Produktion sind. Während der Verlauf des pH-Wertes durch Einsatz von Puffersystemen kontrolliert werden kann (Abb. 4.30), bleibt der pO_2 -Wert eine geschätzte Größe und wird basierend auf Erfahrungswerten als ausreichend betrachtet. In Abbildung 4.30 sind die pH-Wert-Verläufe verschiedener Schüttelkulturen aufgetragen. In diesen Experimenten wurde unterschiedliche Puffersysteme getestet, um den pH-Wert im Bereich zwischen 6,5 und 5,8 zu halten. Aus der Abbildung wird deutlich, daß der für diese Schüttelkulturen optimale pH-Verlauf beim Einsatz eines MES-Puffers mit einer Konzentration von 100mM erreicht wird, d.h. diese Kultivierung zeigt einen dem Fermentermaßstab entsprechenden Verlauf. Zudem ist deutlich erkennbar, daß bei Versagen des Puffersystems der pH-Wert positiven und negativen Schwankungen in Bezug auf den

Normalverlauf unterworfen ist, so daß Werte aus diesen Kultivierungen nur mit äußerster Vorsicht zu betrachten sind.

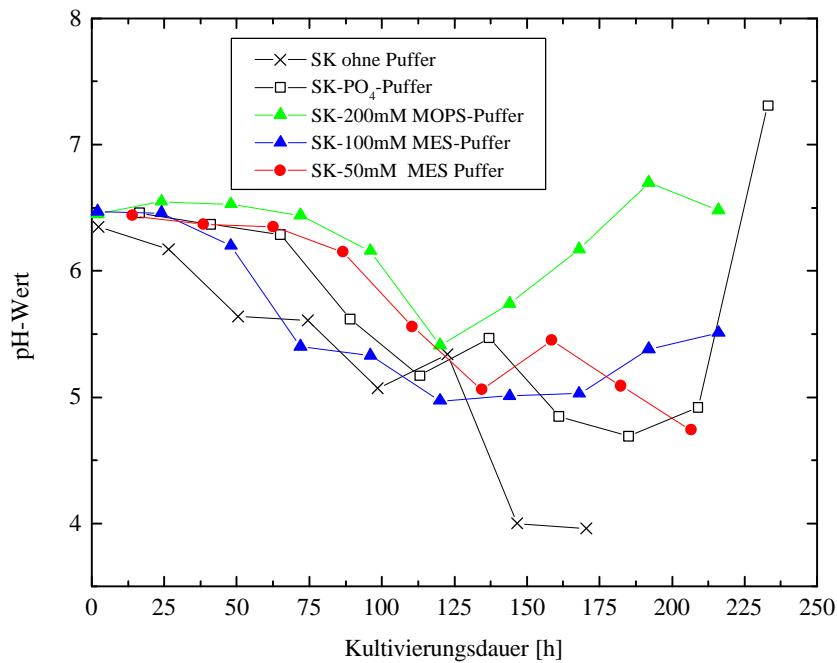


Abb. 4.30 : Verlauf des pH-Wertes mit unterschiedlichen Puffersystemen /Jürgens 1997/

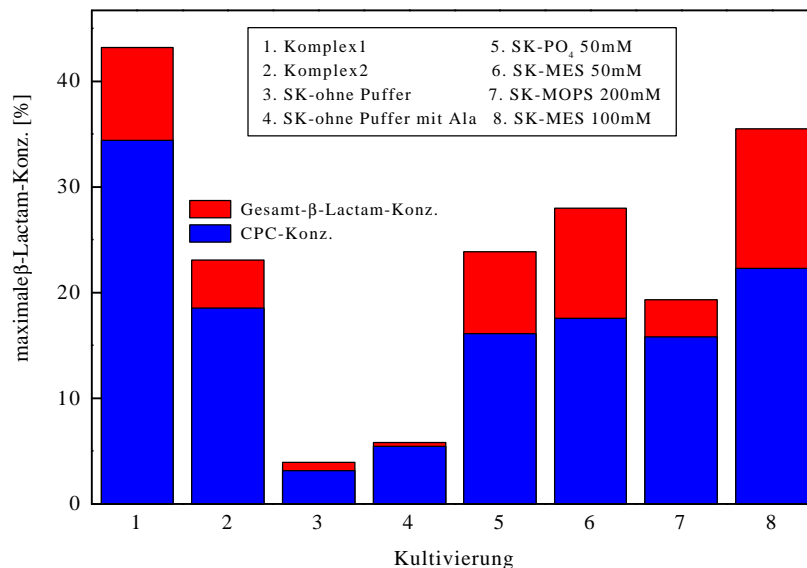


Abb. 4.31 : Gesamt-β-Lactam-Konzentrationen in den getesteten Schüttelkulturmedien

Interessanterweise zeigt *Acremonium chrysogenum* in allen verwendeten Medien eine deutliche β -Lactam-Produktion, so daß ein upscaling des Versuchsansatzes nahe liegt. Die Abbildung 4.31 zeigt die durchschnittlichen Gesamt- β -Lactam-Konzentrationen und macht deutlich, daß im synthetischen Medium im Schüttelkolben mit 34 % die Produktkonzentration nahezu den Wert des Komplexmediums erreicht (43 %). Die in der Abbildung 4.31 aufgeführten Komplexschüttelmedien unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung nur in der Behandlung des Corn-Steep-Liquors. Bei der Kultivierung Komplex 2 wurde der Corn-Steep-Liquor getrennt autoklaviert und zentrifugiert, um zu testen inwieweit er ganz weggelassen werden kann, da auch hier ein möglichst geringer Feststoffgehalt das Ziel ist. Zusätzlich ist eine Kultivierung mit Alaninzusatz (SK 4) dargestellt, die verdeutlichen soll, daß der Zusatz dieser Aminosäure schon im Schüttelkolbenmaßstab eine Produktivitätssteigerung mit sich bringt (vergleiche SK 3). Genauere Beschreibungen der einzelnen Kultivierungsverläufe und Medienzusammensetzungen finden sich bei Jürgens /1997/. Aus den Abbildungen wird deutlich, daß die Schwierigkeiten der pH-Wert-Regulierung in den Schüttelkulturen nicht vollständig umgangen werden können.

Zudem treten Probleme durch die lange Versuchszeit auf und auch die Probenahme bringt Schwierigkeiten mit sich. Es kann also gesagt werden, daß die Schüttelkulturen nur geeignet sind, um eventuelle Medien auf Wachstum und Produktion zu testen. Diese Ergebnisse sind jedoch, aufgrund der auftretenden Probleme schwer auf den Fermentermaßstab zu übertragen, so daß auf jeden Fall ein Test im Reaktormaßstab erfolgen muß, da nur hier eine kontinuierlich Probenahme, eine pH-Wert-Regulierung und die pO_2 -Wert-Kontrolle gewährleistet ist. Aus diesem Grunde wurde auf weitere Schüttelkulturen verzichtet. Das Medium der SK 8 wurde ohne MES-Puffersystem auf den 10L-Fermenter berechnet und eingesetzt. Zusätzlich wurden die Aminosäuren Alanin, Valin und Serin zugefügt. Es werden zwei Kultivierungen im 10L-Maßstab durchgeführt, bevor mit folgender Medienzusammensetzung der 30L Fermenter benutzt wird.

Substanz	Menge [g]	Konz [g/l]
Glucose	1050	35
NH ₄ SO ₄	126	4,2
Na ₂ SO ₄	150	5
KH ₂ PO ₄	93	3,1
L-Valin	30	1
DL-Alanin	60	2
L-Asparagin	100	3,33
L-Methionin	440	14,67
L-Serin	30	1
Sojaöl	600	20
Desmophen 3900	30 ml	1 ml
MgSO ₄	200	6,67
FeSO ₄	2,7	0,09
MnSO ₄	0,9	0,03
ZnSO ₄	0,6	0,02
CuSO ₄	0,6	0,02
Harnstoff	63	2,1

Tab. 4.4 : Synthetisches Medium für den 30L-Reaktor

4.2.2 Wachstum im 30L-Reaktor

Der Verlauf des Wachstums im 30L-Reaktor wird anhand einer Kultivierung kurz dargestellt und soll aufzeigen, daß die gewonnenen Daten zufriedenstellend mit denen der Komplexmedien verglichen werden können.

Acremonium chrysogenum zeigt in dem synthetischen Medium einen erwarteten Wachstumsverlauf (Abb. 4.32). Der pO₂-Wert unterschreitet nicht die 60%, was aufgrund der geringen Viskosität des Mediums allein durch Preßluftbegasung erreicht werden konnte. Durch Regelung des pH-Wertes wird ein optimales pH-System garantiert. Es wird auch hier zum Vergleich für die Kultivierungen im komplexen Medium die Kohlendioxidproduktionsrate (CPR) als on-line Beobachtungsparameter für das Wachstum verwendet.

Ergebnisteil - Kultivierungen in synthetischen Medien

Es ist eine etwas verlängerte Lagphase und eine dem diauxischen Wachstum entsprechende Stoffwechsellumstellung nach 80h zu erkennen. Bei weiterer Betrachtung des Verlaufes der Kohlendioxidproduktionsrate wird allerdings deutlich, daß der Pilz in diesem Medium länger braucht, um sich auf Sojaöl als Kohlenstoffquelle umzustellen. Dies liegt in dem bis zu diesem Zeitpunkt synthetisierten Enzymspektrum begründet. Da nur Glucose als Kohlenstoffquelle vorliegt, werden vermutlich weniger Lipasen bis zu diesem Zeitpunkt freigesetzt. Im komplexen Medium wird die Ausbildung eines kompletten Enzymspektrums schon in der 2. Vorkultur angeregt, zudem fordert der Corn-Steep-Liquor ein erheblich breiteres Spektrum an substratspaltenden Enzymen.

In Abbildung 4.33 wird die off-line gemessene Glucosekonzentration in Bezug zur Fluoreszenzintensität bei 370nm/450nm gesetzt. Der verwendete Biowiew 2D-Fluoreszenz-Sensor erlaubt nach Lindemann /1998/ eine Beobachtung der Verstoffwechslung der Glucose, da eine Korrelation der off-line gemessenen Zuckerkonzentrationen und des Fluoreszenzverlaufes bei dem Wellenlängenpaar 370nm/450nm vorliegt. Zu Beginn der Kultivierung wird die Glucose von den Zellen verstoffwechselt und ist nach ca. 90h verbraucht. Dem Fluoreszenzverlauf zufolge wird das Sojaöl zu einem gewissen Teil mit der Glucose metabolisiert und wird nach Verbrauch des Zuckers zur alleinigen Kohlenstoffquelle, die auch beim Abbruch der Kultivierung noch nicht vollständig verbraucht ist. Ein Vergleich dieser Fluoreszenzdaten mit den Ergebnissen einer Sojaölanalytik würde die Interpretation vereinfachen, da in dem beobachteten Wellenlängenbereich auch das Fluoreszenzmaximum des NAD(P)H liegt, dessen Konzentration mit dem Zellwachstum zunimmt. Bei der Kultivierung im Komplexmedium wurde in diesem Wellenlängenbereich ein ähnlicher Verlauf gemessen, eine ausführlichere Betrachtung der Kulturfluoreszenz findet sich im späteren Verlauf dieser Arbeit (Kap. 4.3).

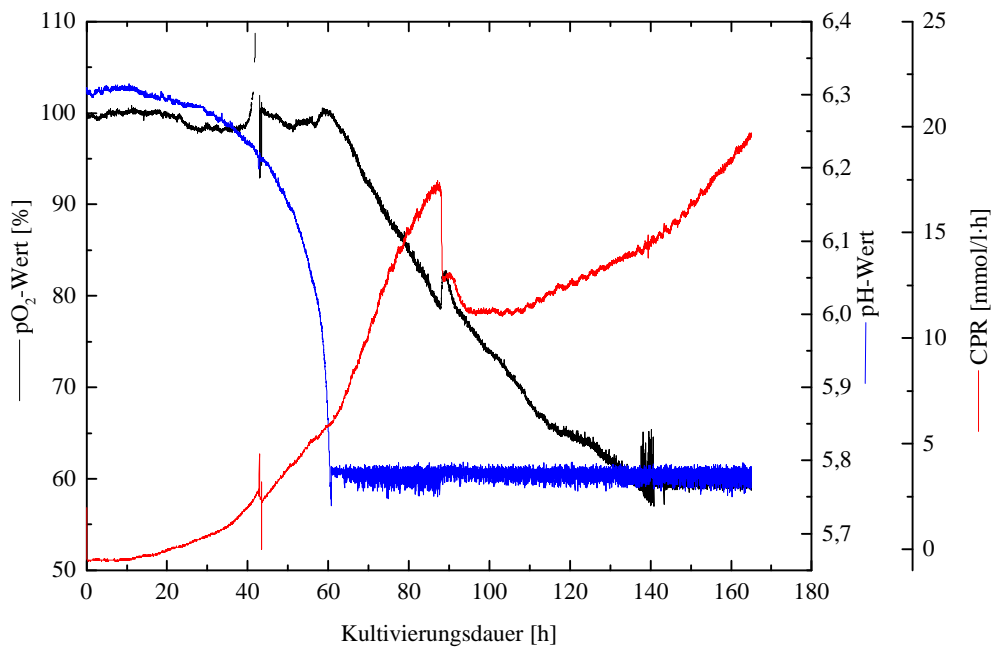


Abb. 4.32 : Verlauf von pO₂-Wert, pH-Wert und CPR im synthetischen Medium

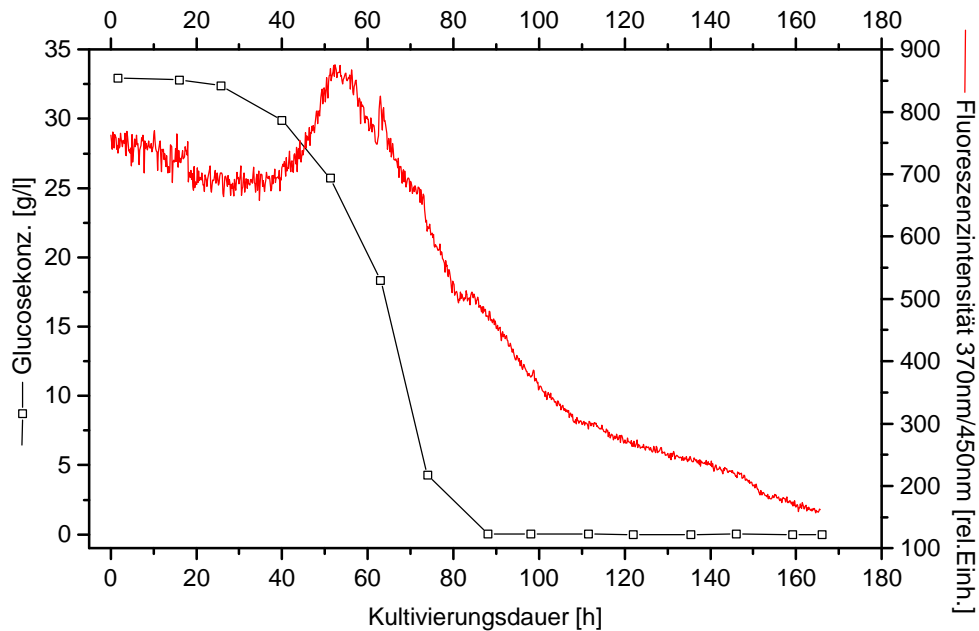


Abb. 4.33 : Fluoreszenzverlauf bei 370nm/450nm und Glucosekonzentration während der Kultivierung im Minimalmedium /Lindemann 1998/.

Zusätzlich zur Messung der Kohlendioxidproduktionsrate konnte in dem definierten Medium eine off-line OD-Bestimmung erfolgen. Da kein Feststoff vorhanden ist, sollte darüber direkt auf die absolute Biomasse geschlossen werden können.

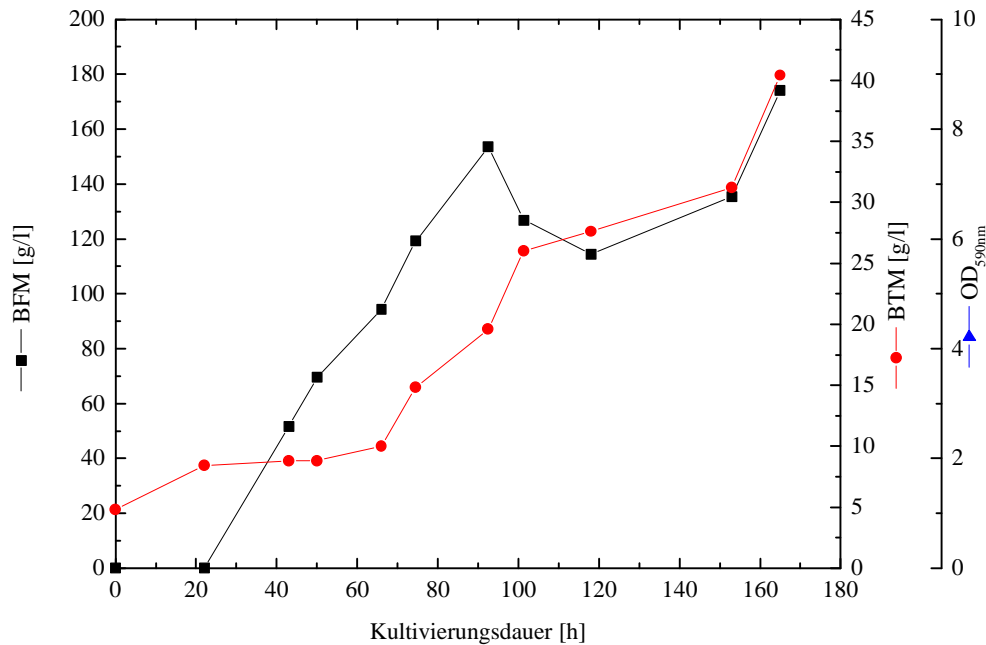


Abb. 4.34 : Wachstum im definierten Medium anhand von BFM, BTM und OD_{590nm}

In Abbildung 4.34 ist die recht gute Korrelation zwischen den drei Parametern BTM, BFM und OD_{590nm} zu erkennen, der zu Beginn der Kultivierung schnellere Anstieg in der Biofeuchtmasse ist durch den größeren Fehler in der Bestimmung des Gewichtes der Feuchtmasse zu erklären, da die Sedimente sehr klein und somit schwer zu vermessen sind. Der Verlauf der Biotrockenmasse hingegen spiegelt wie der CPR-Verlauf alle charakteristischen Wachstumsphasen wieder. So ist deutlich die Lagphase bis ca. 50h, die exponentielle Wachstumsphase und auch ein stationärer Zustand ab der 100h zu erkennen. Nicht auszumachen ist eine Absterbephase, was darauf hindeutet, daß die Kultivierung im Bezug auf die Biomassebildung noch nicht abgeschlossen gewesen ist.

Auch hier kann eine Korrelation mit den Fluoreszenzdaten hergestellt werden. Der Fluoreszenzverlauf im Streulichtbereich des BioView-Sensors (Abb. 4.35) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit sämtlichen Änderungen im Kurvenverlauf der optischen Dichte, so daß der Sensor zum Verfolgen des Wachstum durchaus geeignet ist /Lindemann 1998/.

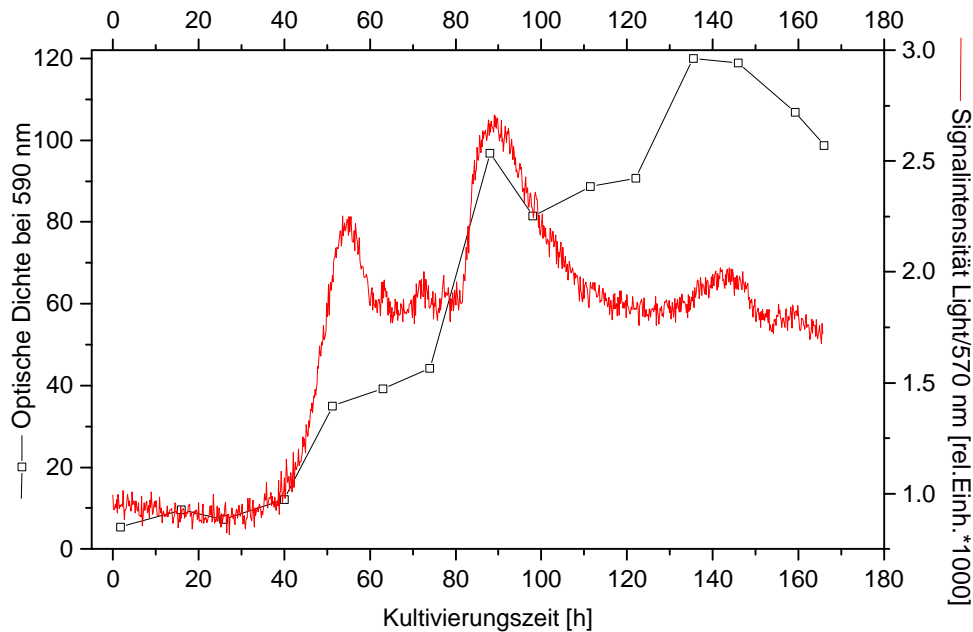


Abb. 4.35 : Intensität im Streulichtbereich und optische Dichte bei der Kultivierung im Minimalmedium /Lindemann 1998/.

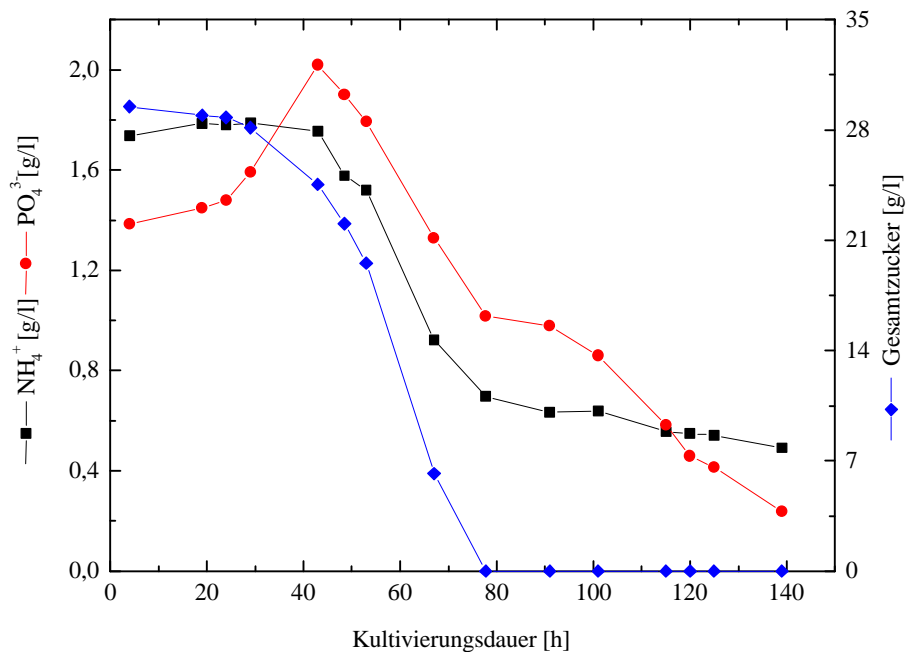


Abb. 4.36 : Ammonium-, Phosphat- und Gesamtzuckergehalt.

In Abbildung 4.36 ist der Verlauf der Ammoniumkonzentration sowie die Verläufe der Phosphatkonzentration und des Gesamtzuckergehaltes dargestellt. Aus der Graphik wird deutlich, daß im synthetischen Medium ein etwas anderer Verlauf dieser Substrate vorliegt. So erfolgt zunächst ein kurzer Anstieg in der Phosphatkonzentration, was nur durch weitere Untersuchungen sicher zu erklären wäre. Ab der fünfzigsten Stunde wird das Phosphat mit der Glucose parallel aufgenommen, um die Metabolisierung der Glucose zu vervollständigen. Am Ende erfolgt im Gegensatz zu den Kultivierungen im komplexen Medien kein Anstieg der Phosphatkonzentration, da die Zellyse noch nicht fortgeschritten ist bzw. die Aufnahme rate durch nachwachsende Zellen immer noch über der Abgaberate durch absterbende Zellen liegt. Die Glucose hingegen wird innerhalb der ersten achtzig Stunden komplett verstoffwechselt. Der Verlauf der Ammoniumkonzentration ist sehr ähnlich den Verläufen im komplexen Medium, allerdings zeitlich etwas verschoben. So wird auch hier kein Minimum durchlaufen.

4.2.3 Betrachtung der extrazellulären Aminosäuren

Im folgenden werden die gleichen extrazellulären Aminosäuren untersucht, die auch bei den Kultivierungen im komplexen Medium betrachtet werden. Abbildung 4.37 zeigt die Aufnahme der dem Medium zugesetzten wichtigen Aminosäuren Methionin, Alanin und Asparagin.

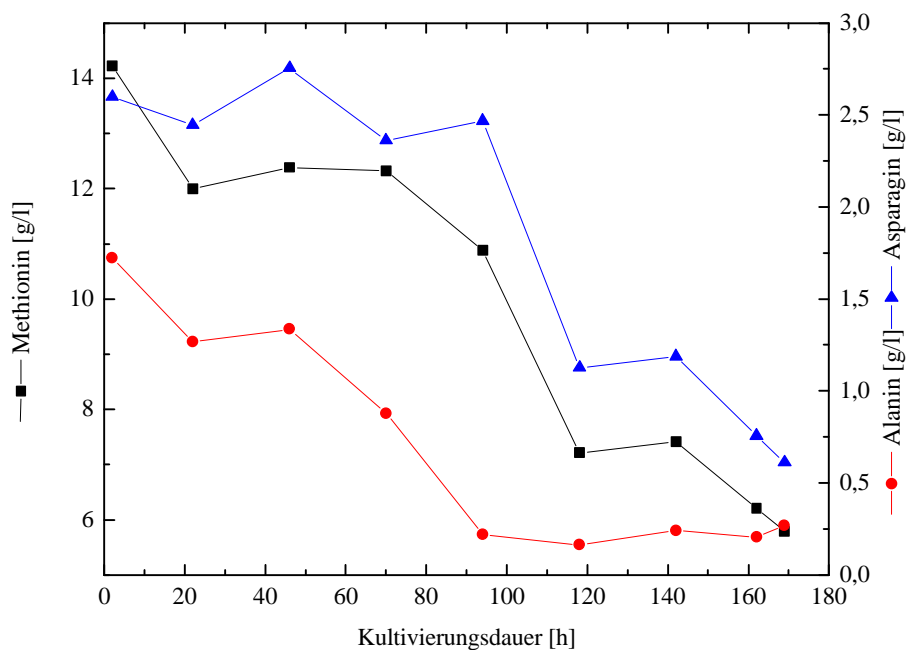


Abb. 4.37 : Verlauf der extrazellulären Methionin-, Alanin- und Asparaginkonzentrationen.

Ergebnisteil - Kultivierungen in synthetischen Medien

Alle drei Aminosäuren werden von *Acremonium chrysogenum* auch im synthetischen Medium verwertet. Es wird jedoch deutlich, daß Methionin wesentlich langsamer als im komplexen Medium aufgenommen wird, was auf die sehr spät einsetzende Cephalosporin C-Biosynthese zurückzuführen ist. L-Alanin wird sehr schneller als Methionin aufgenommen, ist allerdings aber auch erst nach 100 Stunden vollständig verstoffwechselt. Die Aufnahme des Asparagins beginnt sogar erst nach 100 Stunden, also auch wesentlich später als bei Kultivierungen in komplexen Medien. Die Verläufe deuten darauf hin, daß *Acremonium chrysogenum* seinen Energiestoffwechsel zunächst völlig auf der im Medium in hoher Konzentration vorliegenden Glucose aufbaut und die Aminosäuren nur als Begleitsubstrate benutzt. Sie scheinen demzufolge für das Wachstum in diesem Fall nicht so essentiell zu sein.

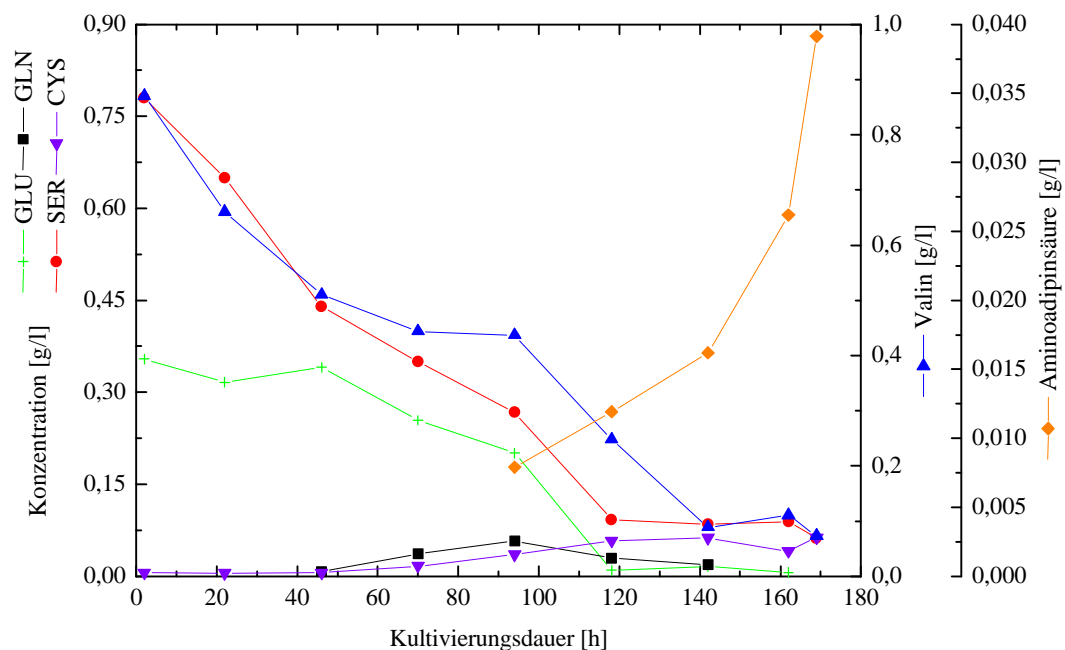


Abb. 4.38 : Verlauf ausgewählter extrazellulärer Aminosäurekonzentrationen.

Die Betrachtung der anderen ausgewählten extrazellulären Aminosäuren in Abbildung 4.38 vermittelt einen ähnlichen Verlauf wie im komplexen Medium. Glutamat wird während der gesamten Wachstumsphase bis zur 120. Stunde aufgenommen, während Glutamin sich ab der 40. Stunde zunächst im Medium ansammelt und erst nach 140 Stunden aufgenommen wird. Die dem Medium zugesetzten Aminosäuren Valin und Serin werden ebenfalls über die gesamte Kultivierung aufgenommen und sind selbst nach 160 Stunden noch nachzuweisen. Dies deutet auf eine Überversorgung hin bzw. ist ein Anzeichen dafür, daß die Biosynthese des Cephalosporin C im synthetischen Medium gehemmt ist.

Ähnlich wie im komplexen Medium reichern sich die Aminosäuren Cystein und Amino adipinsäure im Medium zum Ende der Kultivierung an, was ebenfalls als Hinweis auf eine Stagnation der Produktsynthese im Sekundärstoffwechsel zu werten ist.

4.2.4 Verlauf der Produktbildung und Enzymaktivitäten

Die folgende Abbildung 4.39 zeigt den zu der Kultivierung im synthetischen Medium gehörenden Produktverlauf. Es ist zu erkennen, daß *Acremonium chrysogenum* im chemisch definierten Medium parallel zum Primärstoffwechsel auch den Sekundärstoffwechsel aktiv hält. Eine Cephalosporin C-Produktion ist ab der vierzigsten Stunde zu verzeichnen, die nach 80 Stunden kurz stagniert, dann jedoch exponentiell ansteigt und zum Ende der Kultivierung eine Cephalosporin C-Ausbeute von 39,83 % erreicht. Bei Betrachtung der Cephalosporin C-Produktbildungsrate ist auch hier zu erkennen, daß die Kultivierung auch noch länger eine Zunahme des Titters mit sich geführt hätte, da der letzte Abknick durchaus periodisch zu sehen ist. Die Verläufe der Precursoren zeigen ein aus früheren Kultivierungen bekanntes Bild, wobei die Penicillin N-Konzentration äußerst niedrig ist, was auf die sehr gute Sauerstoffversorgung zurückzuführen ist. Ebenso sind die anderen beiden Nebenprodukte relativ gering konzentriert, was auch darauf hindeutet, daß die Biosynthese noch nicht zum Erliegen gekommen ist.

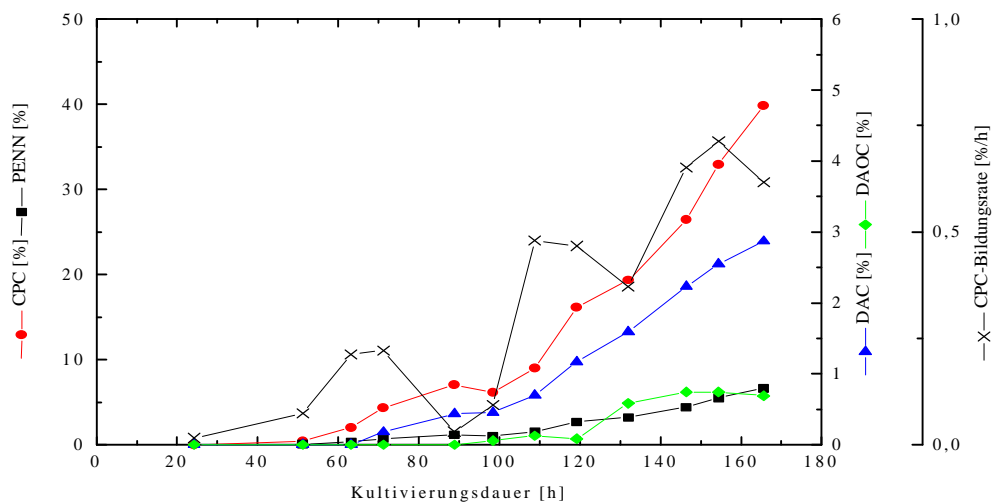


Abb. 4.39 : Produktverlauf bei einer Kultivierung im Minimalmedium.

Um einen genaueren Einblick in den Verlauf der Biosynthese des Cephalosporin C auch im synthetischen Medium zu erhalten, wird versucht, auch hier ein komplettes Enzymspektrum der biosynthetisch wichtigen Enzyme zu messen.

Es stellt sich jedoch heraus, daß aufgrund der sehr geringen Konzentrationen der intrazellulären Produkte es nur bei zwei Enzymen möglich ist, über den gesamten Kultivierungsverlauf reproduzierbare Daten zu gewinnen.

Die spezifische Aktivität der ACV-Synthetase ist in Abbildung 4.40 dargestellt. Eine meßbare ACV-Konzentration liegt erst nach ca. 40 Stunden vor, danach steigt die Aktivität der ACVS exponentiell an und erreicht ihr Maximum nach 90 Stunden. Erstaunlicherweise ist aber danach kein starker Abfall zu beobachten, sondern eine nahezu stationäre Phase bis zur 150. Stunde. Zu dieser Zeit durchläuft die Biosynthese ihr Maximum an Produktivität, demzufolge kann hier nicht direkt auf einen Engpaß bei der ACVS-Aktivität geschlossen werden. Das zweite kleine Maximum deutet auf ein erneutes Aktivieren des Stoffwechsels hin und korreliert mit dem Anstieg in der Biomasse. Danach kommt es jedoch zum Einbruch in der Aktivität, weil vermutlich zu diesem Zeitpunkt nicht genug aktive Zellen nachwachsen.

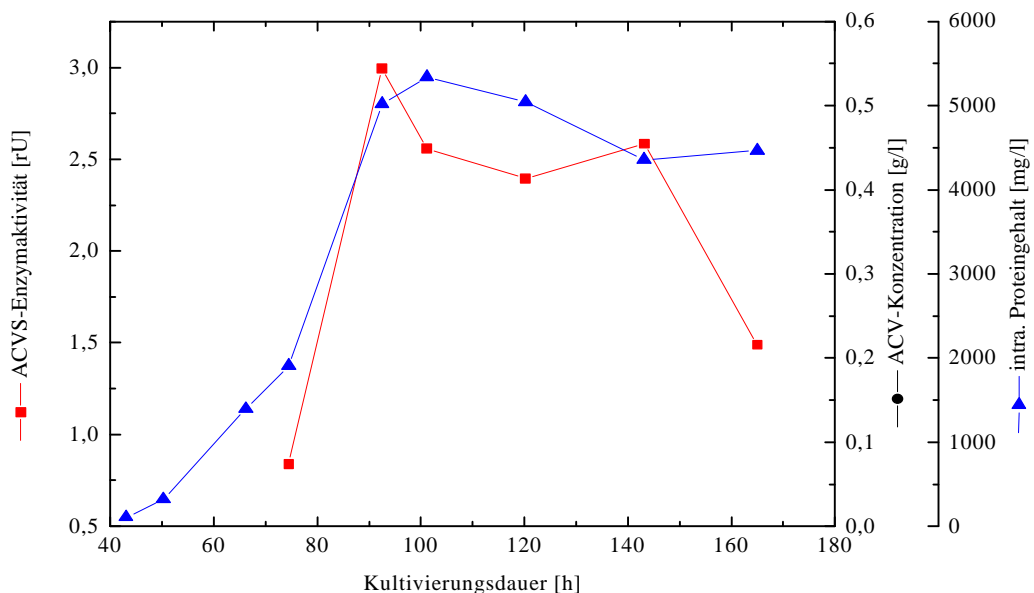


Abb. 4.40 : Spezifische Aktivität der ACVS, die ACV-Konzentration und der intrazelluläre Proteingehalt.

Auch bei den Kultivierungen im synthetischen Medium ist eine Bestimmung der ACVS-Aktivität zur Routine geworden. Es kann festgehalten werden, daß die spezifische Aktivität der ACVS im synthetischen Medium bei den betrachteten Kultivierungen sogar größer ist als im komplexen Medium. Dies kann in erster Linie auf den Proteingehalt zurückgeführt werden, der hier wesentlich genauer ermittelt werden kann, da keine störenden Substanzen im Medium vorliegen.

Die Aktivität des zweiten betrachteten Enzyms - der IPNS - spiegelt einen ähnlichen Verlauf wie im komplexen Medium wieder (Abbildung 4.41). So erreicht die IPNS ihr Aktivitätsmaximum erst nach 140 Stunden, zeitlich nachdem die ACVS ihr Maximum an Aktivität bereits durchlaufen hat.

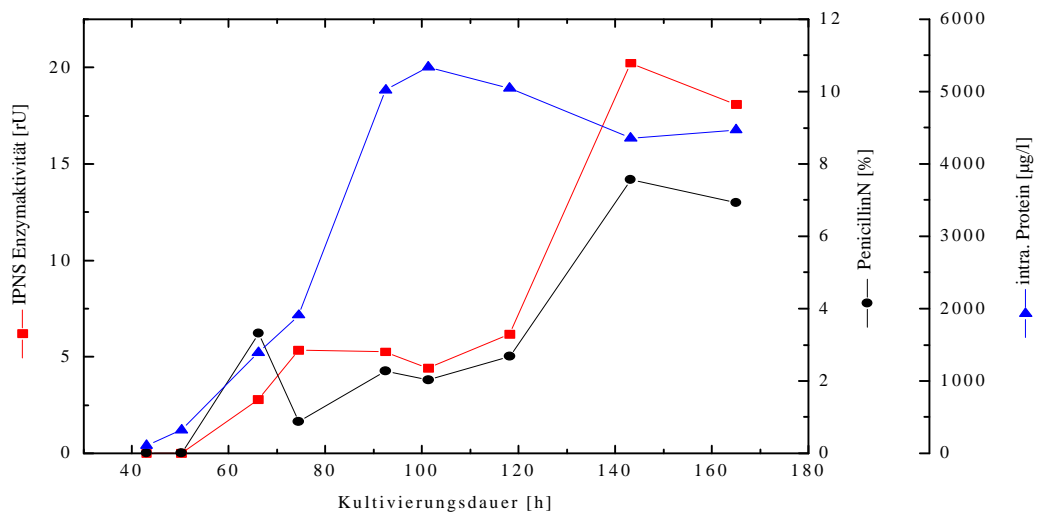


Abb. 4.41 : Spezifische Aktivität der IPNS, die Penicillin N-Konzentration und der intrazelluläre Proteingehalt.

Über einen direkten Engpaß in der Biosynthese des Cephalosporin C kann im synthetischen Medium noch keine sichere Aussage getroffen werden. Aufgrund von rheologischen und morphologischen Veränderungen ist ein Vergleich von synthetischen zu komplexen Medien immer schwierig. Es kann aber die Hypothese aufgestellt werden, daß der Engpaß im synthetischen Medium an der gleichen Stelle der Biosynthese zu suchen ist, wie im Komplexmedium. Diese Annahme begründet sich hauptsächlich durch den ähnlichen Verlauf der Aktivitätsspektren.

4.3 Messung der Kulturfluoreszenz - Einsatz der 2D- Fluoreszenzspektrometrie

Während aller Kultivierungen wird die Kulturfluoreszenz on-line verfolgt. Wie bereits bei Tollnick /1996/ zeigt die mit dem Fluorosensor gemessene NAD(P)H-Fluoreszenz keine Korrelation zu irgendeiner Prozeßgröße, da im Rahmen dieser Arbeit mit Corn-Steep-Liquor-haltigen Medien gearbeitet wird. Dadurch wird die Kulturfluoreszenzmessung (340nm/460nm) hauptsächlich durch Matrixeffekte gestört /Nielsen *et al.*, 1994/. Durch die zur Verfügung stehende Methode der zweidimensionalen Fluoreszenzspektrometrie soll deswegen Zugang zu neuen Korrelationsmöglichkeiten gefunden werden.

Für die Messungen der Kultivierungen im Komplexmedium wird das Hitachi-Fluoreszenzspektrophotometer eingesetzt. Die erhaltenen Daten werden aufgearbeitet und können übersichtlich dargestellt werden /Lindemann 1998/. Das 2D-Fluoreszenzspektrum zu Beginn der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* in komplexen Medien zeigt eine hohe relative Fluoreszenzintensität, die auf Fluorophore im Medium zurückzuführen ist.

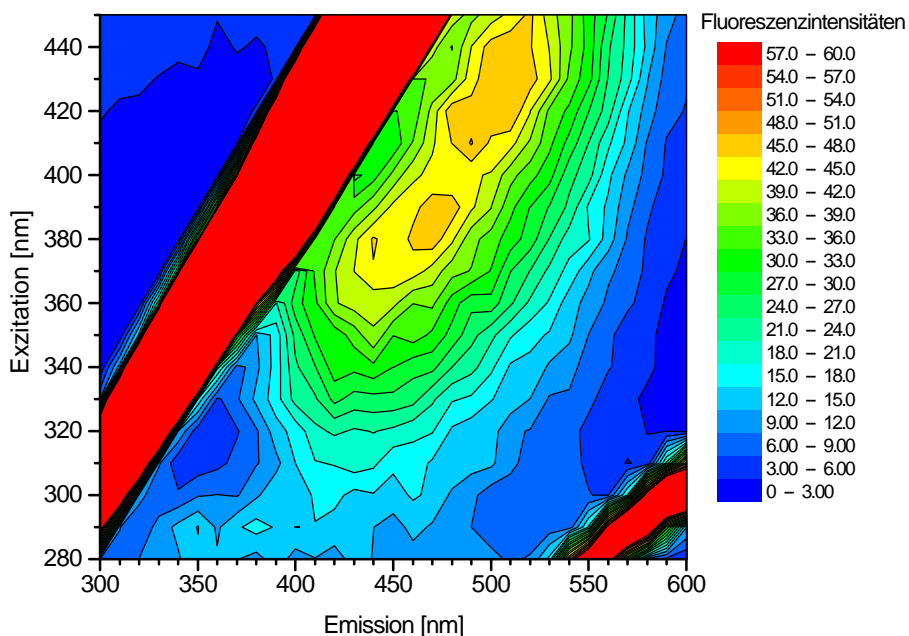


Abb. 4.42: 2D-Fluoreszenzspektrum des Komplexmediums zu Beginn der Kultivierung /Lindemann 1998/.

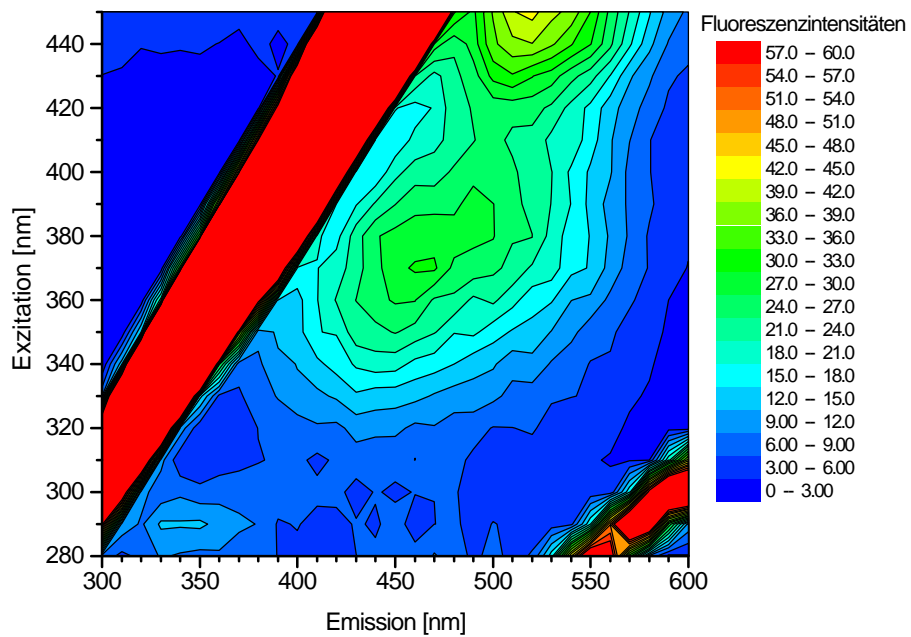


Abb. 4.43: 2D-Fluoreszenzspektrum im Komplexmedium am Ende der Kultivierung /Lindemann 1998/

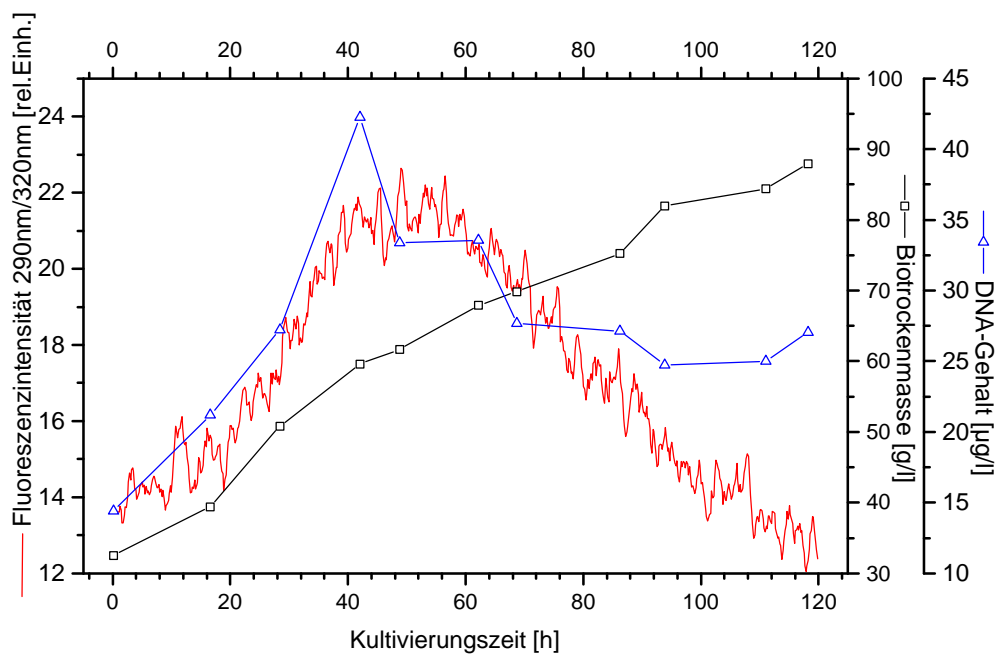


Abb. 4.44 : Fluoreszenzverlauf im Tryptophanbereich während der Kultivierung im Komplexmedium /Lindemann 1998/.

Am Ende der Kultivierung (Abb. 4.43) ist wiederum ein hohes Fluoreszenzsignal zu erkennen, welches in der gleichen Größenordnung liegt, wie am Anfang der Kultivierung (Abb. 4.44). Die Maxima haben sich allerdings zu anderen Wellenlängenpaaren verschoben. Aus den deutlich sichtbaren Veränderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren können zunächst folgende Informationen gezogen werden.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Laufe der Kultivierung läßt auf den Verbrauch von Medienbestandteilen schließen, während die Zunahme der Intensität teilweise sowohl auf Zellbestandteile (Protein-, Riboflavin und NAD(P)H-Bereich) als auch auf die Bildung unbekannter Fluorophore zurückzuführen ist. Durch Zu- und Abnahme kommt es zu starken Überlagerungen der Medienfluoreszenz, die eine Auswertung erheblich beeinträchtigen.

Aus einzelnen Fluoreszenzverläufen können jedoch Korrelationen zu Zellparametern gemacht werden. So korreliert, z.B. die Tryptophanfluoreszenz gut mit dem Verlauf des DNA-Gehaltes, aber nur sehr schlecht mit dem Verlauf der Biomasse (Abb. 4.44).

Das Vorhandensein unbekannter Fluorophore im Komplexmedium und die Beeinflussung deren Identifikation durch Trübungseffekte sowie das Auftreten von Quench- und Lösungsmiteleinflüssen beim Messen der Kulturfluoreszenz, machen es erforderlich, die Kulturfluoreszenz zur besseren Interpretation der Spektren auch in Minimalmedien zu verfolgen. Durch Reduktion der möglichen fluoreszierenden Substrate im Medium sollen die Maxima in der Fluoreszenzintensität genauer zugeordnet werden können und Verläufe von einzelnen Exzitations/Emissions-Paaren besser den Kultivierungsparametern zugeordnet werden. Abbildung 4.45 zeigt das 2D-Spektrum zu Beginn der Kultivierung und auch hier sind deutlich Fluoreszenzmaxima zu erkennen, welche wiederum auf die genannten Fluorophore im Medium zurückzuführen sind.

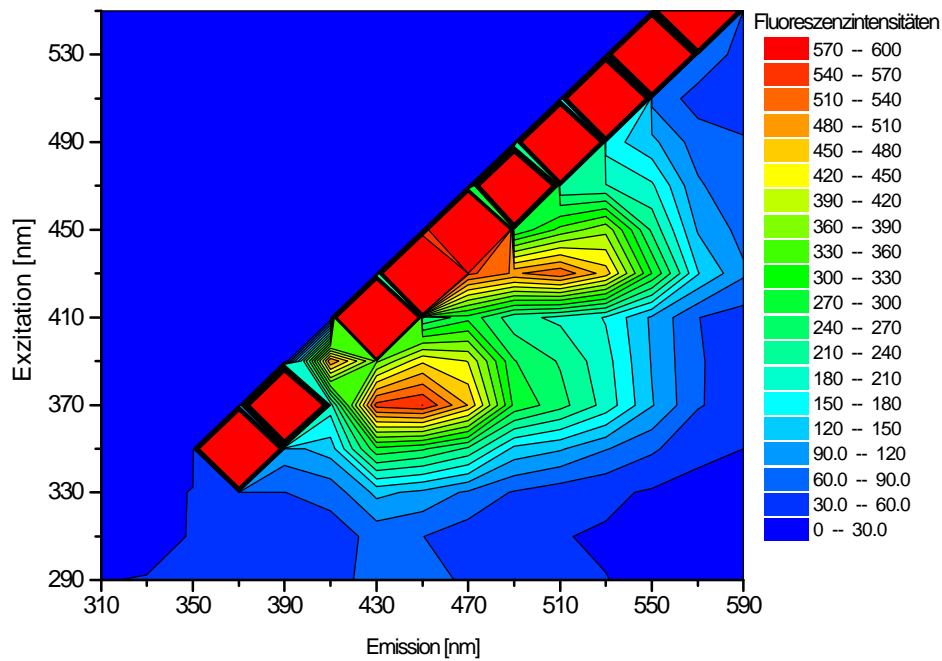


Abb. 4.45 : 2D-Fluoreszenzspektrum zu Beginn der Kultivierung im synthetischen Medium
/Lindemann 1998/.

Da der Corn-Steep-Liquor in dem Medium fehlt und auch sonst nur Trübungseffekte durch sich bildende Biomasse auftreten, sollten die auftretenden Maxima leichter charakterisiert bzw. identifiziert werden können. Das 2D-Spektrum am Ende der Kultivierung zeigt ebenfalls eine hohe Kulturfluoreszenz.

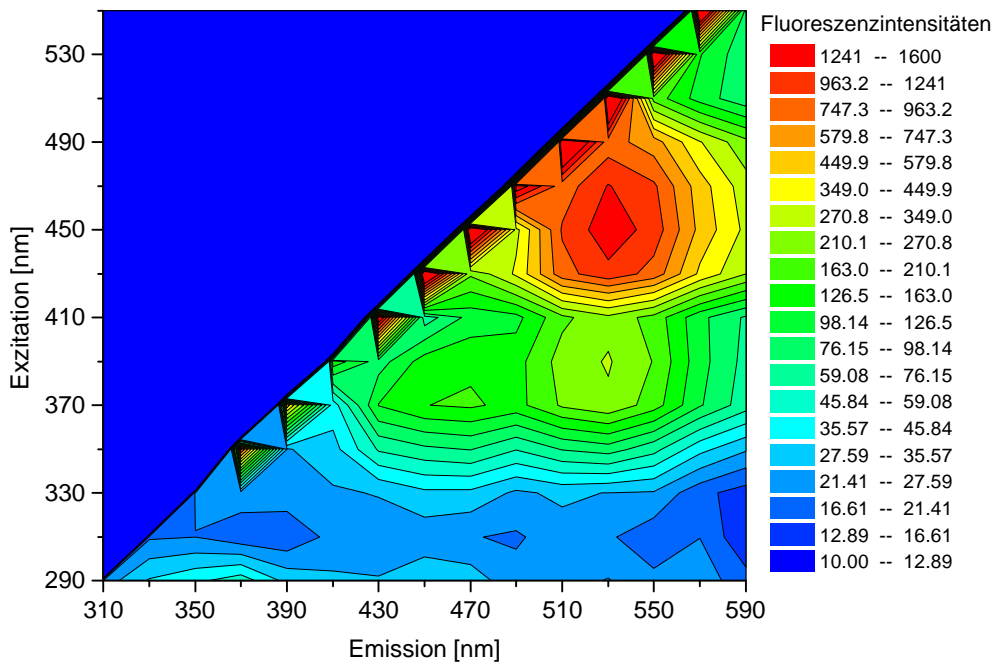


Abb. 4.46 : 2D-Fluoreszenzspektrum am Ende der Kultivierung im synthetischen Medium
/Lindemann 1998/.

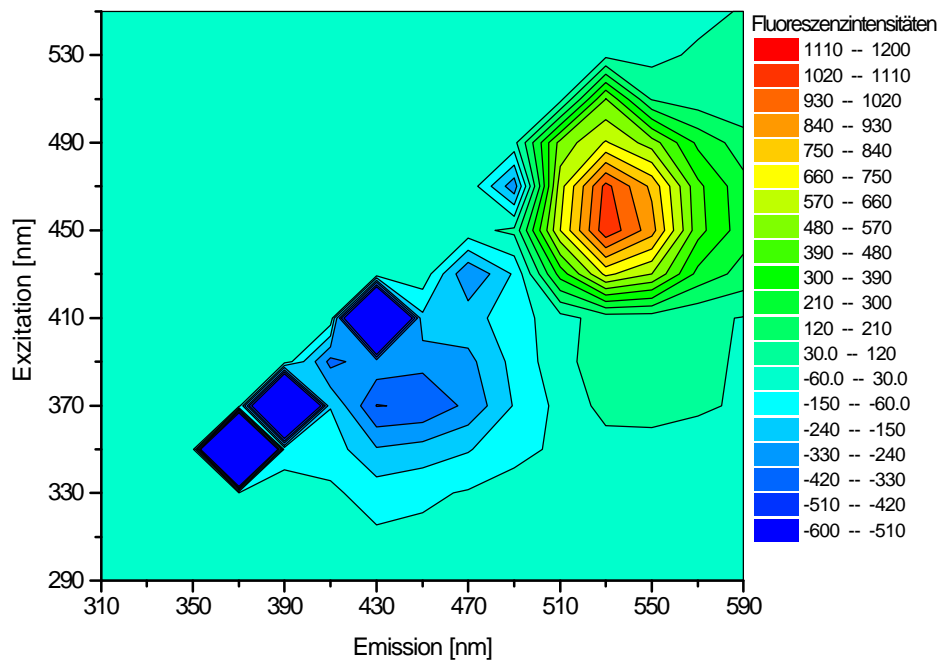


Abb. 4.47: Differenzspektrum einer Kultivierung (166h-0h) /Lindemann 1998/.

Im Differenzspektrum, der mit dem Bioviewsensor aufgenommenen Spektren, sind maximale Änderungen der Fluoreszenzintensitäten bei 370nm/430nm (Abnahme der Intensität), 390nm/550nm und 450nm/530nm (Zunahme der Intensitäten) zu erkennen. Die Reduktion der störenden fluoreszierenden Medienbestandteile auf ein Minimum ist neben Filtereffekten des Gerätes und der Aufnahme weniger Meßpunkte, auch auf weniger Fluorophore im Medium zurückzuführen. Eine genaue Interpretation der Maxima konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden. So ist es nur möglich, einzelne Paare mit Prozeßparametern mehr oder weniger gut zu korrelieren. In der Verwendung des synthetischen Mediums sollte jedoch ein hohes Potential zur Verbesserung dieser on-line Überwachungsmethode liegen.

Bei den Messungen der Kulturfluoreszenz fallen sehr große Datenmengen an. Beide verwendeten Spektrometer liefern informative, aber - wie oben gesehen - auch sehr komplizierte Spektren. Da die manuelle bzw. einfache optische Auswertung sehr problematisch ist, werden diese Meßdaten durch mathematische Datenreduktionsmethoden vereinfacht. Wei /1998/ untersuchte im Rahmen einer Doktorarbeit zwei Methoden - die Wavelet - Transformation und die selbstorganisierende Merkmalskarte (SOM). Durch die entwickelten Methoden können die Dimension und die Menge der Fluoreszenzdaten drastisch reduziert werden.

Zudem wird eine Methode zur Modellbildung - das Backpropagation-Netzwerk-Modell (BPN) - eingesetzt, mit dem es gelingt bei unterschiedlichen Kultivierungen, zahlreiche Prozeßvariablen, d.h. leichte Änderungen der Kultivierungsparameter, mit ausreichender Genauigkeit abzuschätzen. Die Originalspektren können nach dem SOM-Verfahren aufgearbeitet werden und stellen dann die BPN-Eingangsgrößen dar. Um die Korrelation zwischen dem Fluoreszenzspektrum und unterschiedlichen Prozeßvariablen, wie Biomasse, CPR, Produkte etc. zu ermitteln, wird jeweils ein BPN für jede Prozeßvariable trainiert. Die Anzahl der versteckten Neuronen wird variiert, um eine optimale Netzstruktur herauszufinden. Im folgenden sollen nur zwei Graphiken exemplarisch dargestellt werden, in denen der wichtige Wachstumsparameter CPR und das Hauptprodukt Cephalosporin C modelliert worden sind. Ausführliche Interpretationen und eine Beschreibung der durchgeführten Methodik finden sich bei Wei /1998/.

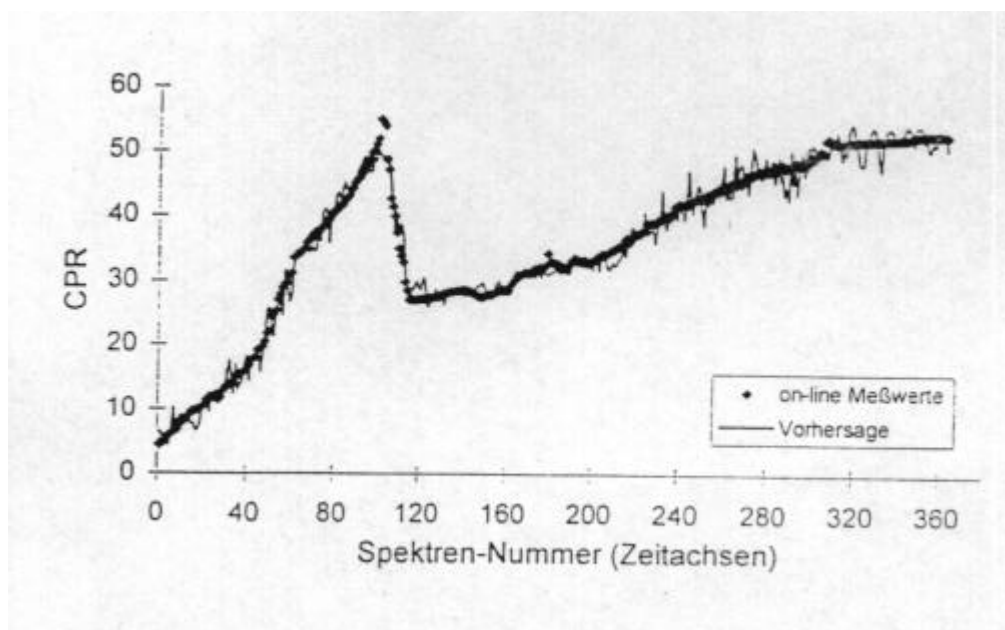


Abb. 4.48 : Vergleich der berechneten und der gemessenen CPR.

Es ist deutlich die gute Korrelation zwischen den berechneten und den gemessenen Werten zu erkennen. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,99. Ein ähnlich guter Zusammenhang läßt sich bei dem Hauptprodukt Cephalosporin C erkennen. Alle weiteren Parameter können nach einer Strukturoptimierung über eine $65 < 3 < 1$ BPN ähnlich gut berechnet werden /Wei 1998/.

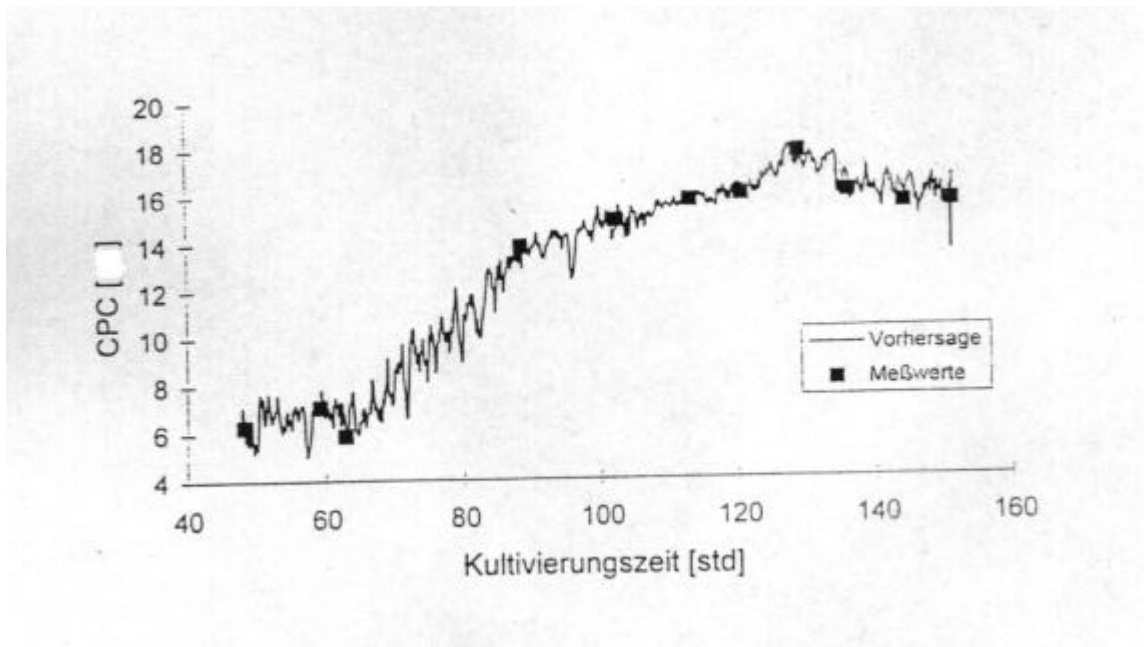


Abb. 4.49 : Vergleich der berechneten und der gemessenen Cephalosporin C-Konzentration.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cephalosporin C-Produktion mit einem Hochleistungsstamm von *Acremonium chrysogenum* in komplexen und synthetischen Medien bei Kultivierung im 30L-Fermenter-Maßstab näher untersucht. Der verwendete A3/2-Stamm zeigte in beiden Medien ein für wissenschaftliche Untersuchungen ausreichendes Wachstums- und Produktionsverhalten.

Bei früheren Kultivierungen ist ein erhöhter Bedarf des Pilzes an Aminosäuren beobachtet worden. Weiterhin verwertet *Acremonium chrysogenum* zahlreiche Aminosäuren zur direkten und indirekten Cephalosporin C-Produktion. Daher sind bei den Kultivierungen in den komplexen, industrienahen Medien mehrere Kultivierungen mit Aminosäurezusätzen und Glucosezufütterungen durchgeführt worden. Die Glucosezufütterungsexperimente machten schnell deutlich, daß die Produktivität, allein durch Glucosezusätze zum Zeitpunkt, der für das System typischen, diauxischen Stoffwechsellumstellung, nicht befriedigend gesteigert werden kann. Durch den Zusatz von Glucose konnte die Kultivierungsdauer bei gleicher Produktkonzentration extrem verringert werden. Es lag nahe, dem Medium eine Kombination von Glucose und Aminosäuren zuzusetzen. Bei kürzerer Prozeßzeit konnte dadurch die Ausbeute gesteigert werden. Eine optimale Medienzusammensetzung, bezogen auf Biomassebildung und Produktivität, ergab sich bei einem Zusatz von L-Alanin, L-Valin und L-Serin. Hier konnte der Ausbeutekoeffizient im Vergleich zu früheren Kultivierungen um fast 50% erhöht werden. Zudem zeigte ein Vergleich der Konzentration des Nebenproduktes DAOC, daß durch den Zusatz der Aminosäuren dessen Endkonzentration im Medium verringert werden konnte.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit bestand neben der Produktivitätssteigerung in der Untersuchung des Engpasses der Biosynthese des Cephalosporin C. Nach der Arbeit von Beyer /1996/ wurde der primäre Engpaß der Cephalosporin C-Biosynthese in der Aktivität der ACVS gesehen. Nachdem zahlreiche Enzymassays entwickelt und zur Routineanalytik umgesetzt wurden, bestätigten ausführliche Untersuchungen - zum Verhältnis der Enzymaktivitäten untereinander - diese Annahme und weisen die Expandase/Hydroxylase-Aktivität als zweiten Engpaß der Biosynthese aus.

Die ACV-Synthetase besitzt ihr Maximum in der exponentiellen Wachstumsphase von *Acremonium chrysogenum*. Hier müßten Maßnahmen gentechnischer Art zur Verbesserung ansetzen, um die Synthese des ACV auch in der, für die Hauptproduktion relevanten, stationären Phase zu garantieren.

Da im Laufe der Zeit deutlich wurde, daß bei Kultivierungen in komplexen Medien häufig Probleme bei der Analytik, bedingt durch den hohen Feststoffanteil und die hohe Viskosität, auftreten, wurde ein für den Forschungsmaßstab angepaßtes synthetisches Medium entwickelt. Mehrere Kultivierungen im synthetischen Medium mit *Acremonium chrysogenum* durchzuführen, erscheint als durchaus sinnvoll. Innovative Analysemethoden, wie z.B. die 2D-Fluoreszenzspektrometrie oder auch die on-line FIA, können besser eingesetzt werden und bringen neue Erkenntnisse über Wachstums- und Produktionsverhalten. Allerdings können diese Experimente nicht zur direkten Produktivitätssteigerung dienen, hier soll vorrangig dem wissenschaftlichen Aspekt Rechnung getragen werden.

Der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektrometrie im Rahmen dieser Arbeit zeigte interessante Ansätze für diese optische Analysemethode. Vor allem im synthetischen Medium sind deutliche Fluoreszenzintensitäten auszumachen, die in der Zukunft charakterisiert bzw. identifiziert werden müssen, um eine einfache on-line Überwachungsmethode für den Verbrauch von Substraten und den Aufbau von Produkten zu gewinnen.

Die Betrachtung der Enzymaktivitäten im synthetischen Medium bestätigt alle Hypothesen aus den Kultivierungen im Komplexmedium und weist auch hier die ACV-Synthetase-Aktivität als primären Engpaß der Cephalosporin C-Biosynthese aus.

Die gesammelten extra- und intrazellulären Daten reichten aus, um ein erstes kinetisches Modell für die Cephalosporin C-Biosynthese zu entwerfen, welches in den ersten 100 Stunden einer Kultivierung gute Prognosen für den Prozeßverlauf liefert. Es konnten kinetische Konstanten bestimmt werden und somit die Enzymaktivitäten noch genauer betrachtet werden. Simulationen mit der Gelöstsauerstoffkonzentration bestätigten die Ergebnisse früherer experimenteller Arbeiten und zeigten, daß sich bei zu niedriger Gelöstsauerstoffkonzentration Penicillin N im Medium als Hauptprodukt anreichert. Dies ist besonders bei Kultivierungen in hochkomplexen Medien wichtig und erklärt die hohen Nebenproduktkonzentrationen im Industriemaßstab.

5.2 Ausblick

Weitere Arbeiten auf dem Gebiet der Optimierung eines Prozesses durch Medienkomposition, sollten sich zunächst mit der gezielten Suche nach billigen und aminosäurehaltigen Rohstoffquellen, die vor allem reich an Valin, Alanin und Serin sind, beschäftigen. Da der gezielte Zusatz dieser Aminosäuren im Forschungsmaßstab hohe Ausbeutegewinne mit sich brachte, ist zu empfehlen, den Zusatz durch sorgfältiges up-scaling auf den Industrieprozess zu übertragen. Desweiteren kann durch Verdünnung des Mediums unter Zufütterung von Glucose und Aminosäuren der Produktionsprozess ohne Ausbeuteverlust beschleunigt werden. Das entwickelte synthetische Medium bietet zahlreiche Möglichkeiten zur genaueren Charakterisierung des Produktionsprozesses. So ist es nun möglich, genauen Zugriff auf die Biomasse zu erhalten. Reines Zellmaterial könnte isoliert und bestimmt werden, wodurch eine genaue Wachstumsrate zu bestimmen wäre. Ebenso wäre die Durchführung von Elementaranalysen sinnvoll und würde sehr genau Aufschluß über die Zusammensetzung des Pilzmycels geben. Durch solche Analysen können bessere Bilanzen erstellt und eventuell Stoffflüsse charakterisiert werden. Diese wiederum sind unter Vorbehalt auf den Industrieprozess übertragbar sein. Die vorgestellten Modelle und Simulationen dieser Arbeit wären durch die so gewonnenen Daten aussagekräftiger, da sie eine höhere Genauigkeit zeigen würden.

Ein weiteres, lohnendes Forschungsgebiet ist sicherlich die Anwendung der 2-D Fluoreszenzspektrometrie im synthetischen Medium. Durch das Fehlen der störenden Fluorophore des Komplexmediums müßte eine Charakterisierung bzw. Identifizierung der auftretenden Fluoreszenzmaxima einfacher und treffender möglich sein. Vor allem eine on-line Sojaöl-Analytik wäre hier ein erfolgversprechender Ansatzpunkt.

6. Literaturverzeichnis

Abbott, B.J.

Antimicrob. Agent Chemother

16 (1979), 808

Alonso, M.J.; Luengo, J.M.

Interferences by methionine on valin uptake in *Acremonium chrysogenum*

Antimicrob. Agents Chemother 31 (1987), 357-359

Bailey, J. E.

Toward a science of metabolic engineering

Science 252 (1991), 1668-1675

Bainbridge, Z.A.; Scott, R.I. ; Perry, D.

Oxygen utilisation by isopenicillin N synthase from *Penicillium chrysogenum*

J. Chem. Technol. Biotechnol. 55 (1992)

Baldwin, J.E.; Abraham, Sir E.

The biosynthesis of penicillins and cephalosporins

Nat. Prod. Rep. (1988), 129-145

Baldwin, J.E.; Adlington, R.M.; Crouch, N.P.; Turner, N.J.; Schofield, C.J.

Cephalosporin C biosynthesis; stereochemistry of the incorporation of D,L,D- α -aminoadipyl-cysteiny1-(3S)-[2-²H,4-¹³C]-valine into β -lactam compounds

J. Chem. Soc.; Chem. Commun. 16 (1989), 1141-1143

Baldwin, J.E.; Adlington, R.M.; Bird, J.W.; Schofield, C.J.

The fate of valine-oxygen during penicillin biosynthesis

J. Chem. Soc.; Chem. Commun. 16 (1989), 1615-1616

Baldwin, J.E.

The biosynthesis of penicillins and cephalosporins

J. Heterocyclic Chem. 27 (1990), 71-78

Baldwin, J.E.; Adlington, R.M.; Crouch, N.P.; Turner, N. J.; Schofield, C.J.; Aplin, R.T.

Cephalosporins biosynthesis : a branched pathway sensitive to an isotope effect

Tetrahedron 47 (1991), 9881-9900

Baldwin, J.E.; Adlington, R.M.; Bird, J.; Field, R.; O'Callaghan, N.; Schofield, C.J.

Studies on the exchange of valine-oxygen during the biosynthesis of ACV

Tetrahedron 48, 6 (1992), 1099-1108

Baldwin, J.E.; Goh, K.C.; Schofield, C.J.

Oxidation of deacetylcephalosporin C by deacetoxycephalosporin C/deacetylcephalosporin C-synthetase

J. Antibiotics 45, 8 (1992), 1378-1381

Banko, G.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Cell-free synthesis of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cystein, the first intermediate of penicillin and cephalosporin biosynthesis

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986), 137, 1, 528-35

Banko, G.; Demain, A.L.; Wolfe, S.

delta-(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACV synthetase): a multifunctional enzyme with with broad substrate specificity for the synthesis of penicillin and cephalosporin precursors

J. Am. Soc. (1987), 109, 2858

Bäckermann, U.

Untersuchungen extrazellulärer Enzymaktivitäten an Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum*

Diplomarbeit (1996), Universität Hannover

Behmer, C.J.; Demain, A.L.

Further studies on carbon regulation of β -lactam antibiotic synthesis in *Cephalosporium acremonium*

Curr. Microbiol. 8 (1983), 107-114

Beyer, M.

Untersuchung des Engpasses der Cephalosporin C-Biosynthese in Hochleistungsstämmen von *Acremonium chrysogenum*

Dissertation (1996), Universität Hannover

Bhattacharjee, J.K.

α -aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes

CRC crit. Rev. Microbiol. 12 (1985), 131-151

Bradford, M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254

Brotzu, G.

Ricerca sudi un nuovo antibiotico

Lavori dell'istituto D'igiene di Cagliari (1948), 1-11

Burton, K.

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid

J. Biochem., 62 (1956), 315-332

Castro, J.M.; Liras, P.; Laiz, L.; Cortez, J.

Purification and characterization of isopenicillin N synthase of *Streptomyces lactamdurans*

J. Gen. Microbiol. 134 (1988), 133-141

Christensen, L. H.

Modelling of the penicillin fermentation

Ph. D. thesis, Technical University of Denmark, Lyngby 1992

Cohen, G.; Argaman, A.; Schreiber, R.; Mislovati, M.; Aharonowitz, Y.

The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis

J. Bacteriol. 176 (1994), 973-984

Cooper, J.D.H.; Ogden, G.; McIntosh, J.; Turnell, D.C.

The stability of o-phthalaldehyd/2-mercaptoethanol derivates of amino acids : an investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique

Anal. Biochem. 142 (1984), 98-102

Demain, A.L.

Regulation of β -lactam antibiotic production

Int. symp. gen. ind. micr. 4 (1982), 79-84

Din 38 406 Teil 5

DEV - (1983), 12. Lieferung

Dotzlaw, J.E.; Yeh, W.K.

Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*

J. Bacteriol. 169 (1987), 1611-1618

Dotzlaw, J.E.; Yeh, W.K.

Purification and properties of deacetoxycephalosporin C synthase from recombinant *Escherichia coli* and its comparison with the native enzyme purified from *Streptomyces clavuligerus*.

J. Biol. Chem. 264 (1989), 1021-1027

Felix, H.R.; Nüesch, J.; Wehrli, W.

Investigation of the two final steps in the biosynthesis of cephalosporin C using permeabilized cells of *Cephalosporium acremonium*

FEMS Microbiol. Lett. 8 (1980), 55-58

Fujisawa, Y.; Kanzaki, T.

Role of acetyl CoA: deacetylcephalosporin C acetyltransferase in cephalosporin C biosynthesis by *Cephalosporium chrysogenum*

Agric. Biol. Chem. 39 (1975), 2043-2048

Gräfe, U.

Biochemie der Antibiotika

Spektrum Akademischer Verlag (1992), Heidelberg, Berlin, New York

Hersbach, G.J.M.; van der Beck, C.P.; van Dijck, P.W.M.

Biotechnology of industrial antibiotics

Vandamme, E.J. (Hrsg.): Drugs and pharmaceutical sciences Vol. 22; Marcel Decker (1984)

New York/Basel

Holzhauer-Rieger, K.

Untersuchungen bei der Fermentation von *Cephalosporium acremonium* mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigchromatographie - Einsatz von online und offline-Verfahren Dissertation, Universität Hannover (1990)

Hönlinger, C.; Kubicek, C.P.

Metabolism and compartmentation of α -aminoadipic acid in penicillin-producing strains of *Penicillium chrysogenum*

Biochem. Biophys. Acta 993 (1989), 204-211

Jayatilake, G.S.; Huddleston, J.A.; Abraham, E.P.

Conversion of isopenicillin N into penicillin N in cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium*

Biochem. J. 194 (1981), 645-647

Jensen, S.E.; Westlake, D.W.S.; Wolfe, S.

Cyclization of ACV to penicillins by cell-free extracts of *Streptomyces clavuligerus*

J. Antibiot. 35, (1982), 483

Jensen, S.E.; Leskiv, B.K.; Vining, L.C.; Aharonowitz, Y.; Westlake, D.W.S.

Purification of isopenicillin N synthetase from *Streptomyces clavuligerus*

Can. J. Microbiol. 32 (1986b), 953-958

Jensen, S.E.; Westlake, D.W.S.; Wolfe, S.

Production of penicillin precursor ACV by cell-free extracts from *Streptomyces clavuligerus*

FEMS-Microbiol. Lett. 49, 2, (1988), 111-114

Kaufmann, P.; Herslöf, B.G.

A multivariate identification of natural triglyceride oils

Fat. Sci. Technol. 93 (1991), 5, 179-83

Klingspohn, U.

Verfahrenstechnische Aspekte der Produktion und Aufarbeitung von Enzymen zur
Nutzbarmachung nachwachsender Rohstoffe

Dissertation (1990), Universität Hannover

Konomi, T.; Herchen, D.; Baldwin, J.E.; Yoshida, M.; Hunt, N.A.; Demain, A.L.

Biochem. J. 184 (1979), 427

Kupka, J.; Shen, Y.

Studies on the ring-cyclization and ring-expansion enzymes of β -lactam biosynthesis in
Cephalosporium acremonium

Can. J. Microbiol. 29 (1983), 488-496

Küenzi, M.T.

Comparison of the Fermentation Kinetics of *Cephalosporium acremonium* in Shake Flasks and
Fermenter by Means of Ribonucleic Acid Measurements

Biotechnol. Lett.,1 (1979), 127-132

Küenzi, M.T.

Regulation of cephalosporin synthesis in *Cephalosporium acremonium* by phosphate and glucose

Arch. Microbiol. 128 (1980), 78-83

Lendenfeld, T.; Ghali, D.; Wolschek, M.; Kubicek-Pranz, E.M.; Kubicek, C.P.

Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*

J. Biol. Chem. 268 (1993), 665-671

Lindemann, C.

Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung

Dissertation (1998), Universität Hannover

Lopez-Nieto, M.J.; Ramos, F.R.; Luengo, J.M.; Martin, J.F.

Characterization of the biosynthesis *in vivo* of α -ACV in *Penicillium chrysogenum*

Appl. Microbiol. Biotechnol. 22 (1985), 343-351

Lucas, L.

The biosynthesis of cephalosporin C by a sulfate-dependent mutant of *Cephalosporium acremonium*

Dissertation (1993), Universität Hannover

Lübbe, C.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Dithiothreitol reactivates desacetoxycephalosporin C synthetase after inactivation

Enzyme and microb. Technol. 7 (1985), 353-356

Malik, V.S.

Microbiological secondary metabolism

TIBS 5 (1980), 68-72

Malmberg, L.H.; Sherman, D.H.; Hu, W.S.

Analysis of rate-limiting reactions in cephalosporin biosynthesis

Ann. N.Y. Acad.Sci. 665 (1992), 16-26

Malmberg, L.H.; Hu, W.S.

Identification of rate-limiting steps in cephalosporin C biosynthesis in *Cephalosporium acremonium*: a theoretical analysis

Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 (1992), 122-128

Martin, J.F.; Liras, P.

Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis

Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 39 (1989), 153-187

Gutierrez, S.; Velasco, J.; Marcos, A.T.; Fernandez, F.J.; Fierro, F.; Barredo, J.L.; Martin, J.F.

Expression of the cefG gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*

Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 (1997), 606-614

Marose, S.

Laufende Dissertation, Universität Hannover

Matsumura, M.; Imanka, T.; Yoshida, T.; Taguchi, H.

Regulation of Cephalosporin C production by endogenous methionine in

Cephalosporium acremonium

J. Ferment. Technol. 58, 3 (1980), 205-214

Matsuyama, K.; Matsumoto, H.; Matsuda, A.; Sugiura, H.; Komatsu, K.; Ichikawa, S.

Purification of acetyl coenzyme A: Deacetoxycephalosporin C O-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*

Biosci. Biotech. Biochem. 56 (1992), 9, 1410-1412

Metha, R.J.; Speth, J.L.; Nash, C.H.

Lysine stimulation of cephalosporin C synthesis in *Cephalosporium acremonium*

Eur. J. Appl. Micro. Biotechnol. 8 (1979), 177-182

Michal, G.

Biochemical pathways;

3rd ed., part 1 Boehringer Mannheim (1993)

Mundie, C.M.; Cheshire, M.V.; Anderson, H.A.; Inkson, R.H.E.

Automated determination of monosaccharides using p-hydroxybenzoic acid hydrazide

Anal. Biochem. 71 (1976), 604-607

Nielsen, J.; Johannsen, C.L.; Villadsen, J.

Culture fluorescence measurements during batch and fed-batch cultivations with *Penicillium chrysogenum*

J. Biotechnol. 38 (1994), 51-62

Nielsen, J.

Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum* ;

Polyteknisk Forlag (1995)

Onions, A.H.S.; Brady, B.L.

Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*

CAB International Mycological Institute, Kew. Surrey TW9 3AF,
England

Pang, C.P.; Chakravarti, B.; Adlington, R.M.; Ting, H.H.; White, R.L.; Jayatilake, G.S.;

Baldwin, E.J.; Abraham, E.P.

Purification of isopenicillin N synthase

J. Biochem., 222 (1984), 789-795

Pateman, J.A.; Kinghorn, J.R.

Nitrogen metabolism

In: J.E. Shmith and D.R. Berry (eds); The filamentous fungi, Vol 2, Edward Arnold, London,
UK (1976)

Perry, D.; Abraham, E.P.; Baldwin, J.E.

Factors affecting the isopenicillin N synthetase reaction

J. Biochem., 155 (1988), 345-351

Pissara, P.; Nielsen, J.; Balzin M.J.

Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *Penicillin chrysogenum* during fed batch cultivations

Biotechnology and Bioengineering 51 (1996), 168-176

Queener, S.; Swartz, R.

The penicillins : Secondary Products of Biosynthetic and Semisynthetic Metabolism

In : Economic Microbiology (Hrsg: Rose, A.) Bd.2 London/New York

Academic Press (1979), 35-122

Ramos, F.R.; Lopez-Nieto, M.J.; Martin, J.F.

Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts ACV

Antimicrob. Agents Chemother. 27 (1985), 380-387

Scheidegger, A.; Küenzi, M.T.; Nüesch, J.

Partial purification and catalytic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of β -lactams in *Cephalosporium acremonium*

J. Antibiot. 37 (1984), 522-531

Scheidegger, A.; Gutzwiller, A.; Küenzi, M.T.; Fiechter, A.; Nüesch, J.

Investigation of acetyl-CoA: Deacetoxycephalosporin C O-acetyltransferase of *Cephalosporium acremonium*

J. Biotechnol. 3 (1985), 109-117

Scheper, T.; Lorenz, T.; Schmidt, W.; Schügerl, K.

Measurement of culture fluoreszenz during the cultivation of *Penicillium chrysogenum* and *Zymomonas mobilis*

J. Biotechnol. 3 (1986), 231-238

Schmidt, W.J.; Kuhlmann, W.; Schügerl, K.

Automated determination of glucose in fermentation broths with p-hydroxybenzoic acid hydrazide (p-HBAH)

Appl. Microbiol. Biotechnol. 21 (1985), 78-84

Seidel, G.

Einfluß unterschiedlicher Medienkonzentration auf Kultivierungen mit *Acremonium chrysogenum*

Diplomarbeit (1996), Universität Hannover

Shen, Y.Q.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Deacetoxycephalosporin C synthetase : importance of order of cofactor/reactant addition

Enzyme Microb. Technol. 6 (1984), 402-404

Shen, Y.Q.; Heim, J.; Solomon, N.A.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Repression of β -Lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources

J. Antibiot. (1984), 503-511

Shen, Y.Q.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in

Cephalosporium acremonium producing high and low levels of cephalosporin C

Bio/Technol. 4 (1986), 61-64

Smith, A.

Cephalosporins

in : Moo-Young, M.ed., Vol.3, (1985)

Sonnleitner, B.; Fiechter, A.

High-performance bioreactors : A new generation

Anal. Chim. Acta 213 (1988), 199-205

Theilgaard, H.; Kristiansen, K.; Henriksen, C.; Nielsen, J.

Purification and characterization of ACVS from *Penicillium chrysogenum*

Biochem. J. 327 (1997), 185-191

Tollnick, C.

Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum* in Forschung und Produktion -

Medienstrategien zur Auffindung von Engpässen in der Biosynthese des Antibiotikums

Cephalosporin C

Dissertation (1996), Universität Hannover

Usui, S.; Yu, C.A.

Purification and properties of isopenicillin N epimerase from *Streptomyces clavuligerus*

Biochem. Biophys. Acta 999 (1989), 78-85

Velasco, J.; Gutierrez, S.; Fernandez, F.J.; Marcos, A.T.; Arenos, C.; Martin, J.F.

Exogenous Methionine increases levels of mRNAs transcribed from pcbAB, pcbC and cefEF genes, encoding enzymes of cephalosporin biosynthetic pathway in *Acremonium chrysogenum*

J. Bacteriol. 176, 4 (1994), 985-991

Versuchsvorschrift

Spectroquant P14848 PMB-Phosphat-Test Merck

Waksman, S. A.; Lechevalier, H. A.

Science 109 (1949), 305-307

Wei, J.

Untersuchung von Verfahren zur Auswertung der zweidimensionalen Fluoreszenzspektren

Dissertation, (1998), Universität Hannover

Witt, S.

Einige Aspekte der Morphologie und des Stoffwechsels der Antibiotikaproduktion von *Cephalosporium acremonium* und *Penicillium chrysogenum*
Diplomarbeit (1993), Universität Hannover

Yokum, R.R.; Waxman, D.J.; Strominger, J.L.

Interaction of penicillin with its receptors in bacterial membranes
TIBS April (1980), 97-101

Zhang, J.; Banko, G.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*
J. Ind. Microbiol. 2 (1987), 251-255

Zhang, J.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Effect of ammonium as nitrogen source on production of ACV-synthetase by *Cephalosporium acremonium*
J. Antibiot. 40, 12 (1987), 1746-1750

Zhang, J.; Wolfe, S.; Demain, A.L.

Phosphate repressible and inhibitable β -lactam synthases in *Cephalosporium acremonium* strain C-10
Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1988), 361-367

Zhang, J.; Demain, A.L.

Regulation of ACV-synthetase in penicillin- and cephalosporin-producing microorganisms
Biotech. Adv. 9 (1991), 623-641

Zhang, J.; Demain, A.L.

Regulation of ACV synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway by carbon sources and their metabolites
Arch. Microbiol. (1992), 158, 364-369

Zhang, J.; Demain, A.L.

ACV Synthetase

CRC Crit. Rev. Biotechnol. 12 (1992), 3, 245-260

Zhou, W.; Holzhauser-Rieger, K.; Dors, M.; Schügerl K.

Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C

Enzyme Microb. Technol. 14 (1992), 848-854

7. Anhang

7.1 Zusammensetzung der Agarschrägen

Komponente	Konzentration [g/l]
Glucose	10
Hefe-Extrakt	4
DL-Methionin	2
Agar	25

Tab. 7.1 : Zusammensetzung der Agarschrägen nach Kuenzi *et al.* /1980/

Mit bidest. H₂O auf einen Liter auffüllen und pH 7,7 einstellen.

7.2 Schüttelkulturen für komplexe und synthetische Medien

Komponente	Menge [g/160 ml]	Gehalt [g/l]
Hefeextrakt	5,28	33
Malzextrakt	3,84	24
Glucose	0,8	5
Sojaöl	0,06 ml	0,4 ml
Calciumcarbonat	0,8	5
Leitungswasser	auf 160 ml auffüllen	

Tab. 7.2 : Zusammensetzung des Schüttelkulturmediums

7.3 Zweite Vorkultur für komplexe Medien (Biostat V)

Komponente	Menge [g/6 l]	Gehalt [g/l]
Corn Steep Liquor	204	34
Glucose	210	35
Ammoniumacetat	36	6
Sojaöl	60	10
Calciumcarbonat	33	5,5
Desmophen 3900	2	0,33

Tab. 7.3 : Zusammensetzung der 2. Vorkultur

**7.4 Hauptkulturmedien der für die Arbeit verwendeten Kultivierungen
(BIOSTAT UD 30L)**

Die Kultivierungsnummerierung bezieht sich auf die im Ergebnisteil (Kapitel 4.1.7) eingeführten Bezeichnungen . Alle Angaben sind in [g] als Einwaage in den 30L-Bioreaktor. Die Mineralsalze (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) werden separat aufgelöst und der Trockenglucosesirup wird getrennt autoklaviert (3L, 40min).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Glucose	-	500	ab 40h 1g/l	-	ab 40h 1g/l	-	-	-
CSL	3300	1650	1650	2475	1650	1650	1650	1650
NH ₄ SO ₄	30	30	30	30	30	30	30	30
Na ₂ SO ₄	150	150	150	150	150	150	150	150
KH ₂ PO ₄	63	32	32	48	32	32	32	32
Arginin	100	50	50	-	-	-	-	-
Asparagin	100	50	50	75	50	50	50	50
L-Valin	-	-	-	25	25	25 ab der 45h 0,03g/l	25	30
L-Alanin	-	-	-	50	-	-	50	50
L-Serin	-	-	-	-	-	-	-	30
Methionin	440	220	220	330	220	220	220	220
Sojaöl	600	300	300	450	300	300	300	300
MgSO ₄	200	200	200	200	200	200	200	200
FeSO ₄	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
MnSO ₄	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
ZnSO ₄	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
CuSO ₄	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
CaCO ₃	300	150	150	225	150	150	150	150
Harnst.	63	32	32	48	32	32	32	32
TGS	1380	690	690	1035	690	690	690	690

Tab. 7.4 : Zusammensetzungen der wichtigsten komplexen Kultivierungsmedien

7.5 Bradford-Reagenz für die Proteinbestimmung

50 mg Coomassie Blue (25%-ig) werden in 25ml Methanol gelöst. Anschließend werden 50ml 85%-ige Phosphorsäure hinzugegeben. Es wird mit bidest. H₂O auf 500 ml aufgefüllt.

7.6 pHBAH-Reagenz für die Glucosebestimmung

Lösung 1 : 4 g p-Hydroxybenzoesäurehydrazid
 20 ml konz. HCl
 ad 1 l bidest.H₂O

Lösung 2 : 40 g Natriumhydroxid
 9,3 g EDTA (Natriumsalz)
 ad 1 l bidest. H₂O

Das Gebrauchsreagenz wird durch Mischung gleicher Volumina der beiden Lösungen unmittelbar vor der Benutzung erhalten.

7.7 Reagenzlösungen für die Ammoniumbestimmung nach DIN 38 406

Lösung A : 13 g Natriumsalicylat
 13 g Trinatriumcitrat
 0,97 g Dinatriumpentacyanonitrosylferrat
 ad 100 ml bidest.H₂O

Lösung B: 3,2 g Natriumhydroxid
 0,2 g Natriumdichlorisocyanurat
 ad 100 ml bidest. H₂O

Lösung A ist im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar, Lösung B sollte möglichst frisch verwendet werden.

7.8 Eluentenzusammensetzung für die Produkt HPLC

Phosphatpuffer : 14 mmol Natriumdihydrogenphosphat
 10,3 mmol Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
 ad 1 l bidest. H₂O

Der Eluent setzt sich aus dem Puffer und 50 ml Methanol (HPLC-Grade) zusammen.

7.9 Zusammensetzung von Maisquellwasser (Corn-Steep-Liquor)

Bestandteil	Gehalt [g / 100 g CSL]
Trockenmasse	46,8 - 49,6
Asche	8,04 - 10,43
Total-Stickstoff	3,33 - 3,67
Total-Zucker (als Glucose)	0,74 - 4,39
Lactat	11,6 - 19,3
Eisen	0,009 - 0,0027
Phosphor	1,5 - 1,9
Calcium	0,02 - 0,07
Zink	0,005 - 0,012
Kalium	2,0 - 2,5
pH	4,0 - 4,7

Tab. 7.5 : Zusammensetzung des CSL nach Cejka, Schering AG Bergkamen

Aminosäure	Frei [g/kg Trockenmasse]	Total [g/kg Trockenmasse]
Alanin	40,7	54,5
Arginin	2,4	20,3
Aspartat	2,2	19,9
Cystein	0	1,3
Glutamat	7,7	40,2
Glycin	6,6	26,8
Histidin	0	31,8
Isoleucin	11,2	17,3
Leucin	35,5	39,3
Lysin	0	14,8
Methionin	6,5	6,9
Phenylalanin	26,2	27,4
Prolin	27,7	48,2
Serin	10,7	19,0
Threonin	9,3	20,7
Tyrosin	1,3	6,5
Valin	20,1	30,5

Tab. 7.6 : Aminosäuregehalt in Maisquellwasser (CSL) /Christensen 1992/

7.10 Fettsäuremuster von Sojaöl

Fettsäure	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:1
% min.	13,2	3,4	21,6	44,3	8,2	Spuren	0
% max.	15,5	5,0	27,2	51,3	9,7	0,2	Spuren
Ø %	14,5	4,2	25,2	47,6	8,5	0,1	0

Tab. 7.7 : Fettsäuremuster von Sojaöl /Kaufmann und Herslöf, 1991/

7.11 Formeln für die Berechnung von CPR, OTR und RQ

$$OTR = \frac{V_{Gas}^{ein}}{22,414 \cdot V_R} \cdot \left\{ Y_{O_2}^{ein} - \frac{1 - Y_{O_2}^{ein} - Y_{CO_2}^{ein}}{1 - Y_{O_2}^{aus} - Y_{CO_2}^{aus}} \cdot Y_{O_2}^{aus} \right\}$$

$$CPR = \frac{V_{Gas}^{ein}}{22,414 \cdot V_R} \cdot \left\{ Y_{CO_2}^{aus} \cdot \frac{1 - Y_{O_2}^{ein} - Y_{CO_2}^{ein}}{1 - Y_{O_2}^{aus} - Y_{CO_2}^{aus}} - Y_{CO_2}^{ein} \right\}$$

$$RQ = \frac{CPR}{OTR}$$

mit : V_{Gas}^{ein} Begasungsstrom unter Normalbedingungen [NI/h]
 V_R begastes Reaktionsvolumen [l]
 $Y_{Gas}^{ein/aus}$ Molenbruch der Gaskomponente im Begasungsstrom (ein) oder Abgas (aus)

7.12 Zusammensetzung der Wasch- und Aufschlußpuffer

Puffer	Konzentration	Bestandteile
Waschpuffer	50mM	TRIS/HCl (pH 7,5)
	100mM	KCl
Aufschlußpuffer A	10mM	TRIS/HCl (pH 7,5)
	20mM	EDTA
	50 Vol%	Glycerin
	0,1 mM	DTT
Aufschlußpuffer B	10mM	TRIS/HCl (pH 7,5)
	20mM	EDTA
	50 Vol%	Glycerin
	0,1 mM	DTT
	14 Tabletten/Liter	Complete™ (Inhibitor)

Tab. 7.8 : Zusammensetzung der Wasch- und Aufschlußpuffer

8. Abkürzungsverzeichnis

Aktivität von xxx	A _{xxx} und R _{xxx}
Alanin	Ala
Albumin, Bovine	BSA
α -Aminoadipat/ α -Aminoadipinsäure	AAA
α -L-Aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valin	ACV
α -L-Aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valin-Synthetase	ACVS
Aminosäuren	AS
Adenosintriphosphat	ATP
Arginin	Arg
Ascorbinsäure/Ascorbic Acid	ASS
Asparagin	Asn
Aspartat/Asparaginsäure	Asp
Biofeuchtmasse	BFM
Biotrockenmasse	BTM
Cephalosporin C	CPC
Coenzym A	CoA
Cystein	Cys
Deacetylcephalosporin C	DAC
Deacetoxycephalosporin C	DAOC
Desoxyribonukleinsäure/Desoxyribonucleic acid	DNA
Dithioerythritol	DTE
Dithiothreitol	DTT
Epimerase (F= forward; R=rewind)	EPMF/EPMR
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	EDTA
Fließ-Injektions-Analytik	FIA
Glutamat	Glu
Glutamin	Gln
Glycin	Gly
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Isopenicillin N	IPN
Isopenicillin N-Synthase	IPNS
K _M -Werte für xxx	K _{xxx}
Kinetische Konstante für xxx	k _{xxx}
Kaliumchlorid	KCl
Leucin	Leu
Lysin	Lys

Abkürzungsverzeichnis

Metabolit xxx	MET _{xxx}
Methanol	MeOH
Methionin	Met
Penicillin N	PEN
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF
o-Phtalaldehyd	OPA
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Relative Units	rU
Reaktionsgeschwindigkeit	R _{xxx}
Ribonukleinsäure/ Ribonucleic acid	RNA
Serin	Ser
Tetrahydrofuran	THF
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	TRIS
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Ultraschall	US
Umdrehungen pro Minute	Upm
Valin	Val

Lebenslauf

Guido Seidel

Im Moore 34
30167 Hannover
Tel. : 0511 / 1611415
E-Mail : Seidel@mbox.iftc.uni-hannover.de

Geburtsdatum : 02. 07. 1969
Geburtsort : Langenhagen
Staatsang. : deutsch
Familienstand : ledig

Schulbildung :

1974-1978	Grundschule Havelse
1978-1980	Orientierungsstufe Garbsen
1980-1989	Johannes-Kepler-Gymnasium Garbsen
11.05.1989	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Beruflicher Werdegang :

1989-1990	Grundwehrdienst
1990-1996	Studium im wissenschaftlichen Studiengang Chemie an der Universität Hannover
1994-1995	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover Betreuung des analytischen Grundpraktikums für Biologen
1995-1996	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover bei Prof. Karl Schügerl Thema : "Einfluß unterschiedlicher Medienkonzentrationen auf Kultivierungen von <i>Acremonium chrysogenum</i> "
23.05.1996	Diplomprüfung, Note "sehr gut"
1996-1998	Wissenschaftliche Hilfskraft in Forschung und Lehre am Institut für Technische Chemie, Assistent des Studenten Praktikums in Technischer Chemie, Dissertation bei Prof. Karl Schügerl am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
10.02.1999	Promotionsprüfung „magna cum laude“