

**Sulfitoxidase aus dem marinen Bakterium**  
*Sulfitobacter pontiacus*

**Untersuchungen zur Optimierung der  
Kultivierungsbedingungen und zur Aufreinigung  
des Enzyms**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

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

genehmigte  
**Dissertation**

von  
Dipl.-Chem. Matthias Arndt  
geboren am 10.03.1972  
in Hannover

Hannover, im November 2002

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper  
Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl  
Tag der Promotion: 01.11.2002

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im November 2002

---

(Matthias Arndt)

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis Januar 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm und Herrn Dr. Roland Ulber möchte ich für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit sowie die mir gegebenen Möglichkeiten und Freiräume herzlich danken.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Rüdiger Pukall (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) danke ich für die Überlassung der *Sulfitobacter pontiacus*-Kulturen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie der Universität Hannover danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt dabei Martina Weiß und Bernhard Cochanski für ihre Hilfe bei der Lösung von Problemen jeglicher Art. Michael Dors danke ich für die Betreuung des RISP-Systems.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Thilo Peters für die ruhige, angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit und Johanna Walter für die Durchführung ihres Schwerpunktpraktikums. Beide haben durch ihr großes Engagement sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise Scheper und Kretzmer danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorzuheben sind dabei Miriam Menge, Torsten Müller, Daniela Boehl, Joachim Stehr, Joydeep Mukherjee, Meike Pflöging, Georg Renemann, Christian Harbeck, Carsten Protsch und Ralf Finke.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Horst Kempf für das sehr gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich Björn Schillberg, Katja Buschkröger, Carsten Protsch und Jochen Weiß für ihre Freundschaft danken, die auch über größere geographische Entfernungen funktioniert.

Zuletzt genannt und doch am wichtigsten: Ohne die rückhaltlose Unterstützung meiner Eltern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Für diese Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

## **Abstract**

Matthias Arndt

### **Sulfitoxidase aus dem marinen Bakterium *Sulfitobacter pontiacus***

Enzyme aus marinen Organismen gewinnen immer mehr an Bedeutung. Von Interesse sind dabei z.B. Enzyme aus extremophilen Organismen, die bereits für verschiedene industrielle Anwendungen eingesetzt werden. Ebenso interessant sind Enzyme, die besondere Reaktionswege katalysieren und für Biotransformationen Verwendung finden, wie z.B. Halogenasen und Polyketidsynthasen, oder auch marine Enzyme die im Bereich der Biosensorik eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gewinnung des Enzyms Sulfitoxidase aus dem marinen Bakterium *Sulfitobacter pontiacus* untersucht. Das lösliche, AMP-unabhängige Enzym ist intrazellulär lokalisiert. Seine Biosynthese wird durch die Gegenwart von Sulfit im Kultivierungsmedium induziert.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Kultivierungsprozess im Hinblick auf die Produktion der Sulfitoxidase zu optimieren. Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Medium Marine Broth 2216, wurden verschiedene Parameter untersucht und optimiert. Deutliche Steigerungen der Prozessausbeuten konnten durch den Zusatz des Komplexbildners EDTA sowie durch Pufferung der Kultivierungsmedien mit HEPES erreicht werden. Die Konzentration des Basismediums Marine Broth 2216 konnte ebenso optimiert werden wie die Anfangskonzentration der Kohlenstoffquelle Acetat. Basierend auf dem optimierten Medium wurden für Schüttelkulturen außerdem verschiedene Prozessparameter, wie die Kultivierungstemperatur oder die Zeitpunkte für die Induktion und die Zellernte, optimiert. Mit dem Einsatz von in Polyvinylalkohol-Gelen immobilisierten Sulfit-Spezies konnte außerdem ein alternativer Ansatz zur Versorgung der Schüttelkulturen mit Sulfit etabliert werden.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen zur Aufreinigung der Sulfitoxidase. Neben klassisch-mechanischen Zellaufschlussverfahren wurde auch ein fraktionierter, enzymatischer Zellaufschluss untersucht und erfolgreich umgesetzt. Das Enzym wurde per Ionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt. Hier wurden mit dem relativ neuen Verfahren der membrangebundenen Chromatographie gute Erfolge erzielt. Durch die Abfolge „Zellaufschluss per Ultraschall“ – „Kationenaustauschchromatographie“ – „Ultrafiltration“ wurde ein sehr sauberes Produkt erhalten. Vom Rohextrakt bis zum Retentat der Ultrafiltration wurde so eine Aufreinigung um den Faktor 20 erreicht.

**Stichworte:** *Sulfitobacter pontiacus*, Sulfitoxidase, Kultivierungsbedingungen

## Abstract

Matthias Arndt

### **Sulfite Oxidase from the marine Bacterium *Sulfitobacter pontiacus***

Enzymes from marine organisms are becoming more and more important, e.g. enzymes from extremophilic organisms are already in use in many industrial processes and also enzymes that catalyse uncommon transformations, like halogenases, or enzymes that could be used in the field of biosensors gain more and more interest. In this work the production of the enzyme Sulfite Oxidase from the marine bacterium *Sulfitobacter pontiacus* has been investigated. This soluble enzyme is located intracellularly and its biosynthesis is induced by the presence of sulfite in the cultivation media.

One aim of this work was the optimisation of the cultivation process in respect to the production of the enzyme. Based on the commercially available cultivation medium Marine Broth 2216, several parameters were optimised. Distinct increases in the overall process yield were achieved by the addition of the complexing agent EDTA and by the addition of the buffering component HEPES. The concentration of the basic medium Marine Broth 2216 as well as the starting concentration of the carbon source acetate could be optimised. On the basis of this resulting medium, parameters like cultivation temperature, induction time and harvest time could also be optimised for shake flask cultures. By the use of sulfite species immobilised in polyvinyl alcohol gels, an approach to the controlled and continuous feeding of sulfite to the cultivation media could be established.

Investigations on the purification of the enzyme sulfite oxidase were another important part of this work. Cell disruption by mechanical means, as well as a fractionated, enzymatical cell lysis were used successfully. The enzyme was further purified by ion exchange chromatography. The use of membrane chromatography lead to good results. By the sequence of “cell disruption by ultrasonification” – “cation exchange chromatography” – “ultrafiltration”, a product of high purity could be obtained. From the crude extract up to the retentate of the ultrafiltration, a purification by the factor of 20 was achieved.

**Key words:** *Sulfitobacter pontiacus*, Sulfite Oxidase, cultivation conditions

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Meeresbiotechnologie – Ein Überblick</b>	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>9</b>
<b>3 Sulfitoxidasen, Sulfite in Lebensmitteln und Sulfitanalytik</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Sulfite in Lebensmitteln</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Sulfit-Analytik im Lebensmittelbereich</b>	<b>17</b>
<b>4 Optimierung der Kultivierungsbedingungen</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Optimierung des Kultivierungsmediums ausgehend vom kommerziell erhältlichen Medium Marine Broth 2216</b>	<b>20</b>
4.1.1 Einfluss des Komplexbildners EDTA auf <i>Sulfitobacter pontiacus</i> -Kultivierungen	21
4.1.1.1 Kultivierungen mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen	22
4.1.2 Einfluss unterschiedlicher Acetatanfangskonzentrationen	23
4.1.2.1 Kultivierungen mit verschiedenen Acetatanfangskonzentrationen	25
4.1.3 Einfluss unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen des Basismediums MB 2216 auf Kultivierungen von <i>S. pontiacus</i>	27
4.1.4 Einfluss von Thiosulfat	28
4.1.4.1 Schüttelkulturen mit Thiosulfat ohne Zugabe von Sulfit	31
4.1.4.2 Schüttelkulturen mit Thiosulfat und Zugabe von Sulfit	33
4.1.5 Pufferung des Kultivierungsmediums von <i>S. pontiacus</i> mit HEPES	36
4.1.5.1 Schüttelkulturen mit HEPES-gepufferten Medien	37
4.1.6 Temperatur und Sauerstoffeintrag in Schüttelkultur	40
4.1.7 Einfluss von Erntezeitpunkt und Induktionszeitpunkt auf die erreichbaren spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten	43
4.1.8 Vergleich einer Fermenterkultur mit optimiertem Medium mit einer Fermenterkultur vor Optimierung	46
4.1.8.1 Ergebnisse aus zwei Kultivierungen im Vergleich	48
4.1.9 Fazit	50

<b>4.2 Kontrollierte Sulfidversorgung der Kultivierungsmedien</b>	<b>51</b>
4.2.1 Immobilisierungstechniken	56
4.2.2 Ionotrope Gele als Einschlussmatrix	57
4.2.2.1 Untersuchungen zur Immobilisierung von Calciumsulfid in Alginat-Perlen	60
4.2.2.2 Untersuchungen zur Immobilisierung von Magnesiumsulfid in Alginat-Perlen	61
4.2.3 Polyvinylalkohol als Einschlussmatrix	63
4.2.3.1 Untersuchungen zur Immobilisierung von Calciumsulfid in LentiKats®	65
4.2.3.2 Untersuchungen zur Immobilisierung von Magnesiumsulfid in LentiKats®	71
4.2.4 Fazit	72
<b>5 Aufreinigung der Sulfidoxidase aus <i>Sulfidobacter pontiacus</i></b>	<b>73</b>
<b>5.1 Voruntersuchungen</b>	<b>76</b>
<b>5.2 Abtrennung der Biomasse vom Kultivierungsmedium</b>	<b>79</b>
<b>5.3 Untersuchungen zum Zellaufschluss der <i>S. pontiacus</i> Biomasse</b>	<b>81</b>
5.3.1 Mechanischer Zellaufschluss: Mörsern der Biomasse und Aufschluss mit der Schwinkugelmühle	82
5.3.2 Mechanischer Zellaufschluss: Behandlung von <i>S. pontiacus</i> mit Ultraschall	83
5.3.3 Fraktionierter enzymatischer Zellaufschluss: Ein alternativer Ansatz?	88
5.3.3.1 Die Zellwand gram-negativer Bakterien	88
5.3.3.2 Enzymatische Zell-Lyse und fraktionierte Zellaufschlussverfahren	91
5.3.3.3 Untersuchungen zum fraktionierten Zellaufschluss von <i>Sulfidobacter pontiacus</i>	92
5.3.4 Beurteilung der verschiedenen Zellaufschlussverfahren	98
<b>5.4 Untersuchungen zur Aufreinigung der Sulfidoxidase aus <i>S. pontiacus</i> über Ionenaustauschchromatographie</b>	<b>99</b>
5.4.1 Vorversuche zum Bindungsverhalten des Enzyms an verschiedenen Ionenaustauschern	99
5.4.2 Membranadsorber-Medien in der Chromatographie	102
5.4.3 Das verwendete Membran-System	104



5.4.4 Untersuchungen zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus <i>S. pontiacus</i> über ein Sartobind® S 100-Modul	105
<b>5.5 Ein Konzept zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus <i>S. pontiacus</i></b>	<b>111</b>
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>113</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>118</b>
<b>7.1 Zusammensetzung der Kultivierungsmedien</b>	<b>118</b>
7.1.1 Marine Broth 2216	118
7.1.2 Andere Medien: MB50, MB50+EDTA und MB50+EDTA+HEPES	118
<b>7.2 Etablierung eines Assays zur Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität</b>	<b>119</b>
7.2.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Kaliumhexacyanoferrat (III) und Ermittlung des möglichen Arbeitsbereiches	121
7.2.2 Sulfitoxidase-Assay	122
<b>7.3 Proteinanalytische Methoden</b>	<b>124</b>
7.3.1 Proteinbestimmungen an gereinigter Sulfit-Oxidase	124
7.3.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	125
<b>7.4 Prozessanalytik</b>	<b>127</b>
7.4.1 pH-Wert	127
7.4.2 Gelöstsauerstoffgehalt	127
7.4.3 Abgaskohlendioxid und –sauerstoff	127
7.4.4 Bestimmung der Optischen Dichte	128
<b>7.5 Komplexstabilitätskonstanten von Metallionen-EDTA-Komplexen</b>	<b>128</b>
<b>7.6 Kapillarelektrophoretische Methoden</b>	<b>129</b>
7.6.1 Bestimmung anorganischer Anionen durch Kapillarelektrophorese – Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Sulfit neben Sulfat	131
7.6.1.1 Methodenentwicklung mit Chromat als UV-aktiver Komponente	132
7.6.1.2 Methodenentwicklung mit Phthalat als UV-aktiver Komponente	134
7.6.1.3 Kalibration basierend auf der Phthalat-Methode	136
<b>7.7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>138</b>
<b>8 Literatur</b>	<b>140</b>

# 1 Meeresbiotechnologie – Ein Überblick

*... und alles Wasser im Strom wurde in Blut verwandelt. Und die Fische starben im Strom, und der Strom wurde stinkend, so dass die Ägypter das Wasser aus dem Nil nicht trinken konnten ...*

2. Buch Mose, 7.20-7.22

Bei diesem Bibelzitat handelt es sich wahrscheinlich um die erste schriftlich niedergelegte Beschreibung einer roten Algenblüte („Algenpest“, oder „Red Tide“) im Nildelta<sup>1</sup>. Die Beobachtung außergewöhnlicher Phänomene in marinen Habitaten findet somit schon seit langer Zeit statt. Neben Fischen und Algen werden auch andere Produkte aus marinen Lebensräumen schon seit langem genutzt, wie am Beispiel des Farbstoffs Tyrischer Purpur deutlich wird. Dieser ist bereits seit der Antike bekannt und wurde aus marinen Schnecken extrahiert:

*Noch ist das Weltmeer. Wer erschöpft es je? Es nährt noch vielen Saft des Purpurs uns, stets neuen, viel Gewande drin zu färben.*

Aischylos; Agamemnon, fünfte Szene;  
in der Übersetzung von Karl Gustav Vollmoeller

Für die Gewinnung eines einzigen Gramms Purpur wurden 10.000 bis 12.000 Schnecken<sup>2</sup> benötigt (Friedländer, 1909). Diese Tatsache und das aufwendige Herstellverfahren machten den Purpur sehr teuer. Während der Regierungszeit des Kaisers Aurelianus (270-275 n.Chr.) soll ein Kilo Purpurwolle nach heutigem Geldwert zwischen 3000 und 3500 € gekostet haben<sup>3</sup>. Purpur war damit ein Farbstoff der Könige und Herrscher. Auch in der heutigen Zeit erinnern noch einige Symbole und Insignien an die einstige Bedeutung des Purpurs. So finden

---

<sup>1</sup> Derartige Algenblüten werden von einzelligen Mikroalgen (Phytoplankton) verursacht. Diese bilden Neurotoxine wie z.B. die Brevetoxine. Die Tatsache, dass diese Mikroalgen den Anfang der marinen Nahrungskette bilden, führt zu massivem Fischsterben und auch zu Vergiftungserscheinungen bei den Küstenbewohnern, wie Erbrechen, Diarrhoe und Bauchkrämpfen. Die wirtschaftlichen wie auch die gesundheitlichen Schäden sind enorm. Im Jahre 1972 wurde beispielsweise eine Algenblüte entlang der japanischen Küstenlinie in der Präfektur Aichi beobachtet, der in Aquakultur gehaltene Fische im Wert von 500 Millionen Euro zum Opfer fielen. Und von 1987 bis 1988 wurde entlang der amerikanischen Ostküste zwischen New Jersey und Florida eine Algenblüte beobachtet, der 760 Delphine zum Opfer fielen (Nicolaou und Sorensen, 1996).

<sup>2</sup> Verwendung fanden hauptsächlich die Arten *Murex brandaris* und *Trunculariopsis trunculus* (Melzer et al., 2001).

<sup>3</sup> Auch heute noch muss für ein Gramm echten Purpurs bis zu 2000 € bezahlt werden.

sich z.B. an den Kragenspiegeln von Staboffizieren noch immer die Purpurstreifen, die bereits römische Würdenträger an ihrer Kleidung trugen. Purpur ist noch immer die Farbe der Kardinäle<sup>4</sup>, und auch der bei Ehrenempfängen und Staatsbesuchen ausgerollte „Rote Teppich“ zeigt noch heute, welche Bedeutung der Purpur einst hatte (Melzer et al., 2001)<sup>5</sup>.

Obwohl also, wie die beiden genannten Beispiele zeigen, der Lebensraum Meer schon seit Jahrtausenden intensiv beobachtet und auch genutzt wird, begann die Entwicklung einer *Meeresbiotechnologie*, die auch als „blaue Biotechnologie“ bezeichnet wird, erst vor ungefähr vierzig bis fünfzig Jahren.

Die Meeresbiotechnologie fand ihren Anfang in der systematischen Untersuchung der Mikroorganismen und niederen Tiere in flachen, küstennahen, vorwiegend tropischen Lebensräumen. Das Vordringen in tiefere Wasserschichten erfolgte dann parallel zur Entwicklung der Tauchtechnik.

Mit der Entwicklung fortschrittlicherer Techniken, wie dem „SCUBA- und CCUBA-Diving“<sup>6</sup> in den sechziger Jahren konnte man in Wassertiefen von ca. 150 Metern vorstoßen (El Sayed et al., 2000). Weitere technische Fortschritte ermöglichten dann Untersuchungen in noch tieferen Schichten der Wassersäule, und mittlerweile ist man in der Lage, mit Hilfe von unbemannten Tauchrobotern in Wassertiefen von mehreren Kilometern vorzudringen. Im japanischen DEEPSTAR-Programm wurden beispielsweise barophile<sup>7</sup> Mikroorganismen aus Wassertiefen bis zu 11 Kilometern isoliert und charakterisiert (Kato, 1998).

Im Laufe der Entwicklung der „blauen Biotechnologie“ haben sich jedoch nicht nur die Technologien verändert, sondern auch die Herangehensweise der Forscher hat sich grundlegend gewandelt. In den 60er Jahren beschränkte sich die Forschung an marinen Produkten hauptsächlich auf chemische Studien. Das biomedizinische Potential mariner Naturstoffe rückte erst in der zweiten Dekade meeresbiotechnologischer Forschung, also mit Beginn der 70er Jahre, in den Fokus. Andere Produkte aus dem Lebensraum Meer, wie z.B. Enzyme aus psychrophilen<sup>8</sup> Organismen, rückten sogar noch später ins Interesse der modernen Biotechnologie (Carté, 1996). Mittlerweile spannt die Meeresbiotechnologie einen Bogen von den marinen Naturstoffen zu den Nutraceuticals und von Biopolymeren über die biologische Altlastensanierung bis zur Wasserstoffproduktion mit Hilfe mariner Mikroorganismen. Attaway und Zaborsky (1993) prägten eine Definition der Marinen

---

<sup>4</sup> Der Kardinalsmantel heißt auf italienisch *porpora*, der Kardinal selbst heißt *porporato*.

<sup>5</sup> Die Struktur des Farbstoffs wurde jedoch erst 1996 als 6,6'-Dibromindigo identifiziert (Bonghiorni und Pietra, 1996).

<sup>6</sup> SCUBA = Self contained underwater breathing apparatus; CCUBA = Closed circuit underwater breathing apparatus.

<sup>7</sup> Barophil = druckliebend.

<sup>8</sup> Psychrophil = kälteliebend.

Biotechnologie als „zweckorientierte und kontrollierte Nutzung mariner Organismen oder ihrer Bestandteile“<sup>9</sup>.

Die Meeresbiotechnologie wird von den besonderen Verhältnissen im Lebensraum Meer bestimmt. Die Weltmeere bedecken ca. 70% der Erdoberfläche und sind wahrscheinlich die vielfältigste und artenreichste Biosphäre auf unserem Planeten. Unterschiedlichste Lebensräume bilden unterschiedlichste Nischen, in denen die Evolution eine Vielzahl an Lebensformen von den Mikroorganismen bis zu den Säugetieren hervorgebracht hat. Der Lebensraum Meer umfasst einen großen Temperaturbereich von  $-1,5^{\circ}\text{C}$  in antarktischen Gewässern bis zu  $350^{\circ}\text{C}$  in Tiefseehydrothermalsystemen. Drücke von einer Atmosphäre an der Wasseroberfläche bis zu über 1000 Atmosphären, Lichtverhältnisse von höchster Strahlungsdichte bis zu absoluter Dunkelheit und verschiedenste Nährstoffvorkommen bestimmen den Lebensraum Meer (Bernan et al., 1997; Cowan, 1997; De Long, 1997; Fenical, 1997). Die Diversität, besonders der Mikroorganismen, im Meer ist beeindruckend: Während an Land schon seit längerem kaum noch neue Bakterienarten entdeckt werden, nimmt man an, dass im Meer weniger als 5% aller Bakterienarten bisher bekannt sind (Cowan, 1997). Berücksichtigt man modernere taxonomische Methoden, wie die Analyse der 16S rRNA, so ist sogar davon auszugehen, dass nur ca. 1% aller marinen Bakterienarten bisher identifiziert wurden (Lindequist und Schweder, 2001).

Die Allgegenwart des Wassers unterscheidet den Lebensraum Meer grundsätzlich von terrestrischen Habitaten. Das Wasser erweitert die Bewegungsmöglichkeiten mariner Organismen, insbesondere mariner Mikroorganismen, beträchtlich. Auch die Möglichkeiten zur Kommunikation oder zur Abwehr von Feinden werden durch die Gegenwart des Wassers eröffnet. Die Anpassungsmechanismen insbesondere der niederen marinen Organismen an ihren Lebensraum unterscheiden sich oftmals grundlegend von denen landbasierter Lebewesen. Die besonderen Verhältnisse im Lebensraum führen daher oft zur Notwendigkeit Sekundärmetabolite zu produzieren, sei es um Fressfeinde abzuwehren, um miteinander zu kommunizieren, um konkurrierende Nachbarn zu verdrängen und sich vor Überwuchs zu schützen, oder um sich vor UV-Strahlung zu schützen (Proksch, 1999).

Obwohl von den bekannten ca. 120.000 Naturstoffen bisher nur ungefähr 10% aus marinen Quellen stammen (Jaspars, 1998), hat die Suche nach bioaktiven Naturstoffen den größten Impuls zur Entwicklung der blauen Biotechnologie gegeben. Da die Vermutung vorherrscht, dass viele marine Organismen Zytostatika synthetisieren müssen, um sich im Lebensraum Meer zu behaupten (Schmitz et al., 1993; Jaspars, 1998; Faulkner, 2000), wurde ein starker Fokus auf die Suche nach Wirkstoffen zur Behandlung von Tumorerkrankungen<sup>10</sup> gerichtet.

---

<sup>9</sup> “Use of marine organisms or their constituents for useful purposes in a controlled fashion.” (Attaway und Zaborsky, 1993)

<sup>10</sup> Tumorerkrankungen sind in den USA nach den Herzerkrankungen mittlerweile die zweithäufigste Todesursache (*SEER Cancer Statistics Review* des amerikanischen National Cancer Institutes, NCI).

Das Interesse an derartigen Organismen beschrieb David Newman, Chemiker am amerikanischen National Cancer Institute mit dem Kommentar (Liles, 1996):

„If you are fat, fleshy, brightly coloured and slow moving – I want to see you! There must be something in you, on you or travelling with you, that stops you from being eaten – and not just by fishes, but by any other organisms in the food chain.“

Einige der bisher isolierten marinen Naturstoffe befinden sich derzeit in vorklinischen oder klinischen Studien. Bekanntestes Beispiel ist sicherlich das Bryostatin 1, ein Wirkstoff, der aus der Bryozoe *Bugula neritina* isoliert wurde und in klinischen Studien der Phase II in den USA Wirksamkeit gegen Nierenkrebs, Melanome und das Non-Hodgkin Lymphom zeigte (Faulkner, 2000). Die Wirkstoffe Ecteinascidin-743<sup>11</sup> und Aplidin<sup>12</sup> (Dehydrodidemnin B), die beide von der spanischen Firma PharmaMar entwickelt und vermarktet werden, deuten darauf hin, dass in naher Zukunft auf dem Feld der marinen Naturstoffforschung auch mit kommerziellen Erfolgen zu rechnen sein wird.

Bereits kommerziell vermarktet werden Extrakte der Hornkorallenart *Pseudopterogorgia elisabethae*. Diese enthalten Pseudopterosine und werden wegen ihrer beruhigenden, entzündungshemmenden und schmerzlindernden Wirkung Kosmetikprodukten der Firma Estée Lauder beigemischt (Liles, 1996; Faulkner, 2000).

Screeningversuche mit Oberflächen besiedelnden Bakterien haben gezeigt, dass auch der Anteil an Antibiotika produzierenden Bakterien in marinen Habitaten deutlich höher ist als in terrestrischen. Von 400 Bakterienstämmen, die von den Oberflächen von Algen oder Invertebraten isoliert wurden, sind 35% durch die Produktion von antimikrobiellen Stoffen aufgefallen. Durch Zugabe von Kulturüberständen anderer Bakterienkulturen konnten selbst Mikroorganismen zur Antibiotikaproduktion angeregt werden, die unter normalen Kultivierungsbedingungen nicht aufgefallen waren (Burgess et al., 1999; Mearns-Spragg et al., 1998).

Doch auch Toxine marinen Ursprungs, die als Biopharmazeutika nicht in Frage kommen, finden Anwendung in molekularbiologischen Fragestellungen. So werden z.B. die Neurotoxine Saxitoxin und Tetrodotoxin – beides sehr selektive und spezifische Blockierer von Natriumkanälen – zur Untersuchung der Nervenleitung eingesetzt (Carté, 1996; Stryer, 1999). Saxitoxin wird von marinen Dinoflagellaten, z.B. *Gymnodium catenatum* und *Pyrodinium bahamense*, synthetisiert. Tetrodotoxin, von dem bisher angenommen wurde,

---

<sup>11</sup> Ecteinascidin-743 wird aus *Ecteinascidia turbinata* isoliert und hat in Phase I Studien Wirksamkeit gegen mit herkömmlichen Mitteln nicht therapierbare Sarkome gezeigt (Valoti et al., 1998; Takebayashi et al., 1999).

<sup>12</sup> Aplidin hat in vorklinischen Studien Aktivität gegen Tumore in Darm, Blase, Lunge, Prostata und Magen gezeigt, außerdem gegen Lymphome und Melanome (Faulkner, 2000).

dass es vom japanischen Kugel- oder Fugu-Fisch<sup>13</sup> (*Sphaeroides rubripes*) synthetisiert wird, ist mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich ein Produkt mariner Bakterien (Simidu et al., 1990). Neben Saxitoxin und Tetrodotoxin sind noch ca. 30 weitere Toxine marinen Ursprungs kommerziell erhältlich (Lindequist und Schweder, 2001).

Neben dem Gebiet der Naturstoffforschung ist der Bereich der Lebensmittelproduktion ein weiteres wichtiges Feld der blauen Biotechnologie. In Ostasien werden beispielsweise bereits seit Jahrhunderten Makroalgen zur Produktion von Nahrungsmitteln kultiviert. Das wichtigste Algenprodukt in heutiger Zeit ist Nori, das getrocknete Algenblatt bestimmter Spezies der Rotalge *Porphyra*. Nori ist ein wichtiger Bestandteil des auch in Europa immer beliebter werdenden Sushi. Weitere wichtige Lebensmittel, die aus Makroalgen gewonnen werden, sind Wakame (*Undaria pinnatifida*) und Kombu (*Laminaria japonica*) (Ott, 1996; Radmer, 1996). Auch die Produktion von Tieren in Aquakultur wird schon sehr lange betrieben. Bereits die Römer hielten Meerestiere, und auch in Japan wurden bereits vor Christi Geburt Austern kultiviert (Ott, 1996). Anfang der 90er Jahre wurden bereits ca. 20% der weltweiten Fischproduktion in Aquakultur gezüchtet (Meyers, 1994), manche Fischarten, wie z.B. der atlantische Lachs (*Salmo salar*), stammen bereits nahezu zu hundert Prozent aus Aquakulturen<sup>14</sup>. Auch von anderen „Luxusprodukten“, wie Miesmuscheln, Austern und Schalentieren, stammen heute große Anteile am weltweiten Verkauf aus der Aquakultur. Leider sind die Hälterungsmethoden ökologisch meist sehr bedenklich, und auch der oft notwendige Einsatz von Antibiotika hat schon mehrfach zu Lebensmittelskandalen geführt<sup>15</sup>. Auch in diesem Bereich erhofft man sich Verbesserungen durch modernere meeresbiotechnologische Methoden. Ein Ansatz zur Reduktion des Antibiotikaeinsatzes wären beispielsweise der Einsatz probiotischer Kulturen oder die Kokultivierung mariner Mikroorganismen mit antimikrobiellem Potential (Lindequist und Schweder, 2001).

Zunehmende Wichtigkeit erlangen auch die Bereiche des Functional Food<sup>16</sup> und der Nutraceuticals<sup>17</sup>. Im Bereich der blauen Biotechnologie sind hier vor allem die polyungesättigten Fettsäuren (PUFA, **polyunsaturated fatty acids**) zu nennen. Besonders wichtig sind die beiden PUFAs Eicosapentaensäure (EPA, **eicosopentaenic acid**) und

---

<sup>13</sup> Der Fugu-Fisch ist in Japan eine Delikatesse und darf dort wegen der Giftigkeit bestimmter tetrodotoxinbelasteter Organe nur von erfahrenen Köchen zubereitet werden.

<sup>14</sup> Bereits im Jahre 1991 stammten nur noch 3,4% des weltweit verkauften Atlantiklachs aus Wildfängen (Ott, 1996).

<sup>15</sup> Schlagzeile auf der Titelseite der Hannoverschen Allgemeinen Zeitung vom 15.1.2002: „Hochgiftige Krabben zu Hühnerfutter verarbeitet“. Beschrieben wird ein Fall, in dem mit dem Antibiotikum Chloramphenicol belastete Krabben aus Südostasien zu Tierfutter weiterverarbeitet wurden.

<sup>16</sup> Eine international akzeptierte Kurzdefinition des Begriffs „Functional Food“ besteht darin, dass diesen Lebensmitteln ein physiologischer oder gesundheitlicher Zusatznutzen zukommt, der über die Effekte der klassischen Nährstoffe in solchen Produkten hinausgeht (Remmermann, 2001).

<sup>17</sup> Als Nutraceuticals (**nutrition** = Ernährung, **Pharmaceutical** = Medikament) werden Präparate bezeichnet, die als Tabletten, Kapseln, Pulver oder Ampullen isolierte, teilweise chemisch reine Lebensmittelinhaltsstoffe in hochdosierter Form enthalten (Remmermann, 2001).

Docosahexaensäure (DHA, **docosa**hexaenic acid). Beide reduzieren den Cholesteringehalt im Blut und die Neigung der Blutplättchen zur Aggregation und senken damit das Thrombose- und Arterioskleroserisiko (Linko und Hayakawa, 1996; Gill und Valivety, 1997). Wegen ihrer Wichtigkeit für die kindliche Entwicklung hat deshalb die WHO eine Empfehlung zur Ergänzung der Kindernahrung mit DHA erlassen. PUFA werden sowohl von marinen Makro- als auch von marinen Mikroorganismen in größeren Mengen gebildet, und es ist anzunehmen, dass die größer werdende Nachfrage nach ihnen auch bald zu Produktionsverfahren mit Hilfe mariner Organismen führen wird. Derzeit ist allerdings noch Fischöl die wichtigste Quelle für PUFA (Lindequist und Schweder, 2001). Patente zur Produktion von PUFA mit marinen Pilzen (Barclay, 1992, 1994) zeigen aber, dass insbesondere auf marinen Mikroorganismen basierende Produktionsverfahren zunehmend wichtig werden. Besondere Wichtigkeit könnten dabei kälte-adaptierte (psychrophile oder psychrotolerante) Bakterien erlangen. Es wird nämlich vermutet, dass bei ihnen der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren zur Flexibilität der Zellmembranen beiträgt und damit das Überleben dieser Bakterienarten (hauptsächlich *Shewanella* und *Colwellia*) unter den extremen Bedingungen überhaupt erst ermöglicht.

Von Interesse für die Lebensmittelindustrie sind außerdem „Frostschutzproteine“ und bestimmte Enzyme aus kälte-adaptierten Organismen. Frostschutzproteine wurden sowohl in Fischen, als auch in Invertebraten gefunden und besitzen die Eigenschaft, sich an entstehende Eiskristalle zu binden und deren weiteres Wachstum zu verhindern. Durch Klonierung und Überexpression der die entsprechenden Proteine kodierenden Gene in *Pichia pastoris* konnten Ausbeuten von bis zu 30 mg/L erreicht werden (Loewen et al., 1997). Anwendungen für solche Frostschutzproteine finden sich beispielsweise in der Herstellung von Tiefkühlkost oder Speiseeis (Feeney und Yeh, 1998).

Enzyme aus psychrophilen Mikroorganismen haben bereits bei niedrigen und moderaten Temperaturen hohe spezifische Aktivitäten. In der Nahrungsmittelindustrie könnten solche Enzyme aus verschiedenen Gründen zu Verbesserungen der jeweiligen Prozesse führen:

- Enzyme aus psychrophilen Organismen können helfen Energie zu sparen.
- Wegen der niedrigeren Prozesstemperaturen werden empfindliche Komponenten besser vor Zersetzung geschützt.
- Das Wachstum von mesophilen kontaminierenden Keimen kann bei niedrigen Prozesstemperaturen besser verhindert werden.
- Die Enzyme können nach Beendigung des Prozesses bereits durch moderate Temperaturerhöhungen inaktiviert werden.

Beschrieben wurden bereits der Einsatz von Amylasen, Pectinasen und Cellulasen in Backprozessen, bzw. in der Fruchtsaftproduktion (Gerday et al., 2000; Lea, 1995) und der

Einsatz von  $\beta$ -Galactosidasen in der Produktion von Molkereiprodukten (Law und Goodenough, 1995).

Der Einsatzbereich mariner Enzyme beschränkt sich jedoch nicht nur auf den Bereich der Lebensmittelproduktion, sondern auch für den Bereich der Biotransformation, und für analytische Anwendungen werden marine Enzyme zunehmend interessant.

Im Bereich der Biotransformation sind besonders Halogenasen und die Haloperoxidasen von Interesse. Diese Enzyme bewirken die Halogenierungen ihrer Substrate (van Pèe, 1996/2001) und könnten zur Umwandlung bereits bekannter Wirkstoffe in ihre halogenierten Derivate eingesetzt werden. Eine Halogenierung kann dabei sowohl direkt zur Veränderung der biologischen Aktivität des Wirkstoffs genutzt werden, oder aber als Ausgangspunkt weiterer chemischer Derivatisierungen dienen. Halogenasen reagieren, im Gegensatz zu den relativ unspezifischen Haloperoxidasen, sehr substrat- und regiospezifisch und haben deshalb das größere Potential für zukünftige Anwendungen (Hohaus et al., 1997).

Eine weitere sehr wichtige Enzymgruppe sind die Polyketidsynthasen. Diese katalysieren die Verknüpfung von Acyl-Coenzym A-Einheiten zu verschiedenartigen Ringsystemen und sind für den Aufbau der Naturstoffe mit Polyketidgrundgerüst verantwortlich. Vor dem Hintergrund der sich seit den 80er Jahren entwickelnden „Kombinatorischen Biosynthese“ sind aber nicht nur die Enzyme selbst, sondern vor allem auch die sie kodierenden Gene von großem Interesse (Holzgrabe und Bechthold, 1999). Wegen der Vielfalt an bisher isolierten marinen Naturstoffen mit Polyketidgrundgerüst sind auch hier die Enzyme mariner Organismen besonders interessant.

Klassische Beispiele für den Einsatz mariner Proteine im Bereich der Biosensorik sind das grünfluoreszierende Protein (GFP) und das Enzym Luciferase. Das grünfluoreszierende Protein findet sich in speziellen Organen der Quallenart *Aequorea victoria* (Jones et al., 1999). Es wurde durch gezielte Mutationen in seiner Funktionalität verbessert und findet nun breite Anwendung als *Tag* zur Überwachung der Genexpression in gentechnisch veränderten Organismen. Auch Entwicklungen zum Einsatz von GFP-exprimierenden Mikroorganismen im Bereich Umweltmonitoring werden beschrieben (Bartolome, 2002).

Luciferasen sind für das in aquatischen Habitaten weit verbreitete Phänomen der Biolumineszenz<sup>18</sup> verantwortlich. Im Lebensraum Meer wurden die Enzyme aus den Lichtorganen der Tiefseefische *Anomalops katoptron* und *Photoblepharon palpebratus* isoliert (Haygood und Distel, 1993). Dort werden sie von mit den Fischen in Symbiose lebenden Bakterien (hauptsächlich der Spezies *Vibrio*) produziert. Luciferasen sind kommerziell erhältlich und werden zusammen mit NAD(P)H:FMN Oxidoreductasen zur quantitativen Bestimmung von NAD(P)H in Biosensorsystemen angewandt. Intakte

---

<sup>18</sup> In Wassertiefen unter 200 m ist Biolumineszenz die einzige Lichtquelle.



lumineszierende Bakterien finden außerdem Anwendungen als Biosensoren zur Überwachung von Toxinen in Umweltproben<sup>19</sup>.

Die Funktionalitäten der genannten Enzyme haben ihre Ursache in den besonderen Lebensbedingungen im Habitat Meer. Besondere Temperatur- (Extremozyme) und Lichtverhältnisse (GFP und Luciferase), hohe Konzentrationen an bestimmten Ionen im Lebensraum<sup>20</sup> (Halogenasen und Haloperoxidasen) sowie die Notwendigkeit, bestimmte Metabolite zu produzieren (Polyketidsynthesen), haben zur Entstehung dieser Funktionalitäten geführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein marines Bakterium eingesetzt, dessen besondere Stoffwechseleigenschaften ebenfalls aus den besonderen Lebensbedingungen im Lebensraum Meer resultieren.

---

<sup>19</sup> In Deutschland wurde dieser Ansatz 1991 eingeführt. Ein auf *Photobacterium phosphoreum*, bzw. *Vibrio fischeri* basierendes Verfahren zur Untersuchung von Abwasser und wässrigen Lösungen von Prüfsubstanzen wird in der DIN 38412 („Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“) beschrieben.

<sup>20</sup> Im marinen Kontext ist hier insbesondere das Bromid-Ion zu nennen, dessen Konzentration im Meerwasser im Vergleich zu terrestrischen Habitaten hoch ist. Im marinen Bereich werden deshalb vergleichsweise oft bromierte Sekundärmetabolite gefunden.

## 2 Zielsetzung

Während Untersuchungen zur Thiosulfatoxidation an einer Schwefelwasserstoff- / Sauerstoff-Grenzschicht im Schwarzen Meer haben Sorokin et al. (1995) eine Anzahl an heterotrophen Bakterien isoliert, die fähig waren, Thiosulfat bis zum Sulfat zu oxidieren. Einer der isolierten Stämme fiel dadurch auf, dass im Verlauf kontinuierlicher Kulturen mit Thiosulfat-Zufütterung im Überschuß kein Sulfit akkumuliert wurde. Einer relativ niedrigen Befähigung zur Thiosulfatoxidation (zum Sulfit) stand eine extrem hohe Aktivität an Sulfitoxidation zum Sulfat gegenüber.

Nähere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem Isolat um eine neue Art –*Sulfitobacter pontiacus*– handelt. Weiterhin wurde gezeigt, dass für die hohe Aktivität an Sulfitoxidation eine lösliche AMP-unabhängige Sulfitoxidase verantwortlich ist.

Die Tatsache, dass, wie die nachfolgenden Abschnitte zeigen werden, mit Sulfitoxidase als biologischer Komponente von Biosensorsystemen der Analyt Sulfit spezifisch und mit hoher Empfindlichkeit quantifiziert werden kann, und die Wichtigkeit des Analyten Sulfit, insbesondere im Bereich der Lebensmittelindustrie, haben das Interesse auf dieses interessante marine Enzym gelenkt.

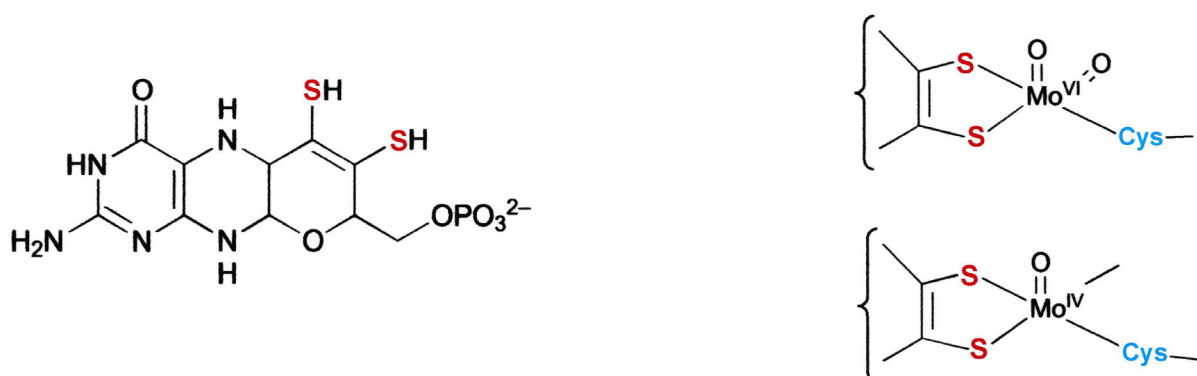
Im Rahmen dieser Arbeit sollten also die Kultivierungsbedingungen des marinen Bakteriums *Sulfitobacter pontiacus* eingehender untersucht und mit dem Ziel der Produktion des Enzyms Sulfitoxidase optimiert werden. Weiterhin sollte die Aufreinigung des Enzyms untersucht werden, um es in größeren Mengen zur Verfügung stellen zu können.

Die nachfolgenden Abschnitte beleuchten zuerst die Eigenschaften verschiedener Sulfitoxidasen. Es werden Quellen von Sulfitoxidasen vorgestellt und es wird auf die Bedeutung des Enzyms für eukaryontische und prokaryontische Organismen eingegangen. Weiterhin wird dann der Einsatz von Sulfiten in Lebensmitteln beleuchtet und es werden bisher beschriebene –und zum Teil kommerziell erhältliche– Systeme zur Analytik von Sulfit auf Basis von Sulfitoxidasen vorgestellt.

Den Hauptteil der Arbeit machen dann schließlich die Ergebnisse der Optimierung der Kultivierungsbedingungen und der Untersuchungen zur Aufreinigung des Enzyms aus.

### 3 Sulfitoxidasen, Sulfite in Lebensmitteln und Sulfitanalytik

Sulfitoxidasen katalysieren die Oxidation von Sulfit zum Sulfat. Die anfallenden Elektronen können dabei auf verschiedene Substrate übertragen werden. Im Organismus sind Sauerstoff oder Cytochrom *c* die bevorzugten Elektronenakzeptoren<sup>1</sup>, es sind aber auch Reaktionen mit nicht-natürlichen Elektronenakzeptoren wie z.B. Kaliumhexacyanoferrat (III) möglich (Rajagopalan, 1980). Das aktive Zentrum aller bisher beschriebenen Sulfitoxidasen enthält als Cofaktor das Molybdopterin (Abb. 3-1).



**Abbildung 3-1:** Der Molybdäncofaktor in Sulfitoxidase. Auf der linken Seite ist das Molybdopterin dargestellt, die rechte Seite zeigt die Bindungsverhältnisse im Enzym. In Rot sind die Schwefelatome des Molybdopterins dargestellt. Über den in Blau dargestellten Cystein-Rest erfolgt die Bindung an das Proteingerüst des Enzyms (nach Rees et al., 1997 und Stiefel, 1997).

Im Tierreich sind Sulfitoxidasen ubiquitär. Das Enzym dient im höheren Organismus der Entgiftung von exogenen Sulfiten und Schwefeldioxid und der Entgiftung endogenen Sulfits, welches durch den Abbau der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin entsteht (Abb. 3-2).

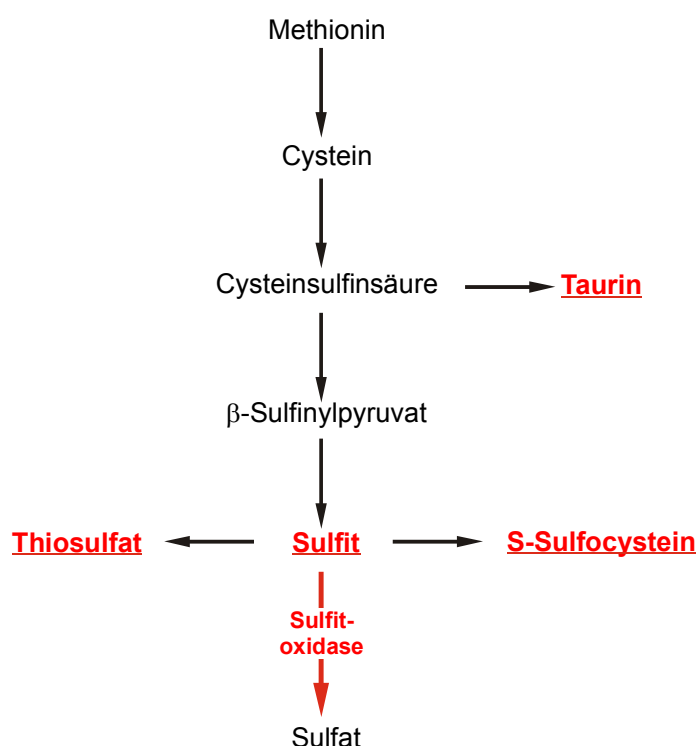
Sulfitoxidasen werden in verschiedenen Geweben produziert, der Rolle als Entgiftungsenzym entsprechend findet man die höchsten Konzentrationen jedoch in der Leber. So wurden z.B. Sulfitoxidasen aus Hühnerleber (Kipke et al., 1989; Ratnam, et al. 1996), aus Rinderleber (Fridovich et al., 1971), aus Rattenleber (Rajagopalan et al., 1977; Johnson et al., 1976; Southerland et al., 1978) und aus menschlicher Leber (Rajagopalan et al., 1977) isoliert.

Neben den Enzymen aus tierischen Quellen wurden auch Sulfitoxidasen aus anderen Organismen isoliert. Jolivet et al. (1995) haben z.B. Sulfitoxidase-Aktivität in Spinatblättern nachgewiesen, Ganai et al. (1997) beschrieben eine Sulfitoxidase aus Malvenblättern und Brune (1989 und 1995) beschreibt Sulfitoxidasen in phototrophen Bakterien. Am weitesten verbreitet sind Sulfitoxidasen jedoch in den thiotrophen Bakterien. Sugio et al. (1988) fanden

<sup>1</sup> Die Klassifizierung nach EC-System ordnet Sulfitoxidase je nach bevorzugtem Elektronenakzeptor die Nummern 1.8.2.1 (Sulfit: Cytochrom *c* Oxidoreductase), bzw. 1.8.3.1 (Sulfit: Sauerstoff Oxidoreductase) zu.

eine Sulfitoxidase in *Thiobacillus ferrooxidans*, Skłodowska (1990) berichtet von einer teilaufgereinigten Sulfitoxidase aus *Thiobacillus neapolitanus* und Kappler et al. (2000) isolierten eine Sulfitoxidase aus *Thiobacillus novellus*.

Ein Sulfitoxidase-Mangel<sup>2</sup> wirkt sich im menschlichen Organismus in Form von massiven neurologischen Störungen aus. Betroffene Patienten zeigen massive geistige Retardierungen. Dabei ist noch unklar, ob die Ursachen für diese Störungen des Zentralen Nervensystems in einem Mangel an Sulfat oder in einer Akkumulation an toxischem Sulfit begründet liegen (Edwards et al., 1999). Es werden weiterhin massive ophthalmologische Störungen, wie Strabismen und Linsenektopien, beobachtet (Parini et al., 1997). Aufgrund der schwerwiegenden Symptome tritt bei den betroffenen Patienten der Tod meist bereits im ersten Lebensjahrzehnt ein (Rupar et al., 1996).



**Abbildung 3-2:** Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren (nach Edwards et al., 1999). In Rot sind die Metabolite dargestellt, die im Blut und Urin bei Sulfitoxidase-Defizienz in erhöhten Konzentrationen nachweisbar sind.

Die Diagnose eines Sulfitoxidase-Mangels erfolgt, nach vorheriger Auswertung der anderen Symptome, über Schwefelmetabolite im Urin und im Blutplasma. Wie aus Abbildung 3-2 hervorgeht, sind neben Sulfit auch Taurin, Thiosulfat und S-Sulfocystein in erhöhten

<sup>2</sup> Isolierte Sulfitoxidase-Defizienz wird autosomal rezessiv vererbt. Ein Molybdäncofaktor-Mangel führt zu ähnlichen Symptomen. Es sind dann allerdings alle molybdänhaltigen Enzyme (Sulfitoxidase, Xanthinoxidase E.C. 1.2.1.37 und Aldehydoxidase E.C. 1.2.3.1) betroffen.

Konzentrationen direkt in Blut und Urin detektierbar. Johnson und Rajagopalan (1995) beschreiben z.B. einen HPLC-Assay zur Detektion von S-Sulfocystein im Urin.

Der Vergleich der Aktivitäten verschiedener bakterieller Sulfitoxidasen bei Sorokin (1995) zeigt, dass das Enzym in *Sulfitobacter pontiacus* eine vergleichsweise hohe Aktivität aufweist. Tabelle 3-1 zeigt die Sulfitoxidase-Aktivität von *Sulfitobacter pontiacus* im Vergleich zu den bis 1995 beschriebenen Enzymen aus anderen thiotrophen Bakterien.

**Tabelle 3-1:** Sulfitoxidation bei verschiedenen thiotrophen Bakterien (nach Sorokin, 1995). Die Aktivitäten beziehen sich nicht auf die aufgereinigten Enzyme, sondern auf die höchsten bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung beschriebenen Aktivitäten.

Organismus	Elektronenakzeptor		Aktivität [nmol/mg <sub>Prot.</sub> •min]
	künstlich	natürlich	
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], cyt <i>c</i> <sub>550</sub>	Cyt b	220
<i>Thiobacillus novellus</i>	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], cyt <i>c</i> <sub>550</sub>	Cyt b	1100
<i>Thiobacillus versutus</i>	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], cyt <i>c</i> <sub>550</sub>	Cyt c	300
<i>Thiobacillus thioparus</i>	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], cyt <i>c</i> <sub>550</sub>	Cyt c	690
<b><i>Sulfitobacter pontiacus</i></b>	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Cyt c	<b>4290</b>

Auch der Vergleich der Daten für die ungereinigte Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* mit den Enzymen aus eukaryontischen Quellen ist sehr interessant (Tab. 3-2).

**Tabelle 3-2:** Vergleich der Aktivitäten verschiedener eukaryontischer Sulfitoxidasen mit der unaufgereinigten Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus*.

Quelle	Elektronenakzeptor	Aktivität	Literatur
		[μmol/mg <sub>Prot.</sub> •min]	
Rinderleber	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	40,4	Cabré et al. (1991)
Hühnerleber	Cytochrom <i>c</i>	28	Ratnam et al. (1996)
Hühnerleber	Cytochrom <i>c</i>	30	ICN (1998)
<b><i>S. pontiacus</i></b>	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	<b>4,3</b>	Sorokin (1995)

Besonders vor dem Hintergrund, dass es sich bei den eukaryontischen Enzymen um aufgereinigte Proteine handelt und die spezifische Aktivität für das *Sulfitobacter pontiacus* Enzym sich auf den nicht gereinigten Rohextrakt bezieht, erscheint eine Untersuchung dieser Sulfitoxidase sinnvoll. Es ist zu erwarten, dass die aufgereinigte Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* deutlich höhere Aktivitäten aufweisen wird als die beschriebenen eukaryontischen Enzyme. Für einen Einsatz als Biosensorkomponente, wie er nachfolgend beschrieben wird, könnte das Enzym aus *S. pontiacus* deshalb besser geeignet sein als die derzeit verwendeten Enzyme.

### 3.1 Sulfite in Lebensmitteln

*My boyfriend and I were at a hamburger joint, and I had a burger and fries. About ten minutes after we finished eating, my throat began to itch. I grabbed my [asthma] inhaler but I could feel my throat constricting. I couldn't breathe and started to panic. When I passed out, my boyfriend flagged down a police car. The officer radioed for an ambulance, and I was rushed to the hospital. I was revived with a massive dose of epinephrine to counteract the reaction caused by the sulfite solution the potatoes had been soaked in before frying.*

*I know enough to stay away from wine, shrimp and other foods that contain sulfites, and take note whenever I don't feel right after eating something. But I never expected French fries to be sulfited. I've had allergic reactions to sulfites before, but this time I came close to dying.*

*I was angry that this happened to me. I felt powerless – I was careful and knowledgeable, and yet I couldn't protect myself. Who ever heard about a lethal French fry? Afterward, I refused to eat out in restaurants for almost two years, and still I can't visit people or go on vacation without knowing there's a hospital nearby.*

Aus Papazian (1996)

Schwefeldioxid und Sulfite werden schon sehr lange zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt. In Zeiten, in denen Winzerei noch hauptsächlich in Holzfässern und nicht in Edelstahlgärtanks im Hektoliter-Maßstab betrieben wurde, gehörte z.B. das Ausschwefeln<sup>3</sup> der Holzfässer zum normalen Ablauf der Weinerzeugung. Darüber hinaus werden Sulfite auch in anderen Bereichen schon seit längerem eingesetzt:

- Sulfite werden Früchten und Gemüsen (z.B. getrockneten Äpfeln und Kartoffeln) zugesetzt, um durch Oxidationsprozesse verursachte Verfärbungen zu verhindern.
- Sulfite werden eingesetzt, um bei Schalentieren die sogenannte Melanose, also das Entstehen schwarzer Punkte auf der Schale, zu verhindern.
- Sulfite werden eingesetzt, um Speisestärke zu bleichen und

---

<sup>3</sup> Hierzu wurde ein Stück Schwefel auf einem langen Löffel entzündet und in dem Fass herumgeschwenkt. Schwefeldioxid als Verbrennungsprodukt des Schwefels bewirkte dabei das Abtöten eventuell vorhandener Keime.

- Sulfite werden eingesetzt, um pharmazeutische Zubereitungen wie Salben und Pasten zu stabilisieren.

Die biologischen Effekte von Schwefeldioxid und Sulfiten sind dabei vielfältig: So reagiert Sulfid mit den Disulfidbrücken in Proteinen und überführt diese in die jeweiligen Thiol- und S-Sulfonsäuregruppen (Swan, 1957). Außerdem ist Sulfid ein starker Inhibitor verschiedener Enzymsysteme. So werden z.B. Dehydrogenasen (Pfleiderer et al., 1956) und Phenol-Oxidasen (Beutler, 1985) gehemmt. Letztere sind für die Verfärbungen von Wein, Obst und Gemüse in Gegenwart von Luftsauerstoff verantwortlich.

Wie der Erfahrungsbericht am Anfang dieses Kapitels jedoch zeigt, ist der Einsatz von Schwefeldioxid und Sulfiten als Konservierungsmittel ganz und gar nicht unbedenklich. Nach Schätzungen der amerikanischen „Food and Drug Administration“ (FDA) zeigen etwa ein Prozent der Bevölkerung allergische Reaktionen auf Sulfidspezies. Außerdem besteht wahrscheinlich bei etwa fünf Prozent aller Asthmatiker das Risiko, dass sich im Lauf des Lebens allergische Reaktionen auf Sulfidspezies entwickeln. Die Bandbreite an Reaktionen reicht dabei von relativ harmlosen Hustenanfällen bis zum anaphylaktischen Schock (Yang und Purchase, 1985; Stevenson und Simon, 1981; Simon, 1984). Da die Erfassung der durch Lebensmittelzusatzstoffe verursachten Komplikationen in den USA auf freiwilliger Basis erfolgt und derartige Vorfälle im Gegensatz zu Abwehrreaktionen gegen Arzneimittel von den behandelnden Ärzten nicht gemeldet werden müssen, sind die vorliegenden Daten nur unzureichend abgesichert, und es ist davon auszugehen, dass die Dunkelziffer noch höher liegt. Erschwerend kommt hinzu, dass die kleinste Dosis, die eine allergische Reaktion hervorrufen kann, noch nicht ermittelt werden konnte.

Anhand der Gesetzgebung in den USA ist deutlich ein Sinneswandel in Bezug auf „Sulfid in Lebensmitteln“ auszumachen: Noch 1958 wurden Sulfite im Federal Food, Drug and Cosmetic Act als “generally recognized as safe” (GRAS) eingestuft. In einer Neubewertung der Lage wurde der GRAS-Status dann 1985 aufgehoben, und die FDA leitete 1986 verschiedene regulatorische Maßnahmen ein:

- Der Einsatz von Sulfiten zur Erhaltung von Farbe und Konsistenz bei Gemüse und Früchten zum rohen Verzehr wurde verboten.
- Hersteller wurden angewiesen, Sulfid-Spezies, die in Konzentrationen von 10 parts per million (ppm) oder höher im Lebensmittel vorliegen, auf den Produkten zu deklarieren.

Erfolge dieser Politik wurden schon bald sichtbar. Während in dem Zehnjahreszeitraum von 1985 bis 1995 noch 1097 Fälle von allergischen Reaktionen gegen Sulfite gemeldet wurden, sank die Anzahl gemeldeter Fälle später deutlich ab. Im Jahr 1995 wurden nur noch sechs Fälle registriert.

Der Einsatz von Sulfiten in Lebensmittel- und Pharmaprodukten konnte jedoch nicht deutlich eingeschränkt werden. Nach wie vor werden Sulfite zur Konservierung einer Vielzahl von Lebensmitteln und Pharmazubereitungen eingesetzt. So werden z.B. getrocknete und glasierte Früchte noch immer mit Sulfit-Spezies behandelt, ebenso Schrimps und Garnelen. Weiterhin finden sich Sulfite in zahlreichen Getränken, so z.B. in Wein, Cidre, Frucht- und Gemüsesäften, sowie in Tee. Selbst Bier, also das Lebensmittel, welches in Deutschland dem ältesten noch gültigen Gesetz zur Lebensmittelüberwachung<sup>4</sup> unterliegt, kann Sulfite enthalten. Neben endogenen Sulfit-Spezies, die von den Hefen produziert werden (Donalies et al., 2000), wird in manchen Ländern dem Bier Sulfit beigemischt, um zu verhindern, dass das Bier nach dem Abfüllen schal wird (Nyborg et al., 1999).

In Deutschland ist, genau wie in den USA, eine Kennzeichnung von Sulfitspezies in Lebensmitteln zwingend vorgeschrieben. Die gesetzliche Grundlage in Deutschland bilden das „Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz“ (LMBG) bzw. die „Zusatzstoffzulassungsverordnung“ (ZZuV). In dieser werden genaue Vorgaben zur Kennzeichnung der Sulfite gemacht. Tabelle 3-3 gibt einen Überblick:

**Tabelle 3-3:** Sulfit-Spezies in Lebensmitteln. Bezeichnung nach E-Nummern.

E-Nummer	Sulfit-Spezies	E-Nummer	Sulfit-Spezies
220	SO <sub>2</sub>	224	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
221	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	226	CaSO <sub>3</sub>
222	NaHSO <sub>3</sub>	228	KHSO <sub>3</sub>
223	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		

Ähnlich wie in den USA gilt auch in Deutschland für Lebensmittel ein allgemeiner Grenzwert von 10 ppm, d.h. von 10 mg/kg bzw. 10 mg/L. Darüber hinaus existieren jedoch auch einige Ausnahmen. Tabelle 3-4 zeigt einige Beispiele für zulässige Höchstmengen von Sulfiten in verschiedenen Lebensmittelzubereitungen:

<sup>4</sup> Das Bayerische Reinheitsgebot von 1516 lebt auch heute noch im Biersteuergesetz fort. Biere, die nicht nach dem Reinheitsgebot gebraut wurden, dürfen seit 1987 nach einem Urteil des Europäischen Gerichtshofes in Deutschland zwar verkauft werden, müssen aber als solche gekennzeichnet sein.



**Tabelle 3-4:** Zulässige Höchstmengen für Schwefeldioxid und Sulfite in ausgewählten Lebensmitteln nach ZZuLV Anlage 5 Teil B, berechnet als SO<sub>2</sub>.

<b>Lebensmittel</b>	<b>Zulässige Konzentration</b>	<b>Lebensmittel</b>	<b>Zulässige Konzentration</b>
Bier	20 mg/L	Zitrussäfte	300 mg/L
Stärke	50 mg/kg	Meerrettich	1000 mg/kg
Konfitüren	50 mg/kg	Trockenobst	bis zu 2000 mg/kg
Speisegelatine	100 mg/kg		

Die Höchstmengenfestsetzung ist in §7 ZZuLV geregelt. Danach dürfen

*„bei dem Herstellen oder Behandeln von Lebensmitteln, [...], die dazu bestimmt sind, in den Verkehr gebracht zu werden, [...] Zusatzstoffe über die in den Anlagen [für Sulfite die Anlage 5b] jeweils festgesetzten Höchstmengen, [...], hinaus nicht verwendet werden.“*

Nach §9 ZZuLV muss der Zusatz von Sulfiten über einen Wert von 10 mg/kg, bzw. 10 mg/L (sofern durch §7 erlaubt) dem Verbraucher durch den Zusatz „geschwefelt“ kenntlich gemacht werden. Die eingangs beschriebenen gesundheitlichen Probleme im Zusammenhang mit Sulfid in Lebensmitteln und die zuletzt genannten gesetzlichen Regularien verdeutlichen, dass eine zuverlässige Sulfid-Analytik im Lebensmittelbereich sehr wichtig ist, um verlässliche Angaben über die tatsächliche Sulfidbelastung der Lebensmittel machen zu können. Der nachfolgende Abschnitt wird zeigen, dass Biosensorsysteme auf der Basis von Sulfidoxidase hierzu einen wichtigen Beitrag leisten können.

### 3.2 Sulfit-Analytik im Lebensmittelbereich

Die FDA schreibt zur Quantifizierung von Sulfit und Schwefeldioxid die Monier-Williams-Titration vor. Bei diesem Verfahren werden die Proben am Rückfluß mit Salzsäure gekocht. Das freigesetzte Schwefeldioxid wird mit Stickstoff in eine Vorlage überführt, zum Sulfat oxidiert und anschließend titriert (AOAC, 1984). Die Methode ist nicht nur sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv und deshalb für Routineuntersuchungen und In-Prozess-Kontrollen ungeeignet, sondern in bestimmten Matrices auch sehr fehleranfällig (Su und Taylor, 1995). Auch alternative Verfahren, wie die klassische Redoxtitration (Strähle und Schweda, 1990), Gas- und Flüssigchromatographie (Hamano et al., 1979; Imaizumi et al., 1981) sowie spektrophotometrische Methoden (Schwedt und Bäurle, 1985), sind oft ungeeignet, um Sulfit im Routinebetrieb zuverlässig zu quantifizieren.

In Deutschland sind nach §35 LMBG auch enzymatische Verfahren erlaubt (LMBG, 1986/1999). Die Grundlagen eines Küvettestests wurden von Beutler et al. beschrieben (1983, 1984, 1985). Sulfit (schweflige Säure) wird in Gegenwart von Sauerstoff durch Sulfitoxidase zum Sulfat oxidiert:



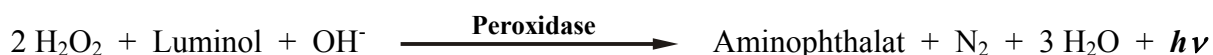
Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird in Gegenwart von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) durch das Enzym NADH-Peroxidase reduziert:



Die in der zweiten Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Sulfit-Menge in der Probe äquivalent. Die Detektion erfolgt photometrisch indirekt über NADH (334 nm, 340 nm oder 365 nm). Ein nach diesem Prinzip arbeitendes Testkit ist kommerziell erhältlich (Roche / r-biopharm).

In der Literatur werden weiterhin verschiedene Biosensorsysteme beschrieben, die das Enzym Sulfitoxidase in immobilisierter Form enthalten und die Abnahme der  $\text{O}_2$ -Konzentration oder die Zunahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration direkt detektieren. Beide Signale sind der Sulfitkonzentration direkt proportional. So beschreibt z.B. Smith (1987) die Sulfitbestimmung in getrockneten Aprikosen, Wein, Weinessig und Limonensaft mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode mit Sulfit-Oxidase-Immobilisat. Diese Methode zeigte gute Korrelationen mit herkömmlichen (photometrischen) Methoden, allerdings lag das untere Detektionslimit gerade im durch die gesetzlichen Bestimmungen vorgegebenen Konzentrationsbereich von 10 ppm. Die Methode zeigt also eine zu geringe Empfindlichkeit.

Sasaki et al. (1997) beschreiben eine Methode, bei der das während der Reaktion mit immobilisierter Sulfitoxidase freigesetzte  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Peroxidase<sup>5</sup>-Katalyse mit Luminol zur Reaktion gebracht wird. Die detektierbare Größe ist die gemäß nachfolgender Gleichung resultierende Chemilumineszenz:



Mit diesem Aufbau konnten Sulfit-Konzentrationen bis hinab zu  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/L detektiert werden. Sasaki et al. beschreiben allerdings keine Analysen in realen Proben.

Ng et al. (2000, 2001) beschreiben die Immobilisierung von Sulfitoxidase in einer Chitosan-Poly-(Hydroxyethyl-Methacrylat)-Matrix. In dieser Matrix dient zusätzliches p-Benzochinon als Mediator des Elektronentransfers. Durch amperometrische Detektion konnten Sulfitkonzentrationen bis zu 0,5 mmol/L detektiert werden. Allerdings wurden auch hier keine realen Proben untersucht.

Anwendung in der Analyse von zwölf verschiedenen Weinproben fand dagegen der Biosensor von Situmorang et al. (1999). Diese Gruppe immobilisierte Sulfitoxidase in einer Matrix aus elektrochemisch abgeschiedenem Polytyramin. Mit diesem System konnte ein Detektionslimit von 0,001 mmol/L erreicht werden.

Auch die Methode von Patz et al. (1997) hat sich in realen Proben (Fruchtsaft-, Bier- und Weinproben) bewährt. Patz et al. konnten mit Hilfe einer Kombination aus HPLC und Sulfitoxidase-Bioreaktor in genannten realen Proben Ergebnisse mit deutlich geringerem Detektionslimit erreichen, als für die gesetzlich vorgeschriebenen Referenzmethoden beschrieben. Der Beitrag von Patz et al. schließt mit einigen wichtigen Kommentaren:

*„Im Gegensatz zur Referenzmethode nach IFU 7a (IFU, 1987) kann mit der hier vorgestellten Methode eine sichere Aussage darüber gemacht werden, ob der untersuchte Saft mit  $\text{SO}_2$  in Kontakt gekommen ist oder nicht. [...] Für Allergiker kann die Aussage „ungeschwefelt“ nun ebenfalls in Konzentrationen weit unter 10 ppm sicher überprüft werden. [...] Da es [das Verfahren] außerdem die richtigeren Werte liefert [als die Referenzmethode], ist über eine Einführung als Referenzmethode nachzudenken.“*

Alle hier beschriebenen Systeme basieren auf Sulfitoxidase aus Hühnerleber. Ein Einsatz des *S. pontiacus* Enzyms könnte hier zu deutlichen Verbesserungen der Biosensorsysteme führen.

---

<sup>5</sup> Aus *Arthromyces ramosus*

## 4 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Von grundlegender Bedeutung für die Gewinnung des Enzyms Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* ist der Kultivierungsprozess. Da es sich bei der Sulfitoxidase um ein intrazelluläres Enzym handelt, sollte der Kultivierungsprozess möglichst große Mengen an Biomasse liefern. Außerdem muss natürlich die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität in dem aus der gewonnenen Biomasse hergestellten Rohextrakt möglichst groß sein. Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen verfolgt also das Ziel, möglichst große Mengen an Biomasse mit einer möglichst hohen spezifischen Aktivität an Sulfitoxidase zu produzieren. Um eine grundsätzliche Beurteilung des Optimierungserfolges zu ermöglichen, wurde ein sogenannter Gütefaktor definiert. Dieser erlaubt Vergleiche zwischen verschiedenen Kultivierungen und ergibt sich aus dem Produkt aus Biotrockenmasse und spezifischer Sulfitoxidase-Aktivität im Rohextrakt:

$$\text{Gütefaktor} = \text{Biotrockenmasse} \cdot \text{Spez. Sulfitoxidase-Aktivität}$$

Als Optimierungsziel wird demnach eine Maximierung des Gütefaktors angestrebt.

Um möglichst schnell greifbare Erfolge zu erzielen, wurde die Optimierung der Kultivierungsbedingungen ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Standardmedium zur Kultivierung mariner heterotropher Bakterien, dem Medium „Marine Broth 2216“ (Fa. Difco), betrieben. Dabei wurden verschiedene Parameter eingehend untersucht. So wurden die Einflüsse von Puffersubstanzen und Komplexbildnern ebenso beleuchtet wie der Einfluss anorganischer reduzierter Schwefelspezies. Weiterhin wurden der Einfluss der Mediumskonzentration und der Konzentration der Kohlenstoffquelle untersucht. Es wurden hierbei eine Mediumszusammensetzung und Kultivierungsbedingungen gefunden, die zu sehr hohen spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten, verbunden mit hohen optischen Dichten, führen. Diese Bedingungen wurden in den Fermenterbetrieb übertragen.

In weiteren Experimenten wurde ein sehr spezifisches *S. pontiacus* Problem untersucht, nämlich die Versorgung der Kulturen, insbesondere der Schüttelkulturen, mit Sulfit. Es wurde hierzu ein Ansatz zu einer kontinuierlichen Sulfit-Versorgung der Kulturen entwickelt und untersucht.

Die folgenden Abschnitte stellen die verschiedenen Optimierungsansätze vor und zeigen Ergebnisse aus den beiden genannten Themenkomplexen.

#### 4.1 Optimierung des Kultivierungsmediums ausgehend vom kommerziell erhältlichen Medium Marine Broth 2216

Das Medium Marine Broth 2216 geht im Wesentlichen auf die Arbeiten des amerikanischen Meeresbiologen Claude E. ZoBell (1941) zurück. ZoBell, einer der Pioniere auf dem Gebiet der marinen Mikrobiologie, beschäftigte sich mit den Anforderungen an Kultivierungsmedien für marine Bakterien. In einer Studie wertete er die Ergebnisse anderer Meeresbiologen aus und untersuchte selbst systematisch den Einfluss verschiedener Parameter auf die Kultivierbarkeit mariner Bakterien aus realen Proben. Einen wesentlichen Einfluss hat z.B. die Salinität des Kultivierungsmediums.

**Tabelle 4-1:** Medien mit verschiedenen Gehalten an Meerwasser. Anzahl an Koloniebildnern in einer realen Meerwasserprobe (nach ZoBell, 1941). Beim Wachstum beziehen sich die Prozentangaben auf das Wachstum in reinem Meerwasser (entspricht 100%).

Salinität							
<i>Meerwasser [%]</i>	100	75	50	25	10	5	0
<i>Dest. Wasser [%]</i>	0	25	50	75	90	95	100
<b>Wachstum [%]</b>	100	89	63	41	16	12	8

Im Gegensatz zu vorher veröffentlichten Untersuchungen, in denen über den Einfluss der Salinität eher indifferent geurteilt wurde, hat ZoBell eindeutig nachgewiesen, dass das Wachstum mariner Bakterien in Kultivierungsmedien, die mit unverdünntem Meerwasser hergestellt wurden, eindeutig am besten ist (Tabelle 4-1).

Der Einfluss von Nitrat und Phosphat ist von untergeordneter Bedeutung, sofern die Medien mit natürlichem Meerwasser hergestellt werden. Wichtiger sind hingegen der Gehalt an Eisensalzen und die Konzentrationen anderer Übergangsmetalle. Eisen-, Aluminium- und Mangansalze sind jeweils eindeutig wachstumsfördernd. Der Einfluss der Eisenkonzentration ist jedoch von übergeordneter Bedeutung.

Obwohl der pH-Wert in den oberen Meerwasserschichten meist zwischen pH 8,8 und 7,8 liegt (mit der Wassertiefe abnehmend), fand ZoBell das beste Wachstum im pH-Bereich von pH 7,5 bis 7,8.

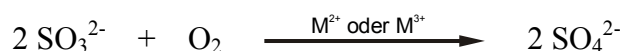
Basierend auf diesen Ergebnissen formulierte er ein Kultivierungsmedium (Medium 2216) mit 0,5% Bacto-Pepton und 1,5% Eisen (III)-phosphat in natürlichem Meerwasser (ZoBell, 1941). Das heute kommerziell erhältliche Medium Marine Broth 2216 (Fa. Difco) basiert auf diesem Medium. Abweichend von dem ZoBell-Medium enthält es zusätzlich 0,1% Hefeextrakt. Außerdem enthält das Medium kein natürliches Meerwasser, sondern eine Mineralsalzmischung, die die Zusammensetzung natürlichen Meerwassers nachahmt (siehe Anhang 7.1.1).

Neben dem Vollmedium Marine Broth 2216 existieren noch einige Salzmischungen, die aber mit Ausnahme des Sea Salt Mediums (Sigma) hauptsächlich für den Bereich der Meerwasser-aquaristik angeboten werden. Marine Broth 2216 hat sich inzwischen zu einem Standardmedium in der marinen Mikrobiologie entwickelt und wird z.B. auch von Stammsammlungen wie der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) zur Kultivierung mariner Bakterien eingesetzt (Pukall, 1999).

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Ansätze beschrieben, die zu einer Optimierung der Kultivierungsbedingungen in Hinblick auf Biomasseproduktion und Steigerung der spezifischen Enzymaktivität führen.

#### 4.1.1 Einfluss des Komplexbildners EDTA auf *Sulfitobacter pontiacus*-Kultivierungen

Es ist allgemein bekannt, dass die chemische Oxidation von Sulfit zu Sulfat durch Sauerstoff in wässriger Lösung von Übergangsmetall-Kationen katalysiert wird<sup>1</sup> (Cooper et al., 1944 und Van't Riet, 1979):



Die Induzierung von Sulfitoxidase-Aktivität in *Sulfitobacter pontiacus* ist jedoch zwingend an das Vorhandensein von Sulfit im Kultivierungsmedium gebunden (eigene Untersuchungen und Sorokin, 1995). Eine Reduzierung des Anteils an chemischer Sulfit-Oxidation im Medium sollte einen Anstieg an biologischer Sulfit-Oxidation, also eine vermehrte Induzierung von Sulfitoxidase-Aktivität, bewirken. *Sulfitobacter pontiacus* ist strikt aerob, so dass eine Reduzierung oder Eliminierung von Sauerstoff im Kultivierungsmedium nicht möglich ist. Ein anderer Ansatz zur Einschränkung oder Verhinderung der chemischen Sulfit-Oxidation ist jedoch die Zugabe von Komplexbildnern zum Kultivierungsmedium. Besonders Chelatkomplexbildner sollten die Konzentration an freien Übergangsmetall-Kationen –und damit auch den Anteil an chemischer Oxidation– deutlich reduzieren. Natürliche Chelatkomplexbildner wie z.B. Citronensäure sind meist Zwischenprodukte natürlicher Stoffwechselwege und werden deshalb oft metabolisiert. Synthetische Verbindungen wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) werden dagegen nur selten biologisch verändert und weisen meist wesentlich höhere Komplexstabilitätskonstanten auf. Andererseits ist der Einsatz von EDTA nicht unbedenklich, da auch die physiologisch wichtigen Erdalkalimetall-Ionen von EDTA komplexiert werden. Tabelle 4-2 gibt einen Überblick über die effektiven<sup>2</sup> Komplexstabilitätskonstanten einiger wichtiger EDTA-Metallkomplexe im Bereich pH 7,0-7,5.

---

<sup>1</sup> Ein Verfahren zur Bestimmung der Sauerstoff-Aufnahmerate in Biofermentern beruht auf der chemischen Oxidation von Sulfit zu Sulfat durch den eingeblasenen (Luft-) Sauerstoff. Die Reaktion wird dabei durch  $\text{Cu}^{2+}$ - oder  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen katalysiert.

<sup>2</sup> Eine Erläuterung zur Bedeutung der effektiven Komplexbildungskonstanten findet sich in Anhang 7.5.

**Tabelle 4-2:** Effektive Komplexstabilitätskonstanten einiger wichtiger Metall-EDTA-Komplexe im Bereich pH 7,0-7,5. Der niedrigere Wert entspricht pH 7,0, der höhere Wert entspricht pH 7,5. Je höher der pK'-Wert, desto stabiler ist der Chelatkomplex (siehe Anhang 7.5).

Ion	pK'-Wert	Ion	pK'-Wert
Mg <sup>2+</sup>	5,37 – 5,91	Co <sup>2+</sup>	12,99 – 13,53
Ca <sup>2+</sup>	7,38 – 7,92	Ni <sup>2+</sup>	15,30 – 15,84
Sr <sup>2+</sup>	5,31 – 5,85	Cu <sup>2+</sup>	15,48 – 16,02
Al <sup>3+</sup>	12,81 – 13,35	Zn <sup>2+</sup>	13,18 – 13,72
Mn <sup>2+</sup>	10,47 – 11,01	Cd <sup>2+</sup>	13,14 – 13,68
Fe <sup>2+</sup>	11,01 – 11,55	Fe <sup>3+</sup>	21,78 – 22,32

Vorversuche mit Modellmedien ohne Bakterien haben gezeigt, dass durch den Zusatz von EDTA die Lebensdauer des zugegebenen Natriumsulfits deutlich verlängert werden kann.

#### 4.1.1.1 Kultivierungen mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen

Basierend auf dem Kultivierungsmedium MB50 (siehe Anhang 7.1.1), wurden Kultivierungen mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen durchgeführt (Hanke, 1999). Aus einer sterilfiltrierten EDTA-Stammlösung (19,26 g/L) wurden dem Medium dabei 50-150 µL pro 150 mL zugefügt. Während der Kultivierung wurde die Sulfitkonzentration im Medium mit Hilfe von Sulfit-Teststäbchen (Merckoquant, Fa. Merck) überwacht. Bei Bedarf wurde den Kulturen diskontinuierlich Sulfit aus einer sterilfiltrierten 2M Natriumsulfit-Lösung zugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Sulfitkonzentration im Medium einen Wert von 20 mmol/L nicht überschritt. Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigendem EDTA-Gehalt die erreichte Ausbeute an Biomasse nur leicht fällt. Die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität steigt jedoch um 12% an (siehe Tabelle 4-3).

**Tabelle 4-3:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den Maximalwert in dieser Versuchsreihe.

EDTA-Konz. [µmol/L]	Generationszeit [h]	Biotrockenmasse [g/L]	Spez. Aktivität [U/mg]	Gütefaktor
0	8,1	0,496 (100%)	6,0 (88%)	2,98
17,1	8,9	0,490 (99%)	6,2 (91%)	3,04
51,3	7,3	0,484 (98%)	6,8 (100%)	3,29

Es fällt weiterhin auf, dass sich mit steigendem EDTA-Gehalt die Generationszeiten signifikant verkürzen, dass also das Wachstum von *Sulfitobacter pontiacus* durch EDTA nicht gehemmt wird.

Isaac und Jennings (1996) beschreiben, dass die Bioverfügbarkeit von Eisen für Mikroorganismen häufig nicht ausreichend ist. Einfache chelatisierende Substanzen wie

Citronensäure oder EDTA stabilisieren Eisen-Ionen in der Oxidationsstufe +III und erhöhen damit die Bioverfügbarkeit für Mikroorganismen. Dieser Effekt ist vermutlich auch für das bessere Wachstum von *Sulfitobacter pontiacus* in Gegenwart von EDTA verantwortlich.

#### 4.1.2 Einfluss unterschiedlicher Acetatanfangskonzentrationen

Bei der Isolierung und Charakterisierung von *Sulfitobacter pontiacus* wurde festgestellt, dass der Organismus in kontinuierlicher Kultur bei Acetat-Limitierung auch unter sehr hohen Sulfit-Konzentrationen von bis zu 63 mmol/L wächst. Weiterhin stellte sich heraus, dass die Ausbeute an Biomasse durch Zugabe von Sulfit zum Kultivierungsmedium gesteigert werden kann (Sorokin, 1995). Dies ist ein Zeichen für chemolithoheterotrophes Wachstum, also für die Fähigkeit des Organismus, aus der Oxidation von Sulfit zu Sulfat zusätzliche Energie zu gewinnen. Spätere Studien zum Einfluss von Sulfit auf den Acetat-Metabolismus von *Sulfitobacter pontiacus* in kontinuierlicher Kultur (Sorokin et al., 1999) haben diese Vermutung bestätigt. Es wurde eine sulfit-abhängige Zunahme der Biomasse beobachtet, die stöchiometrisch der Menge an freier Energie entspricht, die durch Oxidation von Sulfit zu Sulfat frei wird (siehe Tabelle 4-4).

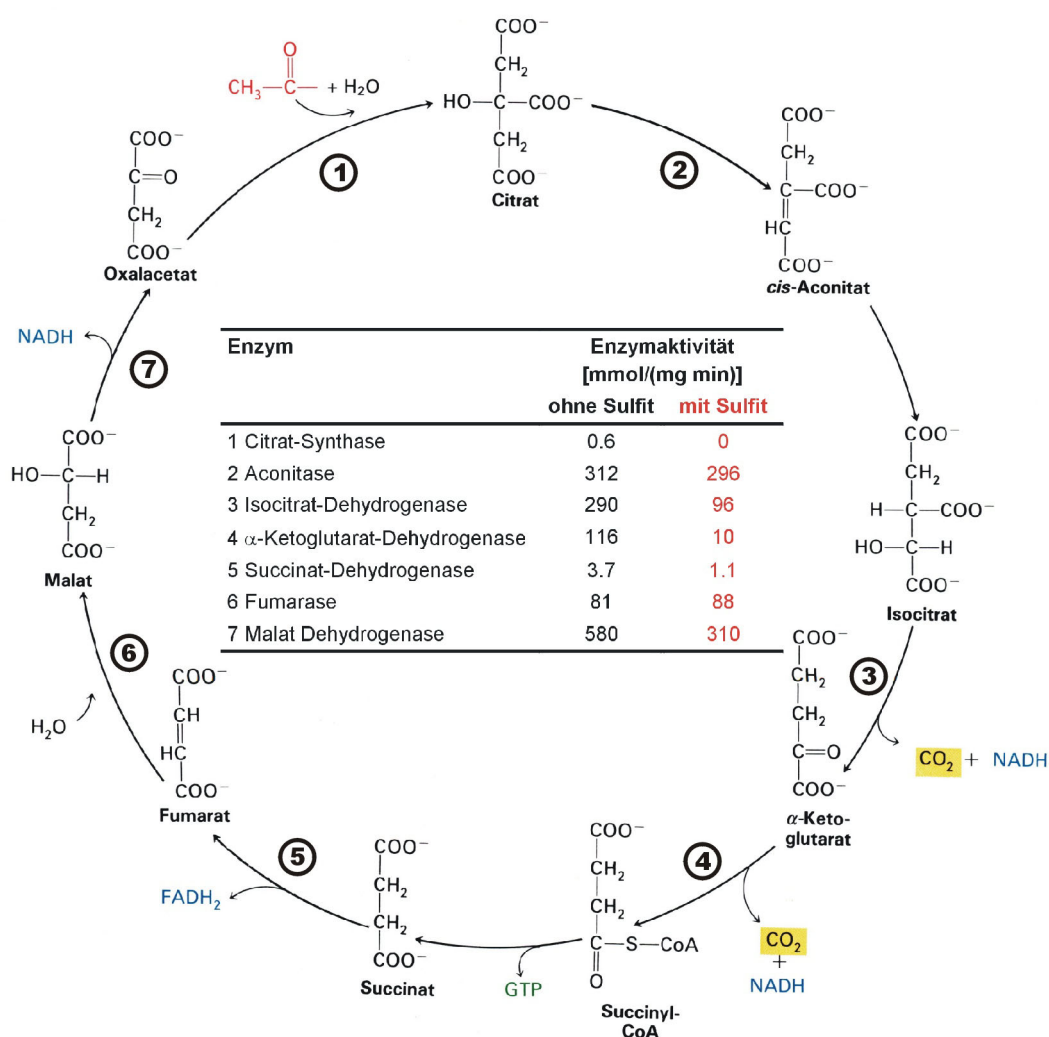
**Tabelle 4-4:** Wachstum und Sulfitoxidation von *Sulfitobacter pontiacus* in Acetat-limitierter kontinuierlicher Kultur (10mmol/L Acetat,  $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ , pH 7,2-7,4) nach Sorokin (1999).  $V_m$  ist die Anzahl an Volumina getauschten Mediums.

$V_m$	Sulfit-Konzentration im Zulauf [mmol/L]	OD <sub>430nm</sub>	Spez. Aktivität [U/mg]
5	0	0,59	0
20	16	0,63	0,92
40	36	0,65	2,32
60	63	0,74	3,95
65	80	0,80	4,12

Der Einfluss von Sulfit auf den Acetatmetabolismus manifestiert sich an verschiedenen Stellen. Der Transport von Acetat in die Zellen ist in Gegenwart von Sulfit im Medium reduziert. Laut Sorokin sinkt die Aktivität des Acetattransports auf 72% in Gegenwart von 16 mmol/L und sogar nur auf 50% in Gegenwart von 63 mmol/L Sulfit im Medium. Außerdem sind Zellen, die mit Sulfit kultiviert wurden, deutlich unanfälliger gegen eine Hemmung des Acetattransports durch Sulfit. Die Sulfitkonzentration, bei der der Acetattransport bis zur halbmaximalen Aktivität gehemmt wird, beträgt bei Zellen, die ohne Sulfit kultiviert wurden, 6,5 mmol/L und steigt auf 52 mmol/L bei Zellen, die in Gegenwart von 63 mmol/L Sulfit kultiviert wurden. Diese annähernde Verzehnfachung der Hemmkonzentration deutet auf die Anwesenheit von zwei verschiedenen Acetattransportsystemen in *Sulfitobacter pontiacus* hin.



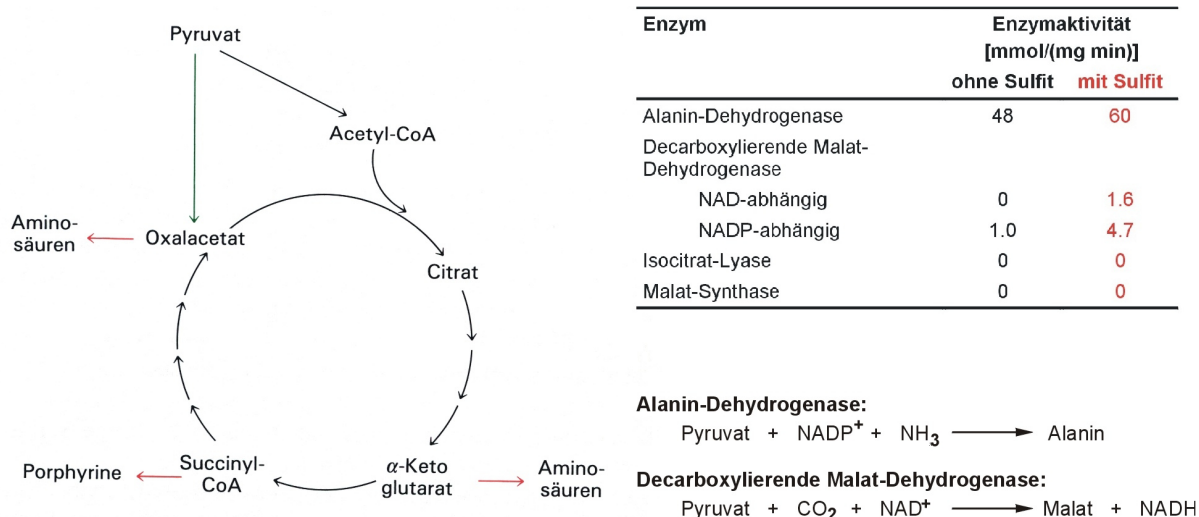
Der Organismus kann offensichtlich sowohl Acetat als auch Sulfid als Elektronendonoren nutzen. Mit steigender Sulfidkonzentration reduziert sich die acetat-abhängige Atmung, und Sulfid wird vermehrt als Elektronendonor genutzt. Außerdem sinkt mit steigender Sulfidkonzentration der dissimilatorische Anteil an der Acetatnutzung, und der assimilatorische Anteil steigt. Eine Tatsache, die sich sowohl in der Abnahme der acetat-abhängigen ATP-Synthese (verbunden mit einer Zunahme der sulfid-abhängigen ATP-Synthese) wie auch in der Veränderung der Enzymaktivitäten der am Acetatmetabolismus beteiligten Enzyme zeigt (siehe Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1:** Effekt von Sulfid (36-80 mmol/L) im Kultivierungsmedium auf die Enzymaktivitäten der am Acetatmetabolismus beteiligten Enzyme in *Sulfitobacter pontiacus* (nach Stryer 1999 und Sorokin 1999).

Die Anwesenheit von Sulfid im Kultivierungsmedium führt zu einem deutlichen Absinken der Dehydrogenase-Aktivitäten im Citratzyklus. So sinkt z.B. die Aktivität der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase um über 90%, und auch die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität sinkt deutlich ab. Diese Ergebnisse deuten auf eine geringere Bedeutung des Citratzyklus für die Oxidation

von Acetat und auf eine stärkere Beteiligung von Acetat an biosynthetischen Reaktionen über Pyruvat und andere Wege hin. Die vollständige Abwesenheit der Enzyme des Glyoxylatzyklus (Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase), sowie die gesteigerten Aktivitäten von Alanin-Dehydrogenase und decarboxylierender Malat-Dehydrogenase unterstreichen diese These (Abb. 4-2).



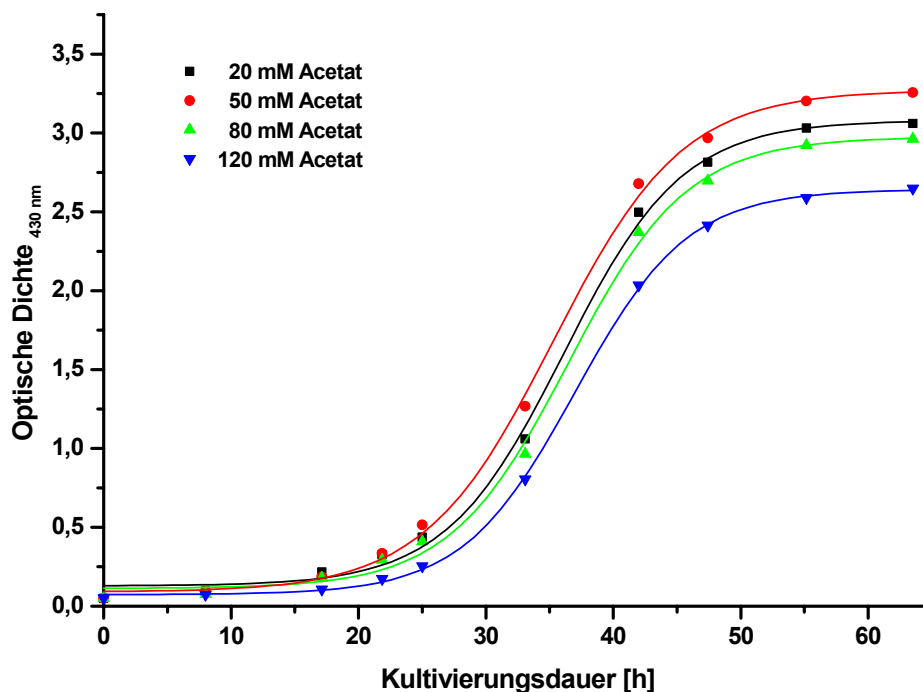
**Abbildung 4-2:** Linke Seite: Die biosynthetischen Aufgaben des Citratzyklus (nach Stryer, 1999). Rechte Seite: Einfluss von Sulfid (36-80 mmol/L) auf die Aktivitäten von Biosyntheseenzymen und von Enzymen aus dem Glyoxylatzyklus in *Sulfitobacter pontiacus* (nach Sorokin, 1999).

#### 4.1.2.1 Kultivierungen mit verschiedenen Acetatanfangskonzentrationen

Um den Einfluss unterschiedlicher Acetat-Konzentrationen in Batch-Kultivierungen zu untersuchen, wurden Schüttelkulturen mit vier verschiedenen Acetat-Anfangskonzentrationen im Bereich von 20-120 mmol/L durchgeführt. Als Basismedium diente MB50+EDTA (siehe Anhang 7.1.2). Bei dieser Versuchsreihe wurde die Sulfidversorgung der Kulturen durch eine diskontinuierliche Zugabe von Sulfid aus einer sterilfiltrierten 2M Natriumsulfid-Lösung erreicht. Auch hier wurde darauf geachtet, dass eine Konzentration von 20 mmol/L nicht überschritten wurde. Wie Abbildung 4-3 und Tabelle 4-5 zeigen, wirken sich die unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen sowohl auf das Wachstumsverhalten als auch auf die erreichten spezifischen Sulfidoxidase-Aktivitäten aus.

**Tabelle 4-5:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfidoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit verschiedenen Acetat-Anfangskonzentrationen. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den Maximalwert in dieser Versuchsreihe.

Acetat-Konzentration	Generationszeit [h]	Biotrockenmasse [g/L]	Spez. Aktivität [U/mg]	Gütefaktor
20 mM	6,85	0,482 (94%)	6,9 (100%)	3,33
50 mM	6,45	0,513 (100%)	4,7 (69%)	2,41
80 mM	6,69	0,466 (91%)	4,5 (65%)	2,10
120 mM	6,65	0,417 (81%)	5,2 (76%)	2,17



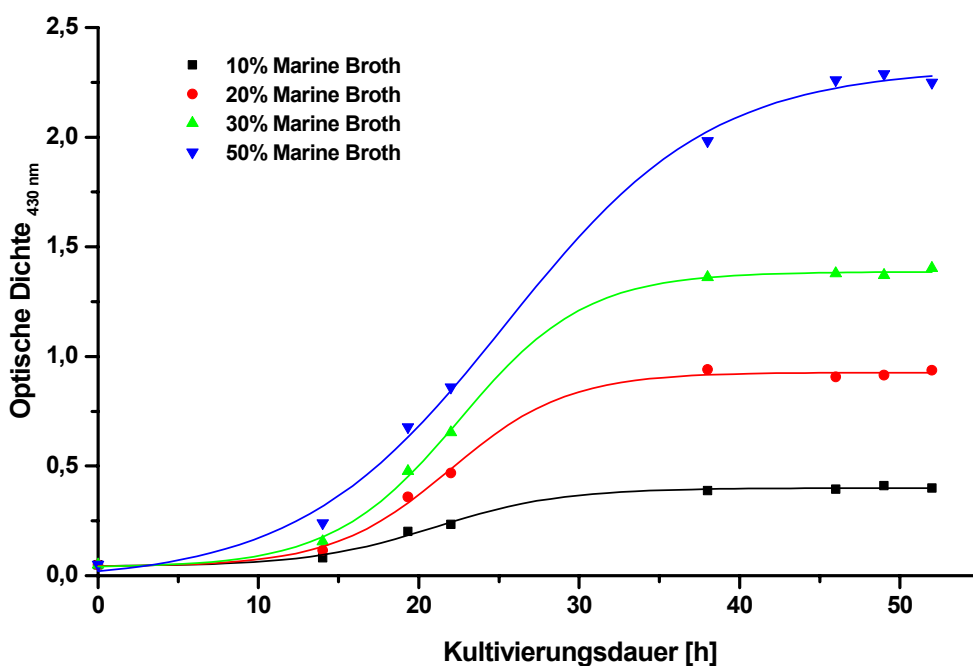
**Abbildung 4-3:** Wachstumsverhalten von *Sulfitobacter pontiacus* in MB50-Medium mit verschiedenen Anfangskonzentrationen an Acetat (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II).

Während die Generationszeit nur über einen sehr engen Bereich variiert, unterscheiden sich die erreichten Biotrockenmassen deutlicher. Der Maximalwert für die Biotrockenmasse wird bei einer Acetat-Konzentration von 50 mmol/L erreicht, sowohl bei höheren Konzentrationen von 80 mmol/L und 120 mmol/L wie auch bei 20 mmol/L werden nur geringere Biotrockenmassen erreicht (siehe Tabelle 4-5). Die spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten verringern sich jedoch mit steigenden Acetat-Konzentrationen deutlich. Die Ergebnisse, die von Sorokin in acetat-limitierter kontinuierlicher Kultur erzielt wurden, werden also auch in Schüttelkultur bestätigt. Je geringer die Acetat-Konzentration, desto höher ist die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität. Auch unter Berücksichtigung der etwas größeren Biomasse-Ausbeute bei einer Acetat-Konzentration von 50 mmol/L erweist sich die niedrigere Konzentration von 20 mmol/L als günstiger für die Produktion von Sulfitoxidase.

### 4.1.3 Einfluss unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen des Basismediums MB 2216 auf Kultivierungen von *S. pontiacus*

Neben den Konzentrationen des Komplexbildners EDTA und der zugegebenen Kohlenstoffquelle Acetat hat natürlich auch die Konzentration des Marine Broth 2216 Basismediums einen Einfluss auf Kultivierungen von *S. pontiacus*. Bei verschiedenen anderen marinen Bakterienstämmen wurde festgestellt, dass das Marine Broth Medium in einhundertprozentiger Konzentration oft nicht zu optimalen Ergebnissen führt und geringere Konzentrationen (bis hinab zu 10%igen Ansätzen) mit angeglichenem Salzgehalt oft besser geeignet sind (Pukall, 1999).

In einer Reihe von Experimenten wurde *Sulfitobacter pontiacus* deshalb in Medien mit gleichen Kochsalzgehalten (22 g/L) und unter sonst gleichen Bedingungen (26°C, 2 Schikanen, 120 rpm, 20 mmol/L Acetat, 51,3 µmol/L EDTA), aber mit unterschiedlichen Gehalten an Marine Broth 2216 kultiviert. Die Strategie zur Sulfitversorgung entsprach der weiter oben angeführten Methode. Abbildung 4-4 zeigt die erhaltenen Wachstumskurven. Es zeigt sich eindeutig, dass *S. pontiacus* besser wächst, je größer der Anteil des Basismediums am Kultivierungsmedium.



**Abbildung 4-4:** Wachstumsverhalten von *Sulfitobacter pontiacus* in Schüttelkulturen mit verschiedenen Gehalten an Marine Broth Grundmedium bei sonst gleichen Mediumzusammensetzungen (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II).

Auch wenn die spezifische Sulfitoxidaseaktivität im Medium mit 30% Marine Broth 2216 am höchsten ist, zeigt doch ein Vergleich der Gütefaktoren, dass das 50%ige MB 2216 Medium deutlich überlegen ist (Tabelle 4-6).

**Tabelle 4-6:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit verschiedenen Acetat-Anfangskonzentrationen. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den Maximalwert in dieser Versuchsreihe.

<b>MB2216-Konzentration</b>	<b>Generationszeit [h]</b>	<b>Biotrockenmasse [g/L]</b>		<b>Spez. Aktivität [U/mg]</b>		<b>Gütefaktor</b>
10%	4,5	0,086	(18%)	2,8	(37%)	0,24
20%	3,4	0,204	(43%)	4,4	(58%)	0,90
30%	3,2	0,307	(64%)	7,5	(100%)	2,30
50%	6,8	0,480	(100%)	6,7	(89%)	3,22

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden deshalb auf der Basis eines 50%igen Marine Broth 2216 Mediums durchgeführt.

#### 4.1.4 Einfluss von Thiosulfat

Bei Studien zum Metabolismus reduzierter Schwefelverbindungen fiel *Sulfitobacter pontiacus* durch relativ geringe Aktivitäten bezüglich der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat sowohl in kontinuierlicher als auch in Batch-Kultur auf. Die Tatsache, dass unter diesen Bedingungen keine Akkumulation von Sulfit beobachtet wurde, deutete auf eine hohe Aktivität bezüglich der Oxidation von Sulfit zu Sulfat und eine niedrige Aktivität bezüglich der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat hin. Über die Rolle und den Einfluss von Thiosulfat auf Kultivierungen von *Sulfitobacter pontiacus* finden sich jedoch widersprüchliche Angaben. Laut Sorokin (1995) sollen sowohl Thiosulfat als auch Sulfit das acetat-abhängige Wachstum in kontinuierlicher Kultur stimulieren. Andererseits wird an anderer Stelle auf die Unfähigkeit von *Sulfitobacter pontiacus* zur Thiosulfatoxidation verwiesen („*Sulfitobacter pontiacus* is virtually unable to oxidise thiosulfate“, Sorokin et al. 1999). Gleichzeitig aber wird dargestellt, dass die Anwesenheit von Thiosulfat im Kultivierungsmedium Sulfitoxidase-Aktivität induziert.

Eine Betrachtung der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen gibt Aufschluss über die Rolle von Thiosulfat im Stoffwechsel von Bakterien. Die meisten Untersuchungen zum Stoffwechsel reduzierter Schwefelspezies erfolgten mit Vertretern der Gattung Thiobacillus, einer Gruppe gram-negativer Bakterien, die zur Energiegewinnung durch Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen befähigt ist. Die meisten Thiobacilli können verschiedene Schwefelverbindungen oxidieren und bilden als Endprodukt Sulfat. Neben verschiedenen

obligat chemolithotrophen<sup>3</sup> (*T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*) werden auch einige chemo-organotrophe<sup>4</sup> Thiobacilli (*T. novellus*, *T. intermedius*, *T. versutus*) beschrieben.

Die einzelnen Reaktionsschritte von den reduzierten Schwefelverbindungen wie z.B. Sulfid und Thiosulfat zum Sulfat sind zum Teil noch nicht vollständig untersucht, so dass in einigen Fragen noch keine endgültige Klarheit besteht. So ist zum Beispiel nicht klar, wie die ersten Reaktionsschritte im Metabolismus von Thiosulfat ablaufen und auch die Frage, welche Intermediate während der Oxidation von Sulfid oder Thiosulfat zum Sulfat auftreten, ist nicht endgültig geklärt. Obwohl beim Wachstum verschiedener Thiobacilli auf Thiosulfat nicht immer freies Sulfit isoliert wurde, herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass Sulfit ein Schlüsselintermediat bei der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen ist. Im Folgenden werden exemplarisch die Stoffwechselwege von Thiosulfat in *Thiobacillus tepidarius*, *Thiobacillus novellus* und in *Thiobacillus versutus* vorgestellt.

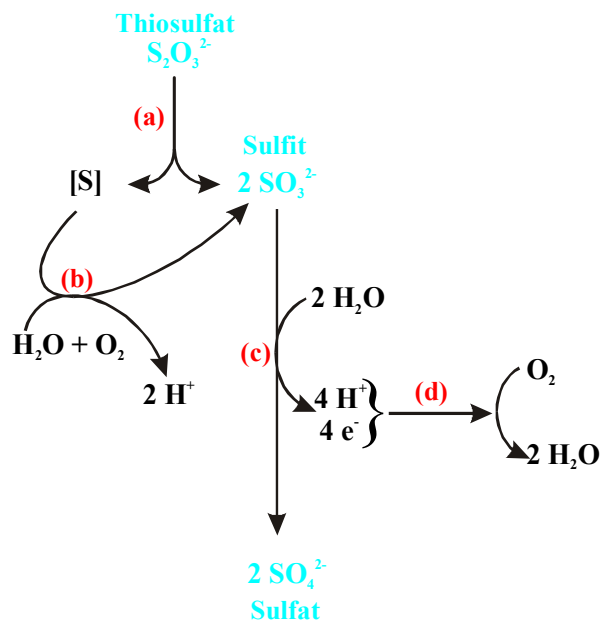
In *Thiobacillus tepidarius* wird Thiosulfat, wahrscheinlich im Periplasma, von einem Cytochrom *c*-abhängigen Enzym zum Tetrathionat oxidiert, welches dann über die Cytoplasmamembran transportiert wird. Im Cytoplasma erfolgt dann über einen unbekanntem Mechanismus die Umwandlung zum Sulfit, welches katalysiert durch eine Sulfitoxidase zum Sulfat oxidiert wird. Bei *Thiobacillus tepidarius* treten die Elektronen über Cytochrom *b* in die Atmungskette ein (Wood und Kelly, 1988; Kelly, 1989).

Für *Thiobacillus novellus* (siehe Abbildung 4-5) wird ein membrangebundenes Multienzymsystem beschrieben (Oh und Suzuki, 1977). Der erste Schritt der Oxidation von Thiosulfat erfolgt dabei über eine Rhodanese (a) und eine Schwefeloxxygenase (b). Das dabei entstehende Sulfit wird über eine Sulfit:Cytochrom *c* Oxidoreductase (c) zum Sulfat oxidiert. Die Elektronen treten dann über eine Cytochrom *c* Oxidase (d) in die Atmungskette ein.

---

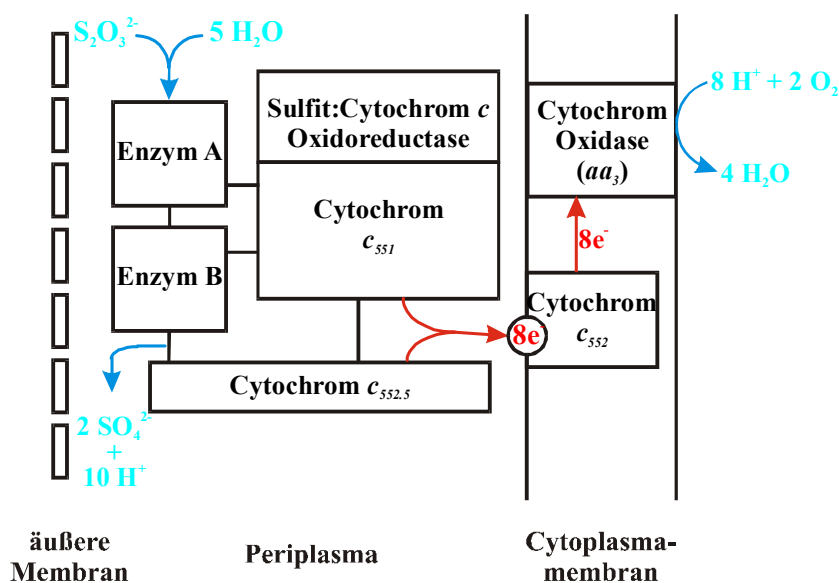
<sup>3</sup> chemolithotrophes Wachstum: Energiegewinnung durch Redoxreaktionen, anorganische Verbindungen als Wasserstoffdonatoren.

<sup>4</sup> chemoorganotrophes Wachstum: Energiegewinnung durch Redoxreaktionen, organische Verbindungen als Wasserstoffdonatoren.



**Abbildung 4-5:** Vorgeschlagener Mechanismus für die Oxidation von Thiosulfat in *Thiobacillus novellus* (nach Kelly, 1989). Namen und Funktionen der Enzyme finden sich im Text.

Das thiosulfat-oxidierende System von *Sulfitobacter pontiacus* ist vermutlich dem von *Thiobacillus versutus* sehr ähnlich. Das Enzymsystem von *Thiobacillus versutus* wurde in Teilen aufgeklärt (Lu, 1986 und Lu et al., 1985). Es katalysiert eine Abfolge von Oxidationen, in denen Sauerstoffatome aus Wasser an Thiosulfat angelagert und Protonen und Elektronen frei werden. Es wurden dabei keine Intermediate beobachtet. Daher wird vermutet, dass der Prozess in der in Abbildung 4-6 dargestellten Art und Weise abläuft.



**Abbildung 4-6:** Das thiosulfat-oxidierende Multienzymsystem von *Thiobacillus versutus* ist im Periplasma lokalisiert (nach Kelly, 1988).

Der Thiosulfatmetabolismus wird durch Anlagerung an Enzym A eingeleitet. Enzym B und das Sulfid:Cytochrom *c* Oxidoreductase-System katalysieren dann die Umwandlung zum Sulfat. Elektronen treten über Cytochrom *c* in die Atmungskette ein. Die Reduzierung von Sauerstoff wird von einer Cytochrom-Oxidase vom aa<sub>3</sub>-Typ eingeleitet. Das sulfid-oxidierende System von *Sulfitobacter pontiacus* wurde von Sorokin beschrieben (1995). Es beinhaltet auch ein lösliches Cytochrom *c*<sub>551</sub> als primären Elektronenakzeptor und Cytochrom *c*-Oxidase vom aa<sub>3</sub>-Typ als sekundären Elektronenakzeptor. Dies begründet die Vermutung, dass die Enzymsysteme von *T. versutus* und *S. pontiacus* sich sehr ähnlich sind.

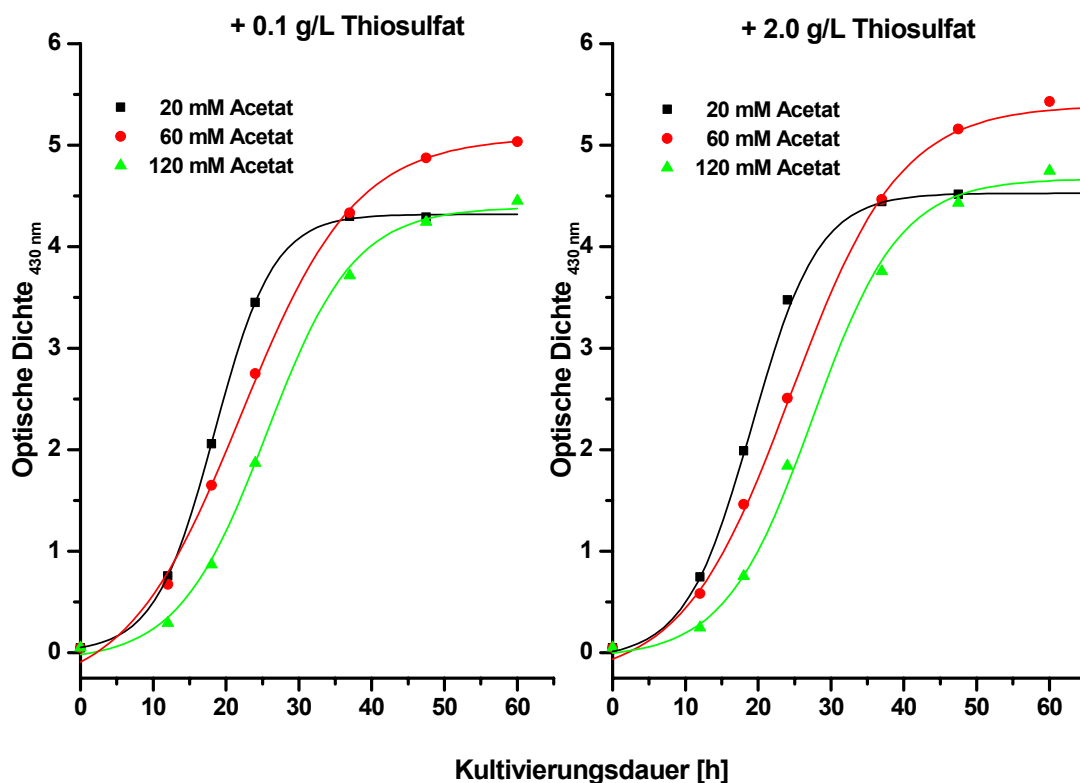
Um den Einfluss von Thiosulfat auf *Sulfitobacter pontiacus* Kultivierungen zu untersuchen, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden sowohl der Einfluss von Thiosulfat als einziger reduzierter Schwefelverbindung wie auch der Einfluss von Sulfid und Thiosulfat, also von zwei reduzierten Schwefelverbindungen, untersucht.

#### 4.1.4.1 Schüttelkulturen mit Thiosulfat ohne Zugabe von Sulfid

Basierend auf dem Kultivierungsmedium MB50+EDTA (siehe Anhang 7.1.2), wurden Schüttelkulturen mit drei verschiedenen Acetatkonzentrationen im Bereich von 20-120 mmol/L und zwei verschiedenen Thiosulfatkonzentrationen von 0,1 und 2,0 g/L durchgeführt. In dieser ersten Versuchsreihe zum Einfluss von Thiosulfat auf Wachstum und Sulfidoxidase-Produktion von *Sulfitobacter pontiacus* wurde auf die Zugabe von zusätzlichem Sulfid zu den Schüttelkolben verzichtet.

Bei beiden Thiosulfatkonzentrationen ist ein ähnliches Wachstumsverhalten zu beobachten (siehe Abb. 4-7): Die Kulturen mit 20 mM und 120 mM ergeben ähnliche Ausbeuten an Biomasse. Auffällig ist jedoch, dass bei beiden Thiosulfatkonzentrationen das Medium mit 60 mM Acetat zu den höchsten Ausbeuten an Biomasse führt. Die Generationszeiten zeigen bei beiden Thiosulfatkonzentrationen einen ähnlichen Verlauf: Die kürzesten Generationszeiten werden jeweils bei einer Acetatkonzentration von 20 mM beobachtet. Bei 60 bzw. 120 mM sind die Generationszeiten deutlich länger, wobei jeweils wiederum bei 120 mM deutlich kürzere Zeiten beobachtet werden als bei 60 mM.





**Abbildung 4-7:** Wachstumsverhalten von *Sulfitobacter pontiacus* in Schüttelkulturen mit unterschiedlichen Acetat- und Thiosulfatkonzentrationen. Die Kultivierungen wurden ohne Zugabe von Sulfid durchgeführt (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II).

Allen Versuchen ist gemeinsam, dass mit der höheren Thiosulfatkonzentration auch größere Biomassen erhalten werden. Es werden Steigerungen zwischen 3 und 6 Prozent beobachtet.

Im Gegensatz zu den Biomasseausbeuten sind die spezifischen Aktivitäten in den Kulturen mit Thiosulfat als einziger reduzierter Schwefelspezies deutlich geringer als in vergleichbaren Kultivierungen mit Sulfid als reduzierter Schwefelspezies (siehe Tab. 4-7 und 4-6). Ähnlich wie in der Versuchsreihe mit verschiedenen Acetatkonzentrationen sinken die spezifischen Sulfidoxidase-Aktivitäten mit steigender Acetatanfangskonzentration ab. Es zeigt sich außerdem ein Einfluss der Thiosulfatkonzentration auf die spezifischen Aktivitäten. Erwartungsgemäß sind die Aktivitäten bei höheren Konzentrationen größer. Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchsreihen mit Sulfid als einziger reduzierter Schwefelverbindung sind die spezifischen Sulfidoxidase-Aktivitäten jedoch sehr gering. Ein Vergleich der Gütefaktoren zeigt, dass die besseren Biomasseausbeuten von den geringen spezifischen Enzymaktivitäten mehr als kompensiert werden. Selbst im günstigsten Medium mit 20 mM Acetat und 2 g/L Thiosulfat liegt der Gütefaktor um eine Größenordnung unter dem

vergleichbarer Kultivierungen mit 20 mM Acetatanfangskonzentration und Sulfit als reduzierter Schwefelspezies (siehe Tab. 4-6 und Tab. 4-7).

**Tabelle 4-7:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit verschiedenen Konzentrationen von Acetat und Thiosulfat.

Medium	Generationszeit [h]	Biotrockenmasse [g/L]	Spez. Aktivität [U/mg]	Gütefaktor
<i>0.1 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:</i>				
20 mM Acetat	5,6	0,680 (81%)	0,4 (67%)	0,27
60 mM Acetat	9,0	0,793 (94%)	0,1 (17%)	0,08
120 mM Acetat	8,0	0,688 (82%)	---	---
<i>2 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:</i>				
20 mM Acetat	7,0	0,712 (84%)	0,6 (100%)	0,43
60 mM Acetat	9,5	0,844 (100%)	0,2 (33%)	0,17
120 mM Acetat	8,5	0,733 (87%)	0,1 (17%)	0,07

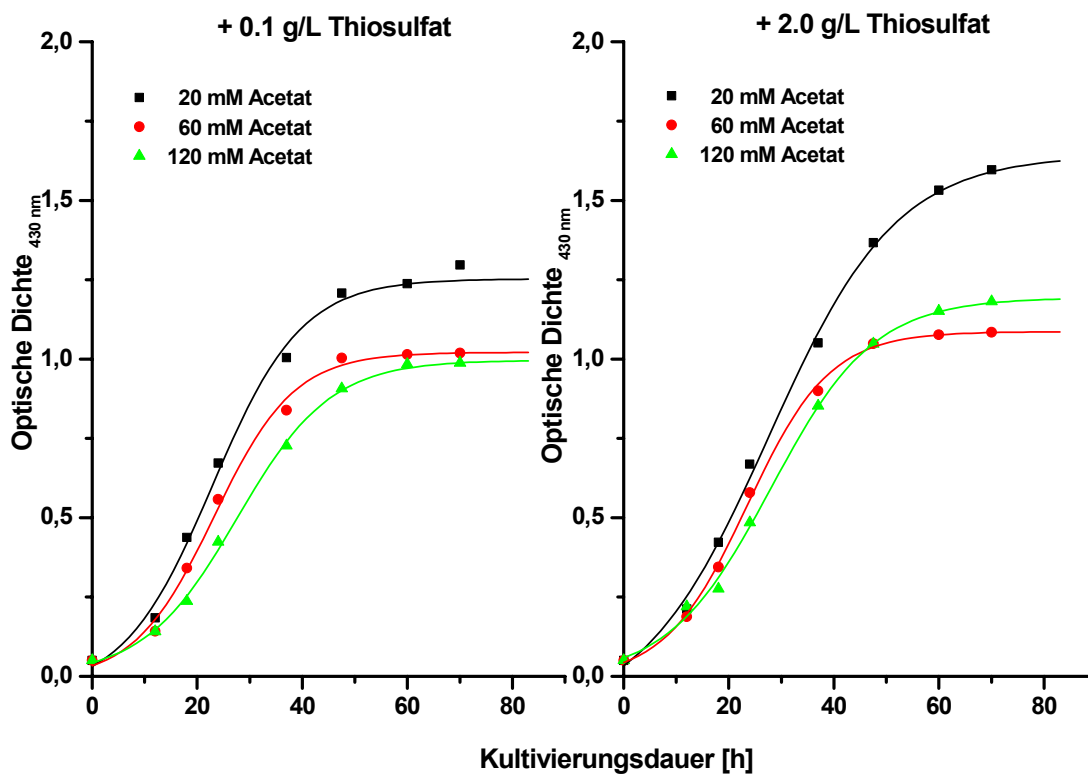
#### 4.1.4.2 Schüttelkulturen mit Thiosulfat und Zugabe von Sulfit

Um den Einfluss von Thiosulfat auf das Wachstum von *Sulfitobacter pontiacus* bei gleichzeitiger Zugabe von Sulfit zu untersuchen, wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt. Dazu wurden basierend auf dem Kultivierungsmedium MB50+EDTA (siehe Anhang 7.1.2) Schüttelkulturen mit drei verschiedenen Acetatkonzentrationen im Bereich von 20-120 mmol/L und zwei verschiedenen Thiosulfatkonzentrationen von 0,1 und 2,0 g/L durchgeführt. Die Kulturen wurden zusätzlich mit Sulfit aus einer 2M Natriumsulfit-Lösung versetzt.

Die Kulturen mit den unterschiedlichen Thiosulfatkonzentrationen zeigen jeweils ein ähnliches Wachstumsverhalten. In beiden Versuchsreihen sind die Biomasseausbeuten bei den Kulturen mit einer Acetatanfangskonzentration von 20 mM am größten. Die Biomasseausbeuten bei 60 mM und 120 mM Acetatanfangskonzentration unterscheiden sich hingegen nicht signifikant.

Ähnlich wie bei der Versuchsreihe ohne Sulfitzufütterung werden auch in dieser Versuchsreihe mit der höheren Thiosulfatkonzentration größere Biomassen erhalten. Dieser Effekt ist jedoch bei den beiden Kulturen mit 20 mM Acetatanfangskonzentration wesentlich deutlicher als bei 60 mM und 120 mM. Bei 20 mM Acetat ist eine Steigerung um 23% zu beobachten, wohingegen bei 60 mM und 120 mM nur Steigerungen um 4 bzw. 12% beobachtet werden.

Insgesamt sind die Biomasseausbeuten deutlich geringer als in der Versuchsreihe ohne zusätzliche Sulfitzufütterung und auch deutlich geringer als in vergleichbaren Kultivierungen ohne zusätzliches Thiosulfat im Kultivierungsmedium.



**Abbildung 4-8:** Wachstumsverhalten von *Sulfitobacter pontiacus* in Schüttelkulturen mit unterschiedlichen Acetat- und Thiosulfatkonzentrationen (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II). Die Schüttelkulturen wurden mit Sulfit versetzt.

Die spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten sinken ähnlich wie in den vorab beschriebenen Versuchsreihen mit steigender Acetatanfangskonzentration deutlich ab. In der Versuchsreihe mit 0,1 g/L Thiosulfat sinken die spezifischen Aktivitäten bei 60 mM Acetat auf 32% und bei 120 mM Acetatanfangskonzentration sogar nur auf 23% der Aktivität bei 20 mM Acetat. Bei 2,0 g/L sind die Reduzierungen der spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten weniger deutlich: Bei 60 mM Acetatanfangskonzentration beträgt die Aktivität noch 90% des Wertes bei 20 mM und bei 120 mM noch 33%.

Für die Beurteilung der Kultivierungsbedingungen ist jedoch der Gütefaktor aussagekräftiger. Ein Vergleich der Gütefaktoren zwischen den Versuchsreihen mit Thiosulfat ohne zusätzliche Sulfitzufütterung und mit Thiosulfat mit zusätzlichem Sulfit zeigt sehr deutlich, dass trotz der niedrigeren Biomasseausbeuten im Fall der zusätzlichen Sulfitzufütterung die Gesamtleistung der Kultivierung unter diesen Bedingungen wesentlich besser ist. Vergleicht man jedoch den Gütefaktor der besten Kultivierung aus diesen Versuchsreihen (0,1 g/L Thiosulfat, 20 mM

Acetat mit Sulfitzufütterung) mit den Kultivierungen ohne Thiosulfat, so zeigt sich, dass die Zugabe von Thiosulfat zum Kultivierungsmedium sich sehr negativ auswirkt.

**Tabelle 4-8:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit verschiedenen Konzentrationen von Acetat und Thiosulfat.

Medium	Generationszeit [h]	Biotrockenmasse [g/L]	Spez. Aktivität [U/mg]	Gütefaktor
<i>0,1 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:</i>				
20 mM Acetat	12,4	0,196 (77%)	6,0 (100%)	1,18
60 mM Acetat	12,3	0,160 (63%)	1,9 (32%)	0,30
120 mM Acetat	18,2	0,155 (61%)	1,4 (23%)	0,22
<i>2 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:</i>				
20 mM Acetat	14,6	0,254 (100%)	4,2 (70%)	1,49
60 mM Acetat	11,9	0,171 (67%)	3,8 (63%)	0,65
120 mM Acetat	13,5	0,186 (73%)	1,4 (33%)	0,26

Die hier dargestellten Ergebnisse erhärten die Vermutung, dass das Enzymsystem zur Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen von *Sulfitobacter pontiacus* dem von *Thiobacillus versutus* sehr ähnlich ist. Wenn *Sulfitobacter pontiacus* in Gegenwart von Thiosulfat als einziger reduzierter Schwefelverbindung kultiviert wird, erhält man nur sehr geringe spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten bei einer gleichzeitigen Steigerung der Biomasseausbeuten bei steigender Thiosulfatkonzentration. Postuliert man, dass die Enzyme A und B im Multienzymsystem für die Gesamtreaktion zum Sulfat geschwindigkeitsbestimmend sind, so erklären sich die geringen erhaltenen Sulfitoxidase-Aktivitäten aus der hohen Aktivität der Sulfitoxidase im Vergleich zu den Enzymen A und B.

Wird *Sulfitobacter pontiacus* in Gegenwart von Thiosulfat und Sulfit kultiviert, so werden zwar im Vergleich zu Kultivierungen mit Thiosulfat ohne Sulfit höhere spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten erhalten. Im Vergleich zu Kultivierungen mit Sulfitzufütterung und ohne Thiosulfat sind die Aktivitäten jedoch immer noch sehr gering. Gleichzeitig wird ein deutlich schlechteres Wachstum beobachtet. Das Multienzymsystem wird gewissermaßen aus zwei Richtungen angegriffen: Einerseits wird Thiosulfat zum Sulfat oxidiert, eine Reaktion, die über Sulfit als Zwischenstufe abläuft. Andererseits muss das zusätzlich zugeführte Sulfit metabolisiert werden. Vermutlich ist die Sulfitoxidase für das innerhalb des Multienzymsystems entstehende Sulfit leichter zugänglich als für extern zugeführtes Sulfit, so dass die Entgiftung des zusätzlichen Sulfits langsamer abläuft als in Kultivierungen ohne Thiosulfat. Das beobachtete verminderte Wachstum wäre die Folge.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine zusätzliche Zufütterung von Thiosulfat für die Produktion der Sulfitoxidase kontraproduktiv ist. Kultivierungen von *Sulfitobacter*

*pontiacus* mit Sulfit als einziger reduzierter Schwefelverbindung führen zu wesentlich höheren spezifischen Enzymaktivitäten und Gütefaktoren.

#### 4.1.5 Pufferung des Kultivierungsmediums von *S. pontiacus* mit HEPES

Die Zugabe von Natriumsulfit zu Schüttelkulturen verursacht Änderungen des pH-Wertes in den basischen Bereich hinein. Abhängig von der Dauer der Kultivierung und der Menge an Natriumsulfit, die nötig ist um eine ausreichende Sulfitkonzentration im Kultivierungsmedium aufrecht zu erhalten, können diese Änderungen des pH-Wertes den Kultivierungsverlauf negativ beeinflussen. Eine Pufferung des Kultivierungsmediums sollte sich deshalb gerade für Schüttelkulturen als nützlich erweisen.

Eine zur Pufferung eines Nährmediums geeignete Pufferkomponente sollte über verschiedene Eigenschaften verfügen:

- sie sollte im physiologisch interessanten pH-Bereich eine ausreichende Pufferkapazität aufweisen,
- sie sollte weder das Wachstum hemmen noch metabolisierbar sein,
- Medien, die mit dieser Pufferkomponente hergestellt werden, sollten hitzesterilisierbar sein, ohne dass Präzipitate ausfallen.

Klassische Pufferkomponenten wie Phosphat-, Citrat-, Acetat- und Glycyl-Puffer kommen also für die Pufferung eines Nährmediums nicht in Frage.

Vorteilhaftere Eigenschaften weisen dagegen die in den sechziger Jahren von Good et al. (Good et al., 1966, Good und Izawa, 1968) beschriebenen Puffer auf. Good erkannte den Mangel an geeigneten Pufferkomponenten für biologische Untersuchungen. Er entwickelte eine Anzahl an zwitterionischen Pufferkomponenten mit  $pK_a$ -Werten im physiologisch relevanten Bereich zwischen pH 6 und 8, die auch wegen ihrer sonstigen Eigenschaften wie

- guter Wasserlöslichkeit,
- hoher Stabilität gegen chemischen und enzymatischen Abbau,
- gutem Absorptionsverhalten im sichtbaren und im UV-Bereich des Spektrums und
- geringer Neigung zur Bildung von Komplexen mit Übergangsmetallionen

zum Einsatz in biologischen Systemen geeignet sind. Bei diesen Substanzen handelt es sich meist um aliphatische Amine. Die Einführung einer zusätzlichen anionischen Gruppe, meist handelt es sich um eine Sulfonsäure-Gruppe, bringt zusätzlich zu der Puffereigenschaft die zwitterionischen Eigenschaften der Verbindungen, wie z.B. die extreme Polarität und damit die gute Wasserlöslichkeit sowie die Kristallisierbarkeit. Tabelle 4-9 zeigt die  $pK_a$ -Werte einiger der erwähnten Pufferkomponenten nach Good.

**Tabelle 4-9:** Good-Puffer mit den jeweiligen pK<sub>a</sub>-Werten.

<b>Puffer</b>	<b>Systematischer Name</b>	<b>pK<sub>a</sub>-Wert</b>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure	6,15
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)	6,80
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure	7,20
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-amino-ethansulfonsäure	7,50
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	7,55
HEPPS	3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-propansulfonsäure	8,00
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-3-amino-propansulfonsäure	8,40

Besonders HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure) wird mittlerweile wegen seines günstigen pK<sub>a</sub>-Wertes häufig zur Pufferung von Kultivierungsmedien eingesetzt. Auch kommerzielle Kultivierungsmedien für verschiedene Anwendungen, wie z.B. das Medium C5467 von Sigma-Aldrich (ein serumfreies Medium zur Kultivierung von CHO-Zellen<sup>5</sup>), enthalten oft HEPES als Pufferkomponente (Sigma Aldrich, 2002).

Vorversuche mit HEPES haben gezeigt, dass die Pufferkapazität im pH-Bereich von pH 7,0-7,5 ausreichend ist, um die durch die Sulfitzufütterung ausgelösten pH-Wertänderungen abzufangen. Außerdem wird HEPES weder metabolisiert, noch bilden sich bei der Hitzesterilisation im Autoklaven schwer lösliche Niederschläge mit anderen Mediumsbestandteilen.

Um den Einfluss von HEPES auf *Sulfitobacter pontiacus* Kultivierungen zu untersuchen, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Eine erste Versuchsreihe sollte über den Einfluss verschiedener HEPES-Konzentrationen in Abwesenheit von Sulfit Aufschluss geben. In einer zweiten Versuchsreihe wurde dann der Einfluss von HEPES auf Kultivierungen mit gleichzeitiger Sulfitzufütterung untersucht.

#### **4.1.5.1 Schüttelkulturen mit HEPES-gepufferten Medien**

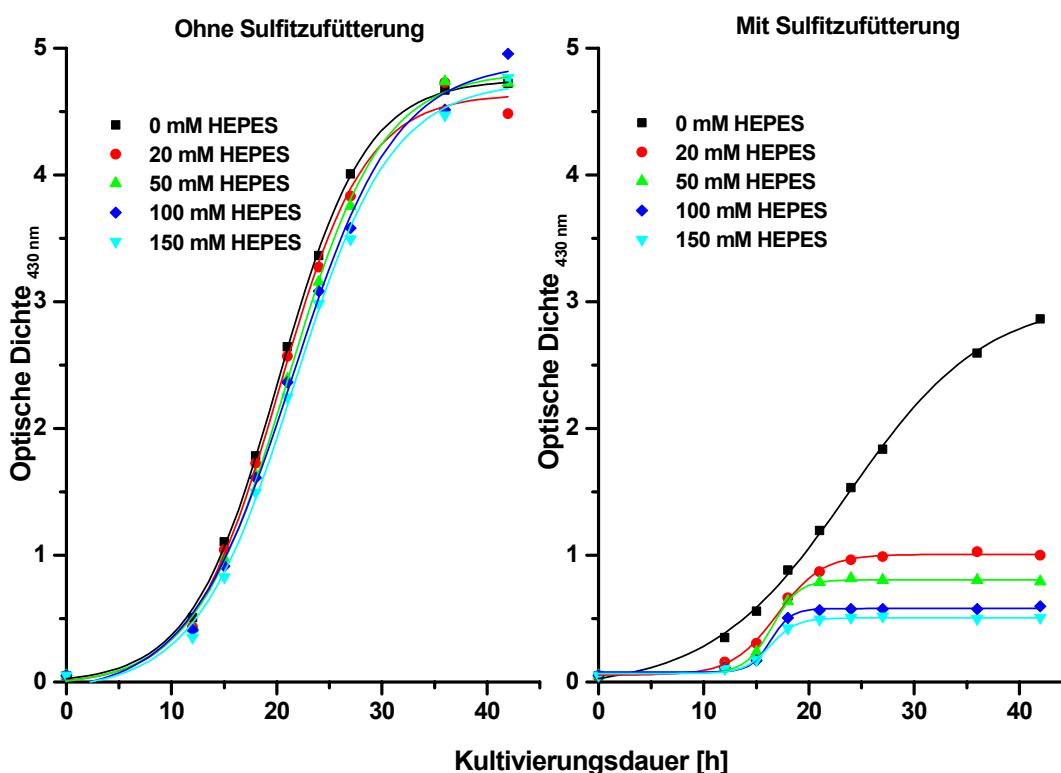
Basierend auf dem Kultivierungsmedium MB50+EDTA (siehe Anhang 7.1.2) wurden Schüttelkulturen mit vier verschiedenen HEPES-Konzentrationen im Bereich von 20-150 mmol/L und als Referenz eine Kultivierung ohne HEPES durchgeführt. In einer ersten

<sup>5</sup> CHO-Zellen: Chinese **H**amster **O**vary

Versuchsreihe wurde ohne Zugabe von Sulfid der Einfluss von HEPES auf das Wachstum von *Sulfitobacter pontiacus* untersucht.

Wie die Daten aus Abbildung 4-9 und Tabelle 4-10 zeigen, ist mit steigenden HEPES-Konzentrationen keine Veränderung im Wachstumsverhalten zu beobachten. Auch im Vergleich zum Referenzexperiment ohne HEPES-Pufferung sind keine Veränderungen im Wachstumsverhalten zu beobachten.

Um den Einfluss der HEPES-Pufferung auf *Sulfitobacter pontiacus* Kultivierungen bei gleichzeitiger Sulfitzufütterung zu untersuchen, wurden in einer zweiten Versuchsreihe Kultivierungen mit gleicher Mediumzusammensetzung durchgeführt. Diese Kulturen wurden jedoch mit Sulfit aus einer 2M Natriumsulfit-Lösung versetzt (zur Strategie siehe Abschnitt 4.1.1.1). Wie die Daten in Abbildung 4-9 und Tabelle 4-10 zeigen, werden Wachstum und erreichbare Biotrockenmassen unter diesen Bedingungen erheblich beeinflusst.



**Abbildung 4-9:** Wachstumsverhalten von *Sulfitobacter pontiacus* in Schüttelkulturen mit unterschiedlichen HEPES-Konzentrationen (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II). Die linke Seite zeigt Kultivierungen ohne HEPES-Zufütterung, die rechte Seite zeigt Kultivierungen mit Sulfitzufütterung.

Mit steigender HEPES-Konzentration sinken die erreichten Biotrockenmassen drastisch. Mit 20 mM HEPES im Medium werden nur noch 35% der Biomasse des Referenzexperiments erreicht, und mit weiter steigenden HEPES-Konzentrationen sinken die Biotrockenmassen

weiter ab. Mit 150 mM HEPES werden schließlich nur noch 18% der Biotrockenmasse des Referenzexperiments erreicht.

Die Generationszeiten und die spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten zeigen jedoch zumindest für 20 mM und 50 mM HEPES einen anderen Trend. Überraschenderweise werden die Generationszeiten deutlich kleiner. Und die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität hat sich im Falle der 50 mM HEPES Kultivierung im Vergleich zum Referenzexperiment mehr als verdoppelt. Mit weiter steigenden HEPES-Konzentrationen steigen die Generationszeiten wieder deutlich an, und auch die spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten sinken deutlich ab.

**Tabelle 4-10:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit verschiedenen HEPES-Konzentrationen.

Medium	Generationszeit [h]	Biotrockenmasse [g/L]	Spez. Aktivität [U/mg]	Gütefaktor
<i>Ohne Sulfitzufütterung:</i>				
0 mM HEPES	3,78	0,754 (100%)	--	--
20 mM HEPES	3,51	0,748 (99%)	--	--
50 mM HEPES	3,59	0,745 (99%)	--	--
100 mM HEPES	3,58	0,745 (99%)	--	--
150 mM HEPES	3,87	0,750 (99%)	--	--
<i>Mit Sulfitzufütterung:</i>				
0 mM HEPES	5,80	0,451 (100%)	6,5 (46%)	2,93
20 mM HEPES	3,80	0,163 (35%)	11,9 (85%)	1,94
50 mM HEPES	2,56	0,125 (28%)	14,0 (100%)	1,75
100 mM HEPES	2,96	0,094 (21%)	3,2 (23%)	0,30
150 mM HEPES	3,12	0,084 (18%)	2,6 (19%)	0,22

Um den Einfluss der HEPES-Pufferung auf Kultivierungen mit Sulfitzufütterung eingehender zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit einer HEPES-Konzentration von 100 mmol/L und Zugabe von Sulfit in verschiedenen Mengen durchgeführt (siehe Tabelle 4-11). Eine Reduzierung der Sulfitmenge führt zu einer deutlichen Steigerung der erreichten Biotrockenmasse. Die spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten zeigen einen ähnlichen Verlauf: Die spezifischen Enzymaktivitäten steigen erst mit sinkenden Mengen an zugefüttertem Sulfit an, um dann bei der geringsten Zufüttermenge deutlich abzusinken.



**Tabelle 4-11:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen mit 100mM HEPES und unterschiedlicher Sulfitzufütterung.

Sulfitzufütterung		Generationszeit	Biotrockenmasse		Spez. Aktivität		Gütefaktor
[mmol]		[h]	[g/L]		[U/mg]		
19,5	(100%)	4,60	0,095	(43%)	2,7	(29%)	0,26
10,5	(54%)	7,30	0,100	(46%)	5,5	(59%)	0,55
7,5	(38%)	5,63	0,122	(56%)	9,4	(100%)	1,15
4,5	(23%)	5,77	0,219	(100%)	5,0	(53%)	1,10

Der beobachtete Effekt ist vermutlich durch eine Hemmung der Sulfitoxidation durch HEPES zu erklären. Dadurch werden über längere Zeiträume für die Induktion der Sulfitoxidase-Aktivität ausreichende Sulfitkonzentrationen im Medium aufrecht erhalten. Eine weitere Reduzierung der Sulfitzufütterung hat dann aber offensichtlich zur Folge, dass die Sulfitkonzentrationen, über den gesamten Kultivierungsverlauf gesehen, zu niedrig sind, um ein für die Induktion ausreichendes Niveau zu erreichen.

Aufbauend auf den in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnissen, wurde für die folgenden Experimente eine HEPES-Konzentration von 50 mmol/L etabliert.

#### 4.1.6 Temperatur und Sauerstoffeintrag in Schüttelkultur

Die Temperatur und der Sauerstoffeintrag sind kritische Parameter bei der Kultivierung von Mikroorganismen. Im Fall von *Sulfitobacter pontiacus* ist die erforderliche Anwesenheit von Sulfit ein weiteres Problem. Sowohl die Geschwindigkeit der chemischen als auch die der biologischen Sulfitoxidation sind von der Temperatur abhängig. Bei der chemischen Sulfitoxidation, die ja unter Übergangsmetallionenkatalyse direkt zwischen Sulfit und Sauerstoff stattfindet, ist besonders der Sauerstoffeintrag sehr entscheidend. Sowohl die chemische als auch die biologische Sulfitoxidation haben natürlich direkten Einfluss auf das Ergebnis der gesamten Kultivierung: Je höher der chemische Anteil an der Sulfitoxidation, desto mehr Sulfit muss zugefüttert werden, um für die Induktion der Sulfitoxidase-Aktivität ausreichende Konzentrationen aufrecht zu erhalten. Gleiches gilt für den biologischen Anteil an der Sulfit-Oxidation. Je mehr Sulfit enzymatisch abgebaut wird, desto mehr muss zugefüttert werden, um dauerhaft ausreichende Konzentrationen zu erhalten. Es kann also durchaus vorteilhaft sein, unter Bedingungen zu arbeiten, unter denen die biologische Sulfitoxidation gehemmt ist, z.B. bei Temperaturen unterhalb des Temperaturoptimums des Enzyms. Auch das würde dauerhaft zu höheren Sulfitkonzentrationen im Kultivierungsmedium führen.

Eine eingehendere Untersuchung der Parameter Sauerstoffeintrag und Temperatur war also erforderlich.

**Tabelle 4-12:** Wachstumsverhalten, Ausbeute an Biomasse und spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten in Schüttelkulturen bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlicher Sauerstoffversorgung.

<b>Bedingungen</b>	<b>Generationszeit [h]</b>	<b>Biotrockenmasse [g/L]</b>		<b>Spez. Aktivität [U/mg]</b>		<b>Gütefaktor</b>
<i>Ohne Schikanen:</i>						
23°C	14,8	0,206	(42%)	5,9	(60%)	1,22
26°C	10,0	0,492	(100%)	7,7	(79%)	3,79
28°C	10,2	0,362	(74%)	5,6	(57%)	2,03
31°C	8,6	0,324	(66%)	5,8	(59%)	1,88
<i>Zwei Schikanen:</i>						
23°C	15,3	0,207	(42%)	6,7	(69%)	1,39
<b>26°C</b>	<b>11,2</b>	<b>0,480</b>	<b>(98%)</b>	<b>9,7</b>	<b>(100%)</b>	<b>4,66</b>
28°C	12,1	0,292	(59%)	5,0	(52%)	1,46
31°C	9,7	0,301	(61%)	5,8	(59%)	1,75
<i>Vier Schikanen:</i>						
23°C	15,5	0,221	(45%)	7,2	(74%)	1,59
26°C	12,7	0,470	(96%)	4,6	(47%)	2,16
28°C	12,2	0,210	(43%)	5,8	(59%)	1,22
31°C	10,4	0,214	(44%)	7,4	(76%)	1,58

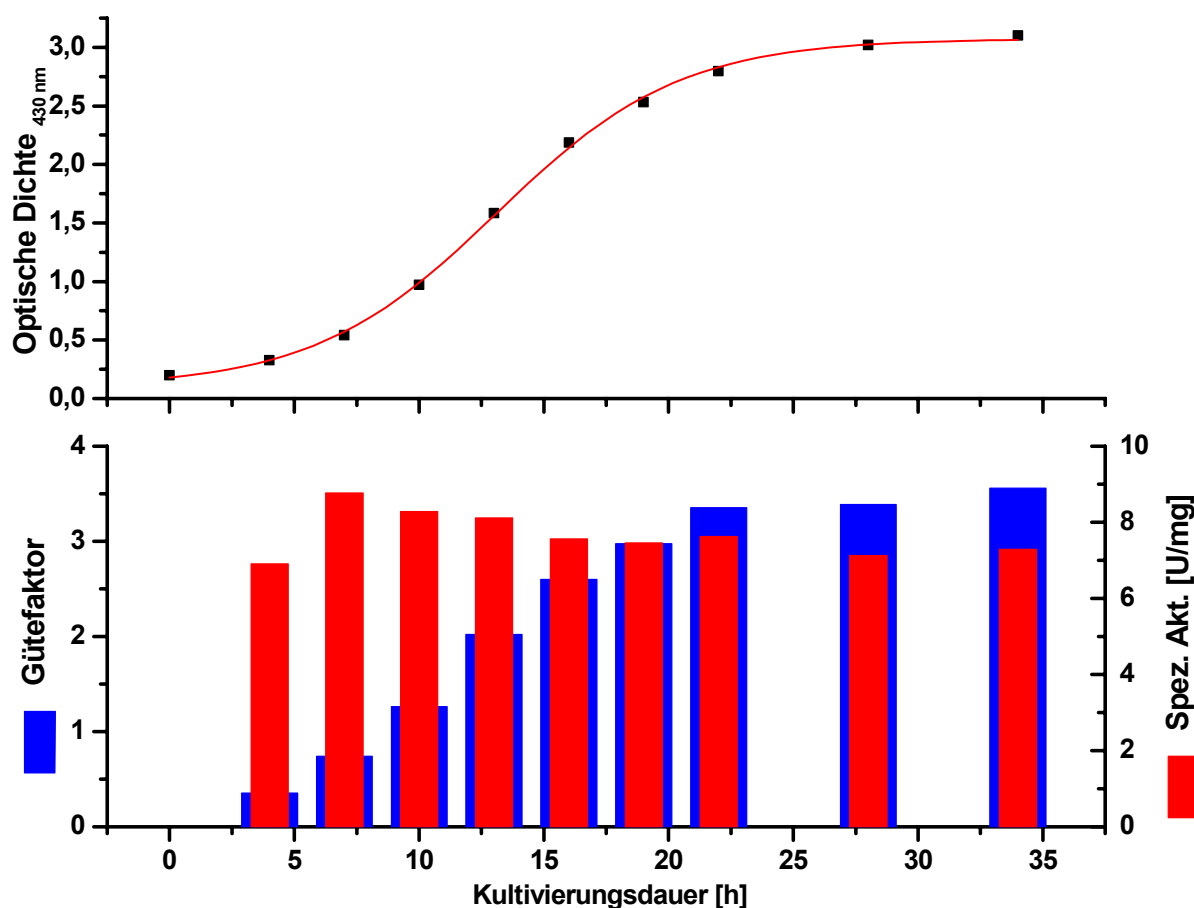
Tabelle 4-12 zeigt die Ergebnisse aus verschiedenen Schüttelkolbenexperimenten. Der Parameter Sauerstoffversorgung wurde über die Anzahl an Schikanen in den Kulturkolben variiert. Weiterhin wurde bei jeweils vier verschiedenen Temperaturen unter sonst gleichen Bedingungen, d.h. mit gleicher Schüttelgeschwindigkeit (120 rpm), bei gleicher Kolbengröße (500 mL) und mit gleichem Medium (MB50+EDTA+HEPES) kultiviert (Strategie zur Zugabe von Sulfit siehe Abschnitt 4.1.1.1).

Für den Zusammenhang zwischen Kultivierungstemperatur und erreichter Biotrockenmasse zeigt sich ein klares Ergebnis: Unter allen untersuchten Bedingungen wurde bei 26°C die höchste Ausbeute an Biotrockenmasse erreicht. Der Zusammenhang zwischen Anzahl der Schikanen und erreichter Biotrockenmasse ist nicht ganz so eindeutig: Es zeigt sich, dass mit zunehmender Anzahl an Schikanen geringere Ausbeuten erreicht werden. Während dieser Effekt bei 26°C nur wenige Prozent Unterschied ausmacht, sind die Unterschiede bei den höheren Temperaturen deutlicher. Auch in Hinblick auf die erreichten spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten sind die Ergebnisse indifferent: Während bei den Kulturen ohne Schikanen bzw. mit zwei Schikanen jeweils bei 26°C die höchsten Aktivitäten erreicht wurden, kehrt sich das Verhältnis bei den Kultivierungen mit vier Schikanen genau um.

In diesem Fall ergab die Kultur bei 26°C sogar die niedrigste Aktivität. Eine Betrachtung des Gütefaktors, also des Produkts aus Biotrockenmasse und spezifischer Sulfitoxidase-Aktivität, zeigt jedoch, dass unter allen untersuchten Bedingungen jeweils die Kulturen bei 26°C, und hierbei besonders die bei 26°C mit zwei Schikanen, die besten Ergebnisse lieferten.

#### 4.1.7 Einfluss von Erntezeitpunkt und Induktionszeitpunkt auf die erreichbaren spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten

Ausgehend von dem in den vorigen Abschnitten beschriebenen optimierten Medium (MB50+EDTA+HEPES), wurde untersucht, inwieweit sich der Zeitpunkt der Zellernte und der Zeitpunkt der Induktion, also der Zufütterung des Sulfits auf die maximal erreichbaren spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten auswirken. Der Einfluss des Erntezeitpunkts wurde überprüft, indem zehn Schüttelkolben mit dem gleichen Inokulum beimpft und unter gleichen Bedingungen (150 mL Medium in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm) kultiviert wurden. Alle Kolben wurden vor dem Animpfen mit einer 2M Natriumsulfit-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10 mmol/L versetzt. Es wurden dann nach 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 28 und 34 Stunden je ein Kolben entnommen und, wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben, komplett aufgearbeitet. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 4-10.



**Abbildung 4-10:** Abhängigkeit der maximal erreichten spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität vom Erntezeitpunkt (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II).

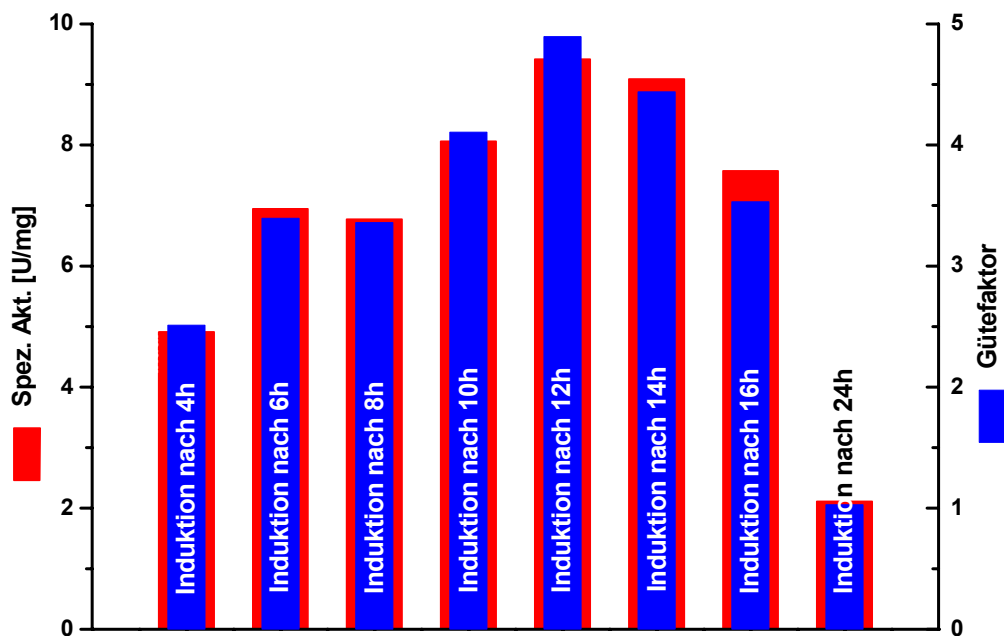
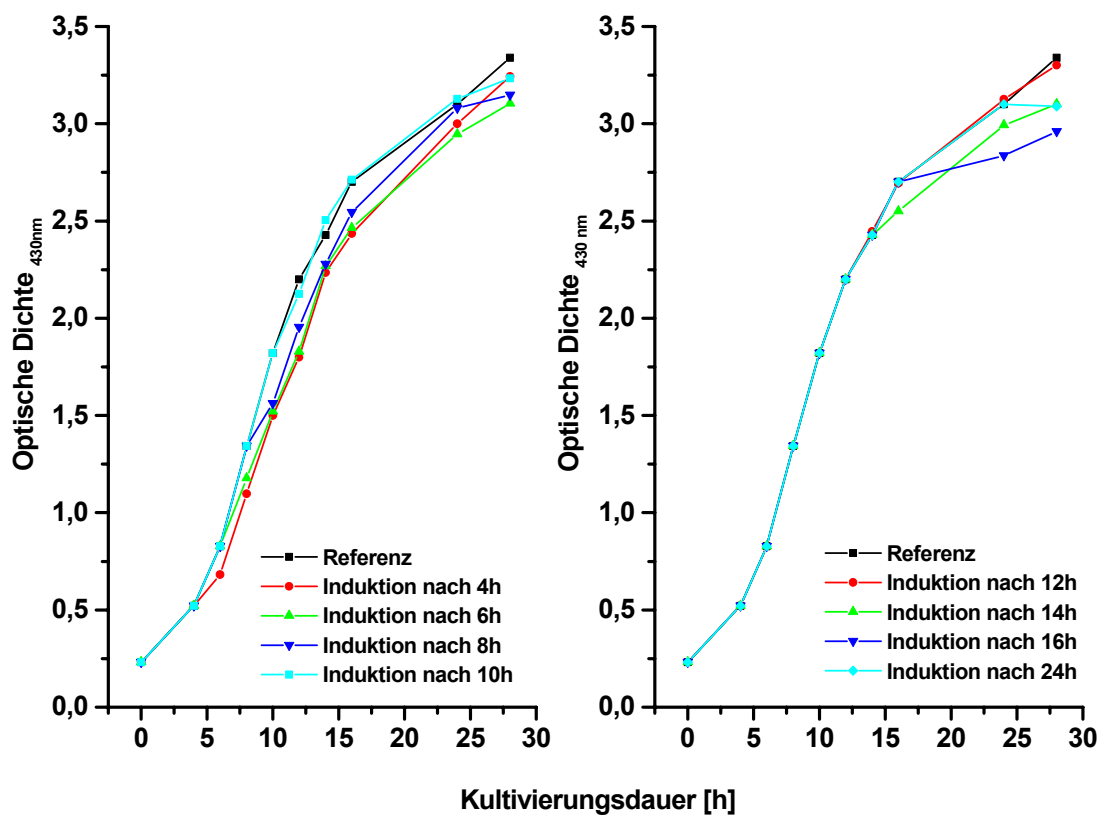
Die Auftragung zeigt, dass die erhaltenen spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten insbesondere am Beginn der exponentiellen Wachstumsphase stark ansteigen, dann aber ab Mitte der exponentiellen Phase wieder kontinuierlich absinken. Der Gütefaktor, also das Produkt aus der erhaltenen Biomasse und der spezifischen Enzymaktivität, steigt hingegen über die gesamte exponentielle Wachstumsphase kontinuierlich an. Mit Eintritt in die stationäre Phase findet dann keine signifikante Erhöhung des Gütefaktors mehr statt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss des Induktionszeitpunkts ermittelt. Hierzu wurden acht Schüttelkolben mit dem gleichen Inokulum beimpft und unter gleichen Bedingungen (150 mL Medium in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm) kultiviert. Nach 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 24 Stunden wurde je ein Kolben mit 2 M Natriumsulfitlösung bis zu einer Endkonzentration von 5 mmol/L versetzt. Nach Ablauf von insgesamt 28 Stunden wurden die Kultivierungen abgebrochen und die Kolben wurden aufgearbeitet, wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigt Abbildung 4-11.

Es zeigt sich, dass die gemessenen spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten und der berechnete Gütefaktor sich weitgehend parallel entwickeln. Dieser Zusammenhang liegt sicherlich darin begründet, dass in allen Kolben ähnliche Biomassen erreicht werden, so dass der eine Faktor des Gütefaktors nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Die erreichten spezifischen Enzymaktivitäten sind jedoch um so höher, je später die Induktion erfolgte. Die höchste spezifische Aktivität wird bei einer Induktion nach zwölf Stunden, also relativ spät in der exponentiellen Wachstumsphase, erreicht. Erst bei späteren Induktionszeitpunkten, also zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase, oder mit Eintritt in die stationäre Phase sinken die spezifischen Aktivitäten dann wieder deutlich ab.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass der Erntezeitpunkt für das Erreichen hoher spezifischer Sulfitoxidase-Aktivitäten bei gleichzeitig hohen Ausbeuten an Biomasse möglichst spät im Verlauf der Kultivierung gewählt werden sollte. Ideal ist ein Erntezeitpunkt zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase oder am Anfang der stationären Phase.

Die Induktion sollte ebenfalls relativ spät im Verlauf der Kultivierung erfolgen. Hier hat sich ein Zeitpunkt in der zweiten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase als ideal erwiesen.



**Abbildung 4-11:** Abhängigkeit der maximal erreichten spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität vom Induktionszeitpunkt (Kultivierung in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen, 26°C, 120 rpm, Certomat S-II). Zum besseren Überblick sind die Wachstumskurven im oberen Teil der Abbildung in zwei Diagrammen dargestellt. Beide Diagramme beziehen sich jedoch auf dasselbe Experiment.

#### **4.1.8 Vergleich einer Fermenterkultur mit optimiertem Medium mit einer Fermenterkultur vor Optimierung**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden, zum Zwecke der Biomassebeschaffung für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zur Aufreinigung der Sulfitoxidase, wiederholt auch Kultivierungen in einem 10 Liter-Fermentersystem durchgeführt. Dabei sind die Erkenntnisse aus den vorab beschriebenen Schüttelkolbenversuchen eingeflossen. In diesem Abschnitt werden exemplarisch zwei Fermenterkultivierungen vorgestellt, die sich durch die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums unterscheiden und anhand derer die Verbesserung des Kultivierungsmediums verdeutlicht werden kann.

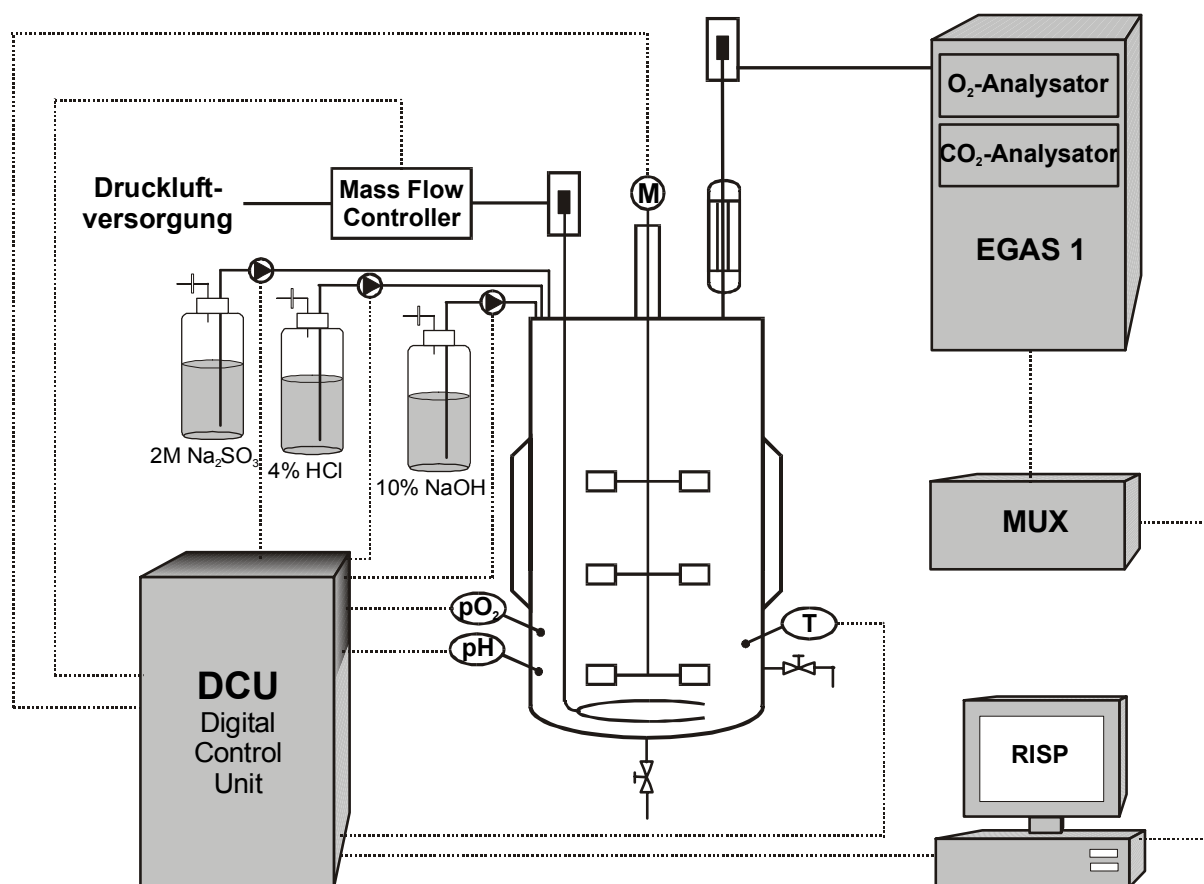
Die Kultivierungen wurden in einem Biostat C-Fermenter (Fa. B. Braun, Melsungen) mit einem Edelstahlkessel mit 10 Litern Arbeitsvolumen und einem Höhen/Durchmesser-Verhältnis von 3:1 durchgeführt. Die Temperierung des Systems erfolgte mit Prozessdampf und Kühlwasser über ein geschlossenes Heißwasserdrucksystem, bestehend aus einer Zirkulationspumpe und zwei Wärmetauschern. Das System wurde mit den drei standardmäßig installierten Scheibenrührern betrieben, die über ein oben angetriebenes Rührsystem bewegt wurden.

Der Biostat C ist mit einer digitalen Meß- und Regeleinheit DCU (Digital Control Unit) ausgerüstet, die über ihren Host-Anschluß (RS 422 Schnittstelle) mit dem institutsinternen Netzwerk verbunden war. Die Datenaufnahme erfolgte über das sogenannte RISP-System (Real Time Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover), einem Software-Paket, welches neben der grafischen Darstellung der Prozessdaten auf Workstations (VAX-Station) auch die Prozesssteuerung erlaubt. Daten werden alle 10 Sekunden aufgenommen und über einen Zeitraum von einer Minute gemittelt und gespeichert.

Der Kessel des Fermenters war standardmäßig mit einem Temperatursensor (Pt-100) sowie einer pH- und einer Gelöstsauerstoffelektrode (beide Fa. Mettler-Toledo) ausgestattet. Alle Sensoren waren in der unteren Stutzebene eingebaut. Die Begasung erfolgte mit Druckluft durch den eingebauten Mass-Flow-Controller über einen in-situ sterilisierbaren Sterilfilter (Fa. Pall) und ein Einblasrohr mit Begasungsring. Die Abluft wurde über einen Abluftkühler und einen in-situ sterilisierbaren Sterilfilter (Fa. Pall) in das Abgasanalyse-System EGAS-1 (Fa. Hartmann & Braun) geleitet. Dieses war mit einem kombinierten CO<sub>2</sub>-/O<sub>2</sub>-Analysator (URAS 10E, Fa. Hartmann & Braun) ausgerüstet. Die Messdaten wurden über einen als A/D-Wandler fungierenden Multiplexer (G-MUX 4 / MUX 100, Fa. B. Braun Biotech) an das RISP-System weitergeleitet.

Der pH-Wert wurde während der Kultivierung DCU-gesteuert durch Zugabe von 4%iger Salzsäure, bzw. 10%iger Natronlauge auf einen Wert von pH 7,3 ± 0,1 eingeregelt.

Vor Beginn der Kultivierung wurde der Fermenter mit allen Sensoren bestückt (die pH-Elektrode wurde vorher kalibriert) und mit Medium befüllt. Die in-situ Sterilisation erfolgte dann bei 121°C für 30 Minuten. Während der Sterilisation wurde die Nullpunktkalibration der  $pO_2$ -Elektrode durchgeführt. Die Kalibration des 100%-Wertes erfolgte dann nach Ende der Sterilisation bei den Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl: 600 rpm; Begasungsrate: 0,4 vvm). Die Korrekturmittelflaschen für NaOH und HCl wurden separat sterilisiert (Laborautoklav, Fa. Fedegari) und über eine 3 in 1-Animpfgarnitur an den Fermenter angekoppelt. An diese war eine zusätzliche leere Korrekturmittelflasche angeschlossen, die nach erfolgter Sterilisation unter einer Sterilwerkbank mit sterilfiltrierter 2M Natriumsulfid-Lösung befüllt wurde. Abbildung 4-12 gibt einen Überblick über das verwendete System:



**Abbildung 4-12:** Schematische Darstellung des verwendeten Fermentersystems mit den peripheren Einrichtungen.



#### 4.1.8.1 Ergebnisse aus zwei Kultivierungen im Vergleich

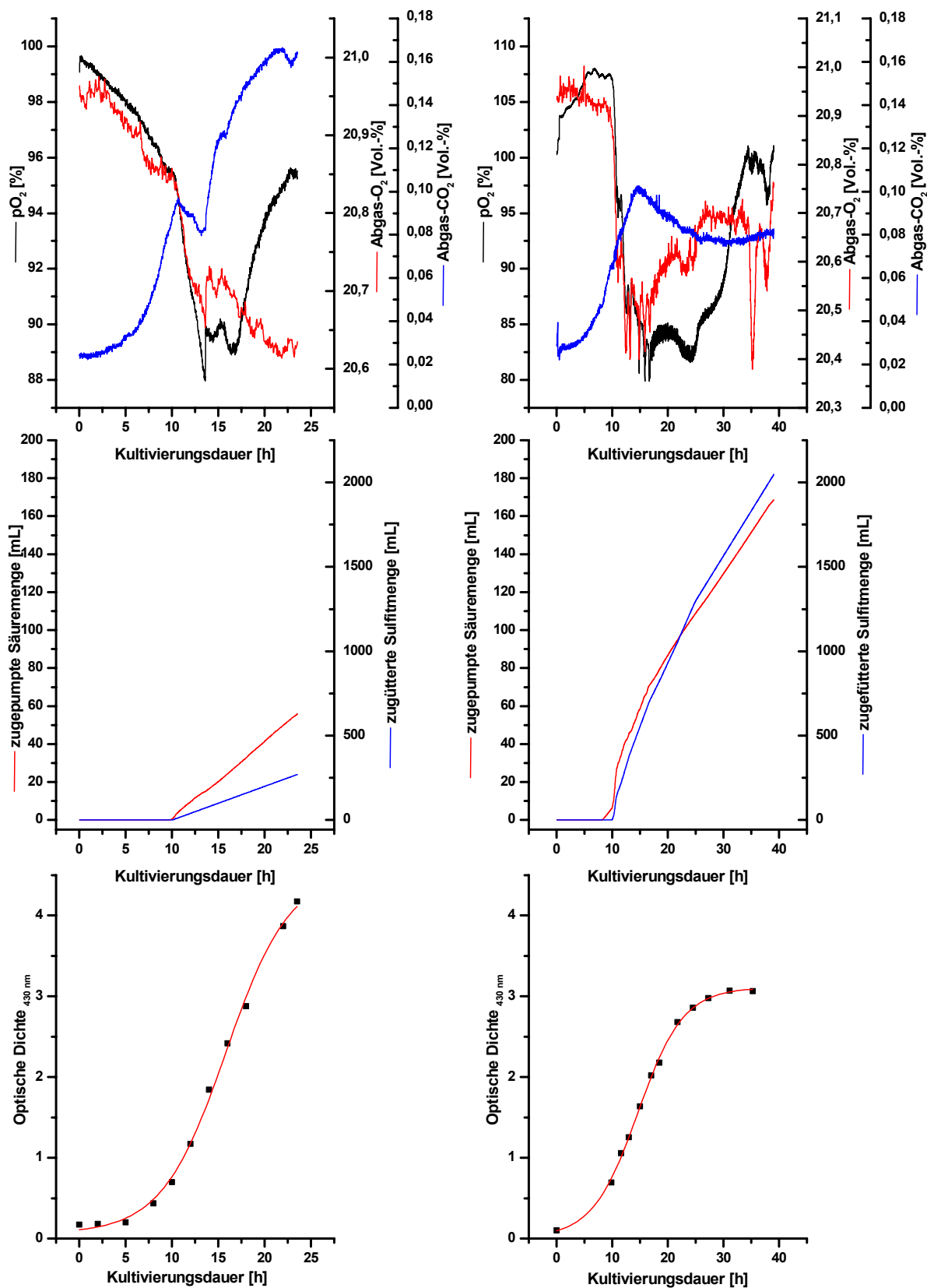
In Abbildung 4-13 sind die on-line gemessenen Daten und die zusätzlich off-line gemessene Optische Dichte bei 430 nm aus zwei Kultivierungen einander gegenübergestellt. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Daten einer Kultur mit dem aus den Optimierungsergebnissen resultierenden Medium (MB50+EDTA+HEPES). Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Daten einer Kultur mit MB50-Medium ohne EDTA und HEPES. Beide Kulturen wurden aus einer bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase gewachsenen Vorkultur bis zu einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/mL beimpft und bei 26°C und mit einer Rührerdrehzahl von 600 rpm kultiviert. Die Begasungsrate betrug bei beiden Kultivierungen 0,4 vvm.

Wie Abbildung 4-13 und Tabelle 4-13 zeigen, können mit dem optimierten Medium wesentlich höhere Optische Dichten erreicht werden. Außerdem erhält man mit einer wesentlich geringeren Sulfitzufüterraße Biomasse mit deutlich höherer spezifischer Aktivität. Auch die Generationszeit für das optimierte Medium liegt deutlich unter der für das nicht-optimierte Medium. Bis zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (etwa ab der 25. Stunde) wurden im optimierten Medium nur ca. 20% der Sulfitmenge zugefüttert, die im Fall des nicht optimierten Mediums nötig war. Die off-line mit Hilfe von Sulfiteststäbchen (Merckoquant, Fa. Merck) halbquantitativ bestimmten Sulfitkonzentrationen waren trotzdem im Kultivierungsverlauf bei beiden Kultivierungen vergleichbar. Die reduzierte Sulfitzufütterung bewirkt nicht nur ein wesentlich einfacheres Handling, sondern auch der durch die Zufütterung bewirkte Verdünnungseffekt des Mediums ist wesentlich geringer. Gleichzeitig geht mit der Reduktion der Sulfitzufütterung auch eine Reduktion der zur pH-Wert-Regulierung benötigten Säuremenge einher.

**Tabelle 4-13:** Vergleich einer Biostat C-Fermenterkultivierung mit optimiertem Medium mit einer Kultur vor Optimierung des Mediums.

Kultur	Generationszeit	Biotrockenmasse		Spez. Aktivität		Gütefaktor
	[h]	[g/L]	(%)	[U/mg]	(%)	
Optimiertes Medium	3,93	0,7	(100%)	9,2	(100%)	6,44
Nicht-optimiertes Medium	6,54	0,49	(70%)	6,1	(66%)	2,99

Eine Betrachtung des Gütefaktors zeigt, dass dieser sich durch die Optimierung mehr als verdoppelt.



**Abbildung 4-13:** Vergleich einer Fermenterkultur mit optimiertem Medium (linke Seite) mit einer Kultur mit nicht-optimiertem Medium. Beide Kultivierungen wurden in einem Biostat C Fermenter mit 10 Liter Kessel durchgeführt (26°C, 600 rpm, pH 7,3, Begasung 0,4 vvm).

#### 4.1.9 Fazit

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Medium Marine Broth 2216, konnte in einer Reihe von Schüttelkolben-Experimenten ein Kultivierungsmedium etabliert werden, welches den besonderen Anforderungen an *S. pontiacus* Kultivierungen zum Zwecke der Produktion von Sulfitoxidase Rechnung trägt.

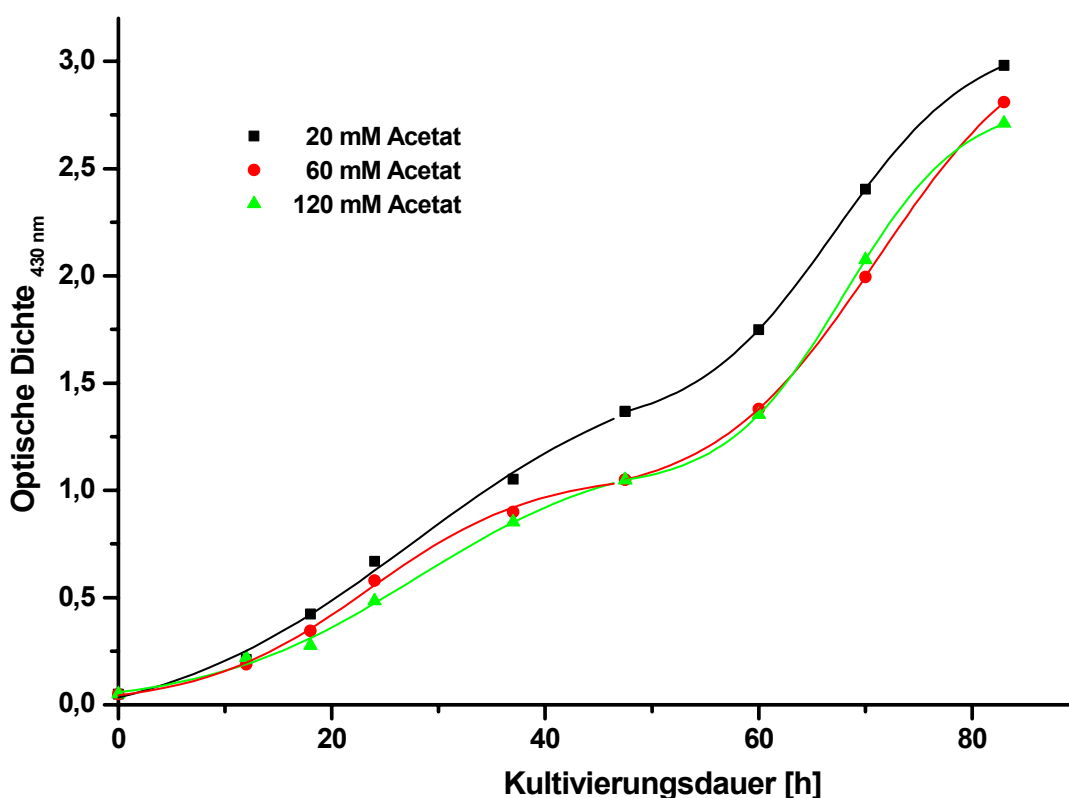
Es wurde festgestellt, dass durch Zugabe des Komplexbildners EDTA eine deutliche Steigerung der spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität im Rohextrakt erreicht werden kann. Weiterhin wurde der Einfluss der Konzentration der Kohlenstoffquelle Acetat untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass im untersuchten Konzentrationsbereich von 20 mmol/L bis 120 mmol/L mit einer Anfangskonzentration von 20 mmol/L zwar nicht die beste Ausbeute an Biomasse resultierte, dass aber, wegen der deutlich höheren spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität im Rohextrakt, diese Acetatanfangskonzentration die deutlich besten Ergebnisse liefert. Unterschiedliche Konzentrationen des Basismediums Marine Broth 2216 führten zu deutlichen Unterschieden, bezogen auf das Gesamtergebnis der Kultivierung. Im untersuchten Konzentrationsbereich von 10-50% wurden mit dem 50%igen Medium die besten Ergebnisse erhalten. Der Zusatz von Thiosulfat als reduzierter Schwefelspezies hatte weder einzeln noch in Verbindung mit Sulfit einen positiven Effekt. In beiden Fällen resultierten deutlich geringere spezifische Sulfitoxidase-Aktivitäten als bei vergleichbaren Experimenten ohne Zusatz von Thiosulfat. Die Zugabe der Puffersubstanz HEPES zum Kultivierungsmedium fängt nicht nur die durch die Zugabe von Sulfit verursachten pH-Veränderungen ab, sondern bewirkt offensichtlich auch eine deutliche Hemmung der Sulfitoxidation. Durch diese Maßnahme können eine deutliche Reduzierung der zuzuführenden Sulfitmenge und eine deutliche Steigerung der spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität erreicht werden.

Mit dem modifizierten Medium wurden die Parameter Kultivierungstemperatur und Sauerstoffeintrag in Schüttelkulturen untersucht. Dabei konnten optimierte Bedingungen etabliert werden. Weiterhin wurde für Schüttelkulturen der Einfluss des Ernte- und des Induktionszeitpunktes untersucht. Auch hier konnten optimale Zeitpunkte ermittelt werden.

Ein exemplarischer Vergleich einer Fermenterkultur mit nicht-optimiertem Medium mit einer Kultur mit optimiertem Medium hat schließlich gezeigt, dass durch die Optimierung des Mediums die Prozessausbeute deutlich verbessert werden konnte. Der zur besseren Vergleichbarkeit der Untersuchungen eingeführte Gütefaktor konnte durch die Optimierungsmaßnahmen mehr als verdoppelt werden.

## 4.2 Kontrollierte Sulfitversorgung der Kultivierungsmedien

Eines der gravierendsten Probleme bei Kultivierungen von *Sulfitobacter pontiacus* in Schüttelkolben ist die Versorgung der Kultivierungsmedien mit Sulfit. Bei einer diskontinuierlichen Sulfitzufütterung kann die Sulfitkonzentration im Kultivierungsverlauf so weit absinken, dass eine Induktion der Sulfitoxidase-Aktivität nicht mehr gewährleistet wird. Abbildung 4-14 zeigt die Auswirkungen absinkender Sulfitkonzentrationen auf das Wachstumsverhalten von *S. pontiacus* in Schüttelkolben mit MB50-Medium und unterschiedlichen Acetatanfangskonzentrationen. Sobald die Konzentration an Sulfiten unter einen „kritischen“ Wert absinkt, treten die Zellen erneut in eine exponentielle Wachstumsphase, und es resultieren Wachstumskurven, deren Verlauf an das bereits 1942 von Monod (Monod, 1942) beschriebene diauxische Wachstum von *E. coli* auf zwei verschiedenen Kohlenstoffquellen erinnert.



**Abbildung 4-14:** Wachstumsverhalten von *Sulfitobacter pontiacus* mit verschiedenen Acetatanfangskonzentrationen bei diskontinuierlicher Sulfitzufütterung. Die Zufüterraten stellt **nicht** dauerhaft ausreichende Sulfitkonzentrationen sicher.

*S. pontiacus* Zellen, die unter solchen Bedingungen kultiviert wurden, zeigen kaum noch Sulfitoxidase-Aktivität. Andere Optionen zur Sulfitzufütterung sind also durchaus wünschenswert.

Auch unter einem anderen Gesichtspunkt sind Änderungen in der Sulfitversorgung anzustreben:

Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Optimierungsexperimente basierten auf der wenig effizienten Variation einer oder maximal zweier Mediumskomponenten („one factor at a time“-Methode) bei sonst konstanter Mediumszusammensetzung. Erfolgversprechender sind jedoch Ansätze, die mit Hilfe statistischer Versuchsplanung einen weiteren Bereich in Form einer Multiparameteroptimierung abdecken. Neben anderen Verfahren sind hier besonders genetische Algorithmen zu nennen, mit deren Hilfe eine große Anzahl an Mediumskomponenten über größere Konzentrationsbereiche ohne genaue Vorkenntnisse über das biologische System variiert und optimiert werden können (Freyer et al., 1992). So haben zum Beispiel Weuster-Botz et al. (1995) mit Hilfe genetischer Algorithmen die Zusammensetzung (12 Mineralsalze und eine Aminosäure) eines synthetischen Mediums zur Produktion von Hydrocortison  $\Delta^1$ -Dehydrogenase in *Arthrobacter simplex* optimiert und dabei eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 5.000 erreicht. Karutz et al. (1992) berichten von der Optimierung der fermentativen L-Isoleucin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum* durch Nährmedienoptimierung mit Hilfe eines genetischen Algorithmus. Dabei wurden neun Spurenelemente in ihren Konzentrationen variiert, und die L-Isoleucin-Konzentration konnte um den Faktor 3 gesteigert werden. Žužek et al. (1996) schließlich berichten von der Optimierung der Mevinolin-Produktion mit *Aspergillus terreus*. Dabei wurden 10 Mediumkomponenten, einschließlich der Kohlenstoffquelle Glucose, mit Hilfe eines Genetischen Algorithmus optimiert. Es wurden Produktivitätssteigerungen von nahezu 300% erreicht.

Im konkreten Fall von *Sulfitobacter pontiacus* ist eine Mediumoptimierung, die neben den in den vorangegangenen Abschnitten untersuchten Parametern wie Thiosulfat-, Acetat-, und HEPES-Konzentration auch weitere Parameter wie die Konzentrationen einzelner Übergangsmetall-Ionen berücksichtigt, mit einer diskontinuierlichen Sulfitzufütterung im Prinzip unmöglich. Durch unterschiedliche Übergangsmetallionen-Konzentrationen unterscheidet sich zum Beispiel auch das Ausmaß an chemischer Sulfit-Oxidation im System sehr stark, so dass über eine diskontinuierliche Sulfitzufütterung eine grundsätzliche Vergleichbarkeit der Kultivierungen nicht mehr gewährleistet werden kann.

Ein Ansatz zur kontinuierlichen Zufütterung von Sulfit ohne eine Veränderung des apparativen Aufwands könnte in der Zugabe eines schwer löslichen Salzes zum Kultivierungsmedium liegen: Steht ein Bodensatz eines schwer löslichen Sulfits  $\text{MSO}_3$  mit der umgebenden Lösung im Gleichgewicht, so werden pro Zeiteinheit ebenso viele

Ionenpaare  $M^{2+} + SO_3^{2-}$  ins Kristallgitter eingebaut, wie aus dem Gitter in Lösung gehen. Durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes erhält man dann

$$L_{MSO_3} = c_{M^{2+}} \cdot c_{SO_3^{2-}}$$

mit der temperaturabhängigen Konstanten  $L_{MSO_3}$ , dem Löslichkeitsprodukt des Sulfit  $MSO_3$ .

Eine schematische Darstellung der Vorgänge in einer gesättigten  $MSO_3$ -Lösung zeigt Abbildung 4-15 A. Im vorliegenden Fall unterläge das in Lösung gehende Sulfit sowohl chemischen als auch biologischen Oxidationsprozessen, so dass die Konzentration an Sulfit im umgebenden Medium dauernden Veränderungen unterworfen wäre. Unter der Voraussetzung, dass der Lösungsprozess schnell ist im Vergleich zu den sulfitverbrauchenden Prozessen, sollten sich aber trotzdem im Überstand annähernd konstante Sulfitkonzentrationen einstellen, solange noch fester  $MSO_3$ -Bodensatz vorhanden ist. Zu bedenken ist dabei allerdings auch die Rolle des Gegenkations  $M^{2+}$ . Sofern diese nicht metabolisiert wird, ändert sich seine Konzentration im Überstand nicht, und gemäß dem Massenwirkungsgesetz müsste die Menge an in Lösung gehendem Sulfit kontinuierlich absinken. Sobald jedoch –wie im konkreten Fall der Kultivierung von *S. pontiacus*– in EDTA-haltigen Medien kultiviert wird, sollte dieser Effekt durch die Komplexierung des  $M^{2+}$ -Kations jedoch ausgeglichen, oder, für den Fall, dass die EDTA-Konzentration groß ist, sogar überkompensiert werden.

Für einen Einsatz eines schwer löslichen Sulfits in *S. pontiacus* Kultivierungen müssen verschiedene Randbedingungen erfüllt sein:

- Das Gegenkation  $M^{2+}$  darf für *S. pontiacus* nicht toxisch sein.
- Das Sulfat des Gegenkations  $M^{2+}$  darf nicht schwerer löslich sein als das Sulfit  $MSO_3$ .
- Die Konzentration des Gegenkations  $M^{2+}$  sollte für das Optimierungsproblem von geringer Bedeutung sein.
- Das Löslichkeitsprodukt von  $MSO_3$  sollte so sein, dass sich im Überstand, also im Kultivierungsmedium, Sulfitkonzentrationen in Bereichen ergeben, die von *S. pontiacus* toleriert werden.

*S. pontiacus* toleriert ohne Adaptionphase Sulfitkonzentrationen von ca. 20 mmol/L und nach einer längeren Adaption maximal Konzentrationen bis zu 80 mmol/L. Damit sind für das Löslichkeitsprodukt von  $MSO_3$  enge Grenzen gesetzt.

Neben einigen Schwermetallsulfiten, deren Kationen nicht die oben beschriebenen Anforderungen an das Gegenkation erfüllen, sind auch die Sulfite von Magnesium und Calcium schwer löslich.

Über die Löslichkeiten von  $\text{MgSO}_3$  und  $\text{CaSO}_3$  finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Einen Überblick gibt Tabelle 4-14:

**Tabelle 4-14:** Löslichkeiten von  $\text{CaSO}_3$  und  $\text{MgSO}_3$ .

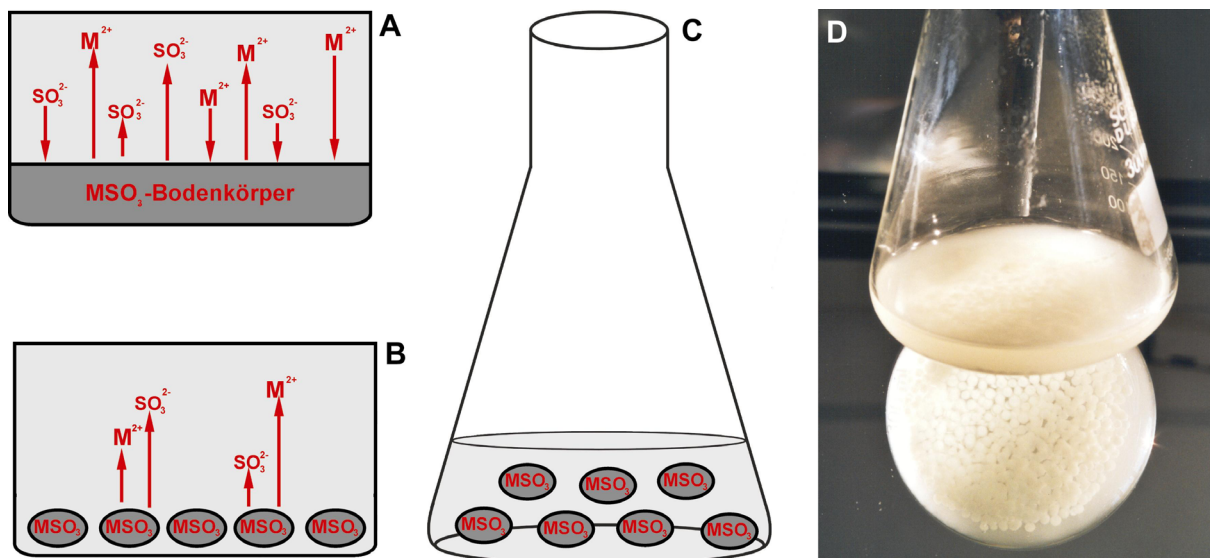
	<b>Löslichkeit [mmol/L]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Literatur</b>
<b>CaSO<sub>3</sub></b>	0,39	30	Van der Linden, 1916
	0,38	40	Van der Linden, 1916
	1,54	20	Rodin und Margulis, 1983
	2,05	50	Rodin und Margulis, 1983
<b>MgSO<sub>3</sub></b>	30,09	20	Rodin und Margulis, 1983
	33,73	50	Rodin und Margulis, 1983

Wie die Tabelle zeigt, sollte zumindest Calciumsulfit geeignet sein, um für *S. pontiacus* geeignete Sulfit-Konzentrationen einzustellen. Selbst bei einer angenommenen Löslichkeit von 2,05 mmol/L wird der als unproblematisch anzunehmende Wert von 20 mmol/L für die Sulfitkonzentration noch deutlich unterschritten. Kritischer ist die Situation hingegen für das Magnesiumsulfit. Der Konzentrationsbereich von 30-34 mmol/L könnte bei *S. pontiacus* Kulturen, die nicht an Sulfit adaptiert sind, schon zu Problemen führen.

Der Einsatz schwer löslicher Sulfite in Schüttelkulturen wirft allerdings zwei Probleme auf. Zum einen ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Kultivierungen weiterhin mit optischen Methoden überwacht werden können, zum anderen muss das ungelöste Salz nach Ende der Kultivierung vollständig vom Kultivierungsmedium abgetrennt werden können. Da es sich bei der Sulfitoxidase um ein intrazelluläres Enzym handelt, muss auch gewährleistet sein, dass das ungelöste Salz von den Zellen getrennt werden kann, da andernfalls eine Bestimmung der Enzymaktivität verhindert wird (siehe Anhang 7.2.2).

Eine Immobilisierung der eingesetzten schwer löslichen Sulfite  $\text{MSO}_3$  würde diese Probleme lösen. Eine Überwachung der Kulturen mit optischen Methoden wäre möglich, und bei ausreichender Größe der Immobilisate wäre auch eine Abtrennbarkeit des ungelösten Salzes von Medium und Zellen problemlos gewährleistet.

In Abbildung 4-15 B und C ist dieses Verfahren schematisch dargestellt. Abbildung 4-15 D zeigt eine Umsetzung dieses Ansatzes. Auf die die Umsetzung betreffenden Einzelheiten wird später eingegangen.



**Abbildung 4-15:** Immobilisierung schwer löslicher Sulfitspezies. Teil A zeigt eine schematische Darstellung der Vorgänge in einer gesättigten  $\text{MSO}_3$ -Lösung. Die Teile B und C zeigen schematisch die Vorgänge bei Immobilisierung des schwer löslichen Salzes  $\text{MSO}_3$ . Teil D zeigt eine Realisierung des in Teil C schematisch dargestellten Ansatzes.

In den folgenden Abschnitten werden etablierte Verfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren vorgestellt, die prinzipiell auch zur Immobilisierung schwer löslicher Salze geeignet sein sollten. Außerdem werden Ansätze zur Realisierung des Konzepts der Sulfitversorgung durch immobilisierte Sulfitspezies vorgestellt und diskutiert.



### 4.2.1 Immobilisierungstechniken

In der Biotechnologie wird unter Immobilisierung eine „Einschränkung der Beweglichkeit von Mikroorganismen, Zellen oder Molekülen durch chemische oder physikalische Methoden“ (nach Hartmeier, 1986) verstanden. Wichtige und bedeutende Verfahren der Biotechnologie, wie z.B. die Verfahren der Glucoseisomerisierung im Bereich der Lebensmitteltechnik (Schiweck et al., 1991) oder der Penicillinspaltung (Poulson, 1984) im pharmazeutischen Sektor, machen von immobilisierten Enzymen Gebrauch. Aber auch die Immobilisierung ganzer Zellen spielt in vielen Verfahren eine wichtige Rolle. So werden schon seit 1823 an Holzspänen adsorbierte Zellen von *Acetobacter* für die technische Gewinnung von Essigsäure aus Ethanol eingesetzt (Klein und Vorlop, 1985).

Techniken zur Immobilisierung von Zellen und Mikroorganismen oder Enzymen sind daher sehr etabliert. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Techniken:

Die Immobilisierung durch Kopplung führt zur Ausbildung chemischer Bindungen zwischen dem Immobilisierungsträger und dem Biokatalysator. Dabei treten meist kovalente und seltener ionische Bindungen auf. Diese Methode wird jedoch eher selten zur Immobilisierung ganzer Zellen eingesetzt und auch für das oben skizzierte Verfahren der Immobilisierung schwer löslicher Sulfite kommen Methoden die auf dem Prinzip der Immobilisierung durch Kopplung beruhen nicht in Betracht.

Bei der Immobilisierung durch Einschluss wird der Biokatalysator in eine Matrix eingehüllt oder durch eine Membran fixiert.

Bei der Matrixeinhüllung sind verschiedene Verfahren gebräuchlich:

- Durch Polykondensation oder Polyaddition lassen sich chemisch und mechanisch stabile Netzwerke erzeugen. Problematisch bei diesen Verfahren ist oft die Toxizität der Monomerkomponenten und die Reaktionsbedingungen, die oft hohe Temperaturen oder den Einsatz von Radikalstartern, wie z.B. Ammoniumperoxodisulfat, erforderlich machen.
- Bei der Gelbildung durch Temperaturwechsel werden die zu immobilisierenden Komponenten in einem Polymer-Lösungsmittelgemisch, z.B. in einer Gelatine- oder Agarlösung, suspendiert. Durch Abkühlung der Suspension erfolgt dann die Ausbildung der Gelmatrix.
- Am weitesten verbreitet ist jedoch der Einschluss in ionotrope Gele, eine Methode, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert wird.

#### 4.2.2 Ionotrope Gele als Einschlußmatrix

Durch Vernetzung mit mehrwertigen Kationen bzw. Anionen lassen sich wasserlösliche anionische oder kationische Polyelektrolyte in feste Polymernetzwerke, d.h. Gele, überführen. Besonders geeignete Polyelektrolyte sind Polysaccharide mit Carboxyl- oder Sulfonsäuregruppen (Alginat, Pektin, Carrageenan) oder Aminogruppen (Chitosan). Als Gegenionen sind Calcium- und Kaliumionen sowie Polyphosphate geeignet. Wegen des geringen Preises und der Ungiftigkeit der Polyelektrolyte und Gegenionen sind diese ionotropen Gele besonders für biotechnologische Anwendungen geeignet. Einen Überblick über Polyelektrolyte und Gegenionen gibt Tabelle 4-15.

**Tabelle 4-15:** Ionische Polymere und vernetzende Gegenionen (nach Buchholz und Kasche, 1997).

Festion	Träger	Gegenionen
R - COO <sup>-</sup>	Alginat Pektin Carboxymethylcellulose	Ca <sup>2+</sup> (Al <sup>3+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> ) Ca <sup>2+</sup> (Al <sup>3+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ) Ca <sup>2+</sup> (Al <sup>3+</sup> )
R - SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carrageenan	K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup>
R - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Chitosan	Polyphosphate

Die wohl verbreitetste Matrix für die Bildung ionotroper Gele ist das Alginat, ein hochmolekulares Polysaccharid, welches erstmals 1883 von Stanford beschrieben wurde (Stanford, 1883). Kommerziell erhältliche Alginat werden heute hauptsächlich aus *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* und *Ascophyllum nodosum* gewonnen (Smidsrød und Skjåk-Bræk, 1990). Daneben wird Alginat auch auf biotechnologischem Wege mit Bakterien der Gattung *Azobacter vinelandii* oder verschiedenen Gattungen *Pseudomonas* gewonnen (Brandenberger, 1999).

Neben Anwendungen zur Immobilisierung von Mikroorganismen oder tierischen Zellen (Duff, 1985) finden Alginat auch Einsatz als Material für Implantate (Goosen et al., 1985) und als Immobilisierungsmatrix für Arzneimittel, die –z.B. in Form von Pflaster–transdermal appliziert werden. Ein weiterer großer Anwendungsbereich ist der Einsatz als Verdickungsmittel (Lebensmittelzusatzstoff E 400 bis E 407) in der Lebensmittelindustrie.

Das unverzweigte binäre Copolymer der Alginsäure besteht aus 1-4 verknüpften β-D-Guluronsäure (G)- und α-L-Mannuronsäure (M)- blöcken (Abbildung 4-16). Je nach Quelle und Gewebeart unterscheiden sich hierbei nicht nur das Verhältnis von Guluronsäure und Mannuronsäure, sondern auch die Abfolge von G- und M-Blöcken.

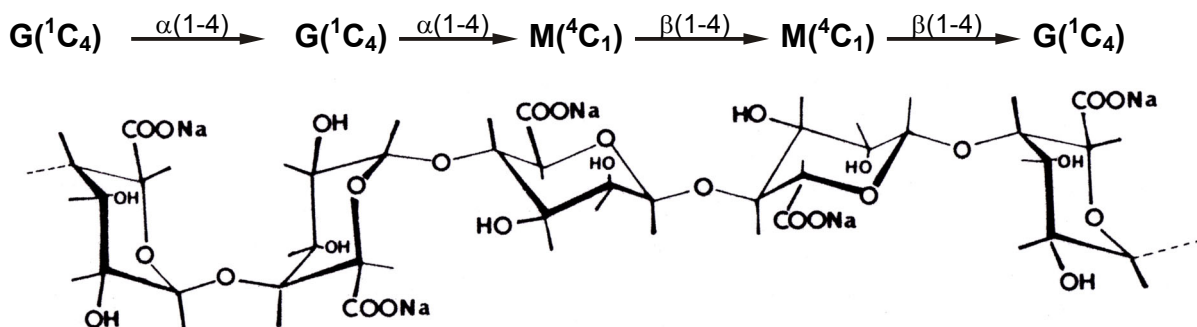
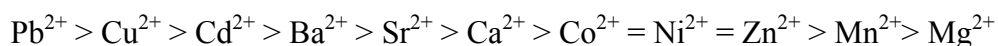


Abbildung 4-16: Chemische Struktur von Natriumalginat. G: Guluronsäure; M: Mannuronsäure.

Im vernetzten Zustand tritt eine hohe Affinität von benachbarten Guluronsäuren zu divalenten Kationen auf. Die Stabilität der resultierenden Gele hängt dabei sehr stark vom Gegenion ab und nimmt in der Reihenfolge



ab. Abbildung 4-17 B zeigt die Bindungsverhältnisse bei der Bindung divalenter Kationen in der Gelmatrix.

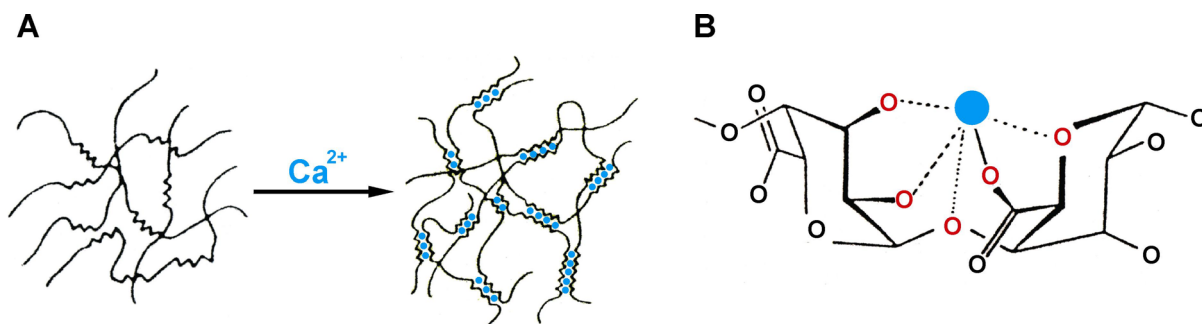
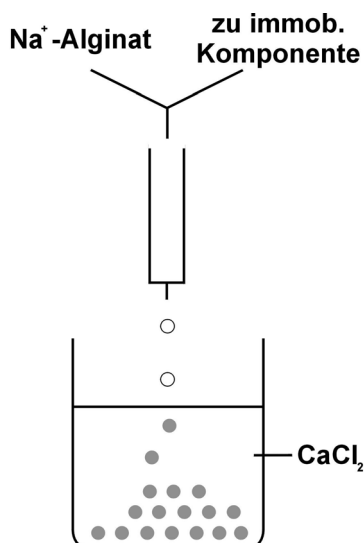


Abbildung 4-17: A: Das „Egg Box“-Modell als Beschreibung der Bindungsverhältnisse in Calciumalginat-Gele.

B: Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  (blau) zwischen zwei benachbarten Guluronsäure-Resten.

Aus der Tatsache, dass Metallkationen nur zwischen benachbarten G-Blöcken gebunden werden, folgt, dass Alginat mit hohem G-Blockanteil stärker vernetzte und festere Gele liefern als Alginat mit hohem M-Blockanteil. Grant et al. (1973) haben ein Modell entwickelt (*egg box model*), das den Aufbau der Gelmatrix verdeutlicht (Abbildung 4-17 A).

Abbildung 4-18 verdeutlicht die gängigste Methode zur Herstellung der Alginat-Perlen. In der Regel wird eine 2-4%ige (w/v) wässrige Lösung von Natriumalginat mit der zu immobilisierenden Komponente gemischt und durch eine Spritze in eine Calciumchloridlösung (20-100 mmol/L) getropft. Daran schließt sich eine Härtung der Perlen in der Calciumchloridlösung an. Die Härtung dauert meist 5-30 Minuten. Form und Größe der Alginatperlen hängen dann hauptsächlich von der Viskosität der Natriumalginatlösung und von der Fallstrecke von der Spritze zur Calciumchloridlösung ab.



**Abbildung 4-18:** Herstellung von Calciumalginatperlen durch Eintropfen einer Natriumalginatlösung in eine Calciumsalzlösung. Die zu immobilisierende Komponente wird vorab der Natriumalginatlösung beigegeben.

Ein wichtiger –weil unter Umständen limitierender– Faktor sind die Diffusionseigenschaften solcher Alginatperlen. Angaben zu Diffusionskoeffizienten von verschiedenen Substraten in Calcium-Alginat-Partikeln finden sich bei Tanaka et al. (1984). Einen Überblick gibt Tabelle 4-16.

**Tabelle 4-16:** Vergleich der Diffusionskoeffizienten  $D$  verschiedener Substrate in Wasser und in Calcium-Alginat-Partikeln bei 30°C (Tanaka et al., 1984).

Substrat	M [g/mol]	$D \cdot 10^4 \left[ \frac{cm^2}{min} \right]$	
		in H <sub>2</sub> O	in Ca-Alginat (2%)
Glucose	180	4,08	4,10
L-Tryptophan	204	4,02	4,00
$\alpha$ -Lactoalbumin	15600	0,61	0,61
Albumin	69000	0,42	keine Diffusion

Die Aufstellung zeigt, dass die Diffusion kleinerer Moleküle in Alginatperlen quasi nicht behindert wird.

#### 4.2.2.1 Untersuchungen zur Immobilisierung von Calciumsulfid in Alginat-Perlen

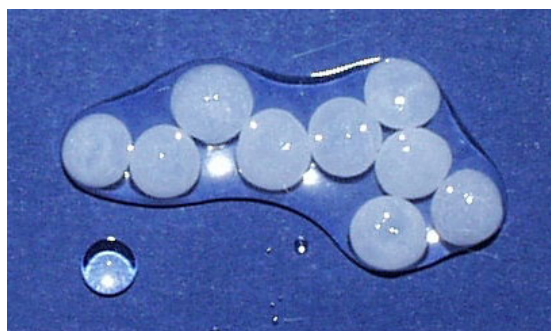
Die Umsetzbarkeit des oben beschriebenen Weges zur kontinuierlichen Sulfidversorgung von *S. pontiacus* Schüttelkulturen sollte zuerst mit Hilfe von in Alginat-Perlen immobilisiertem Calciumsulfid untersucht werden.

Hierzu wurde zuerst durch Mischen gleicher Volumina einer 2M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und einer 2M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung Calciumsulfid gefällt. Der weiße Niederschlag wurde bei 3345 g ca. eine Minute abzentrifugiert, anschließend mit einer dem Volumen des Niederschlages entsprechenden Menge bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und dann erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Der so gewaschene und abzentrifugierte Niederschlag von Calciumsulfid wurde dann in möglichst wenig bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Anschließend wurden gleiche Volumina dieser Calciumsulfid-in-Wasser-Suspension und einer Lösung von 4% (w/v) Natrium-Alginat in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  vermischt und mit einer Einwegspritze durch eine Kanüle mit 0,8 mm Innendurchmesser aus ca. 20 cm Höhe in eine 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung getropft. Die erhaltenen Perlen wurden zur Härtung für ca. 30 Minuten in der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung belassen.

Zur Überprüfung des Konzepts der Sulfidversorgung durch immobilisierte Sulfidspezies wurden etwa 2 g (feuchte Einwaage) der so erhaltenen Perlen (siehe Abbildung 4-20) zunächst mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und dann in einem 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen mit 100 mL bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt. Der Kolben wurde bei 26°C und 120 rpm auf einem Rundschüttler Certomat S-II geschüttelt.

Dabei wurde über einen Zeitraum von 36 Stunden der Sulfidgehalt im Überstand halbquantitativ mit Sulfid-Teststäbchen (Merckoquant Sulfid-Test, Fa. Merck) bestimmt.

Selbst unter Berücksichtigung der Messungenauigkeit der Sulfidbestimmung mit Hilfe von Teststäbchen konnte dabei gezeigt werden, dass eine Aufrechterhaltung geeigneter Sulfidkonzentrationen über einen längeren Zeitraum möglich ist. Zur weiteren Untersuchung des Konzeptes wurde dann der oben beschriebene Versuch in MB50+EDTA Medium (siehe Anhang 7.1.2) wiederholt. Dazu wurden 2 g (feuchte Einwaage) der Calciumsulfid-Alginat-Perlen in einem 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen mit 100 mL des Mediums



**Abbildung 4-19:** Calciumsulfid in Calcium-Alginat-Perlen immobilisiert.

versetzt. Der Kolben wurde ebenfalls bei 26°C und 120 rpm auf einem Rundschtüttler Certomat S-II geschüttelt.

Nach ca. 18 Stunden hatte sich bereits ein Großteil der zugegebenen Alginat-Perlen ganz oder teilweise aufgelöst und das immobilisierte Calciumsulfit wieder freigegeben. In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise zur Reversibilität der Gelbildung bei Calcium-Alginat. Danach lösen sich Calcium-Alginat-Gele in citrat-, phosphat- oder EDTA-haltigen Medien, also in Gegenwart von Verbindungen mit hoher Affinität zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Kation, leicht wieder auf (Brandenberger, 1999). Um die möglichen Ursachen für die Auflösung der Perlen einzugrenzen, wurde ein zweiter Versuch in MB50-Medium ohne EDTA-Zusatz durchgeführt. Doch auch unter diesen Bedingungen war die Stabilität der Perlen deutlich reduziert, und es trat nach kurzer Zeit eine deutliche Auflösung der Perlen ein. Bei Smidsrød und Skjåk-Bræk (1990) finden sich ebenfalls Hinweise auf eine deutliche Einschränkung der Stabilität von Alginat-Perlen in salzreichen Medien. Unter Bedingungen mit sehr hohen Konzentrationen an  $\text{Na}^+$  findet demnach ein Austausch der vernetzenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gegen die nicht-vernetzenden  $\text{Na}^+$ -Ionen statt. Smidsrød und Skjåk-Bræk empfehlen, das  $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis kleiner als 25 : 1 zu halten. Eine Betrachtung der Medienzusammensetzungen (Anhang 7.1.2) zeigt jedoch, dass dieses Verhältnis in den sehr salzhaltigen marinen Medien deutlich überschritten wird. Im Falle des MB50-Mediums beträgt das  $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis ca. 48 : 1, liegt also sehr deutlich über dem empfohlenen Höchstwert. Die Auflösung der Alginat-Perlen in MB50-Medien liegt also offensichtlich im hohen Salzgehalt des Mediums begründet.

#### **4.2.2.2 Untersuchungen zur Immobilisierung von Magnesiumsulfit in Alginat-Perlen**

Die Experimente mit Magnesiumsulfit in Alginat-Perlen wurden parallel zu den Versuchen mit Calciumsulfit durchgeführt, zeigten allerdings noch deutlicher die Probleme, die mit dem Gelierungsvorgang der Alginatperlen verbunden sind.

Es wurden zuerst gleiche Volumina einer 4M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung und einer 2M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung gemischt. Anschließend wurde der Fällungsprozess durch Zugabe eines Kristallisationskeimes Magnesiumsulfit ausgelöst. Der weiße Niederschlag wurde bei 3345 g ca. eine Minute abzentrifugiert, anschließend mit einer dem Volumen des Niederschlages entsprechenden Menge bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und dann erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Der so gewaschene und abzentrifugierte Niederschlag von Magnesiumsulfit wurde dann in möglichst wenig bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Anschließend wurden gleiche Volumina dieser Magnesiumsulfit-in-Wasser-Suspension und einer Lösung von 4% (w/v) Natrium-Alginat in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  vermischt und mit einer Einwegspritze durch eine Kanüle mit 0,8 mm Innendurchmesser aus ca. 20 cm Höhe in eine

100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung getropft. Die erhaltenen Perlen wurden zur Härtung für ca. 30 Minuten in der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung belassen.

Schon nach kurzer Zeit in der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zeigten sich deutliche Anzeichen eines Umfällungsprozesses. Das Magnesiumsulfit aus den Perlen löste sich auf, dafür war an der Oberfläche der Alginat-Perlen die Bildung von weißen Kristallen zu beobachten. Es fand also offensichtlich ein Wechsel des Metallkations zu Gunsten des schwerer löslichen Calciumsulfits statt. Eine Reduzierung der Aushärtezeit in der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung führte auch zu einer deutlichen Reduzierung der Perlenstabilität. Versuche, Magnesiumsulfit-Alginat-Perlen durch Eintropfen in 100 millimolare Lösungen von  $\text{Mg}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ -Lösungen zu erzeugen, schlugen ebenfalls fehl. Unter diesen Bedingungen war keine ausreichende Gelierung des Alginats zu beobachten.

### 4.2.3 Polyvinylalkohol als Einschlussmatrix

Polyvinylalkohol (PVA) entsteht durch die Verseifung von Polyvinylestern und wurde erstmals 1915 von Dr. F. Klatte (Chemische Fabrik Griesheim Elektron) synthetisiert (Hoechst, 1989). Eine Patentanmeldung des Herstellverfahrens durch alkalische Verseifung von Polyvinylacetat erfolgte 1924. In der heutigen Zeit ist Polyvinylalkohol ein Massenprodukt, das in großen Maßstäben durch kontinuierliche Polymerisation von Vinylacetat in Methanol und anschließende alkalische Alkohololyse produziert wird. Über Steuerung der Reaktionsbedingungen können die wichtigen Parameter Polymerisationsgrad und Hydrolysegrad eingestellt werden. Anwendung finden Polyvinylalkohole in verschiedenen Bereichen, so z.B. in Klebstoffen, als physiologisch unbedenkliche Beschichtung von Lebensmittelverpackungen und als Verdickungsmittel für Farben (Remmers, 1992).

Eine Gelierung von Polyvinylalkoholen kann auf verschiedene Arten bewirkt werden:

- Durch Komplexierung, z.B. mit Borsäure.
- Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen von wässrigen PVA-Suspensionen („freeze-thaw“-Methode).
- Durch Zugabe eines wasserlöslichen Zusatzstoffes mit nachfolgendem Wasserentzug und Phasentrennung.

Mit geeigneten Substanzen bilden Polyvinylalkohole stabile Komplexverbindungen. Ein klassisches Beispiel ist die Reaktion der PVA-Hydroxylgruppen mit Borsäure und ihren Salzen. Je nach Konzentration der Borsäure bilden sich unterschiedlich stabile Gele. Ähnlich wie bei der ionotropen Gelbildung von Alginat können auch PVA-Perlen durch Eintropfen einer wässrigen PVA-Lösung in eine Borsäurelösung erhalten werden (Hashimoto und Furukawa, 1987). Im sauren Milieu bilden sich PVA-Borsäure-Monodiolkomplexe, im basischen Milieu hingegen bilden sich PVA-Borsäure-Didiolkomplexe. Analog zu den ionotropen Alginat-Perlen ist allerdings auch die Vernetzung der PVA-Lösung reversibel. Schon beim Absenken der Konzentration der Borsäure lösen sich die Perlen wieder auf.

Hochelastische und stabile PVA-Hydrogele können dagegen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen von wässrigen PVA-Suspensionen erhalten werden („freeze-thaw“-Methode, Lozinsky et al., 1986; Ariga et al. 1987/1989). Bei dieser, vom pH-Wert weitgehend unabhängigen, Gelierung bilden sich zwischen den Hydroxylgruppen der einzelnen Polyvinylalkoholmakromoleküle vernetzende Wasserstoffbrückenbindungen aus. Das wiederholte Einfrieren steigert dabei die Stabilität der Gele deutlich (Shinozaki und Abe, 1988; Ariga et al. 1987; Hirai et al. 1989).



Bei Verwendung einer PVA-Lösung mit einem Hydrolysegrad  $\geq 99$  mol-% und durch Zugabe eines gelösten Zusatzstoffes kann eine Gelierung des Polyvinylalkohols bei Temperaturen über 0°C erreicht werden. Der Zusatzstoff muss dabei nichtwässrige Hydroxyl- oder Aminogruppen enthalten. Ein geeigneter Zusatzstoff ist beispielsweise Polyethylenglycol. Die PVA-Lösung wird auf eine Kunststoffoberfläche aufgetropft und an der Luft stehen gelassen. Durch den dadurch resultierenden Wasserverlust entsteht eine Phasentrennung in eine wässrige, den Zusatzstoff enthaltende Phase und in eine den Polyvinylalkohol enthaltende wässrige Phase, in der der Polyvinylalkohol geliert vorliegt. Die PVA-Perlen können in einer Salzlösung, die vorzugsweise mehrwertige Anionen enthält, rückgequollen und stabilisiert werden.

Die mechanische Stabilität derart hergestellter Gelkörper ist insbesondere hinsichtlich der Reiß- und Abriebfestigkeit deutlich besser als bei den nach den vorgenannten Verfahren hergestellten Gelen. Die Gelkörper können prinzipiell in verschiedenen Formen hergestellt werden. Besonders günstig ist jedoch die Linsenform, die sich ergibt, wenn die Polyvinylalkohol-Lösung auf eine Kunststoffoberfläche aufgetropft wird und die Gelierung nach dem beschriebenen Verfahren abläuft. Die Linsenform mit einem großen Durchmesser und der geringen Höhe bewirkt, dass die immobilisierten Substanzen immer nah an der Oberfläche lokalisiert sind, dass also die Diffusionswege im Vergleich zur Kugelform sehr kurz sind.

In der das Verfahren beschreibenden Patentschrift (Vorlop und Jekel, 2000) sind verschiedene Anwendungen für nach diesem Verfahren hergestellte Gelkörper genannt. So können z.B. Wirkstoffe wie Heparin immobilisiert und bei Langzeitapplikation kontinuierlich aus dem Gel abgegeben werden. Außerdem lassen sich Chromatographiemedien herstellen, und auch die Immobilisierung von Mikroorganismen (eine Mischkultur aus *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi*) wurde beschrieben (Jekel et al., 1998).

Unter den Produktnamen LentiKats<sup>®</sup> und LentiKat<sup>®</sup>Printer (siehe Abbildung 4-20) werden von der Firma GeniaLab GmbH fertige PVA-Lösungen und ein Gerät zur Herstellung größerer Mengen der linsenförmigen PVA-Gelkörper vertrieben.



**Abbildung 4-20:** LentiKat<sup>®</sup>Printer. Teil A zeigt den Printer betriebsbereit. In Teil B ist der Druckkopf (2) demontiert.

Die Funktionsweise des LentiKat<sup>®</sup>Printers ergibt sich wie folgt: Durch Eintauchen des Druckkopfes (2) in die Polymerlösung bleiben an den über 400 Drähten des Druckkopfes kleine Portionen der Polymerlösung zurück. Die Menge des anhaftenden Polymers hängt dabei von zwei Faktoren ab: Von der Eintauchtiefe des Drahtes in die Polymerlösung und von der Geschwindigkeit, mit der der Druckkopf aus der Polymerlösung entfernt wird. Je schneller der Druckkopf nach oben bewegt wird, desto größer wird der Tropfen der anhaftenden Polymerlösung. Der Druckkopf (2) wird dann soweit auf eine Petrischale (3) abgesenkt, dass die Drähte die Oberfläche berühren. Anschließend wird der Druckkopf langsam wieder angehoben. Auf der Petrischale verbleiben dann mehr als 400 LentiKats<sup>®</sup> mit reproduzierbaren Eigenschaften.

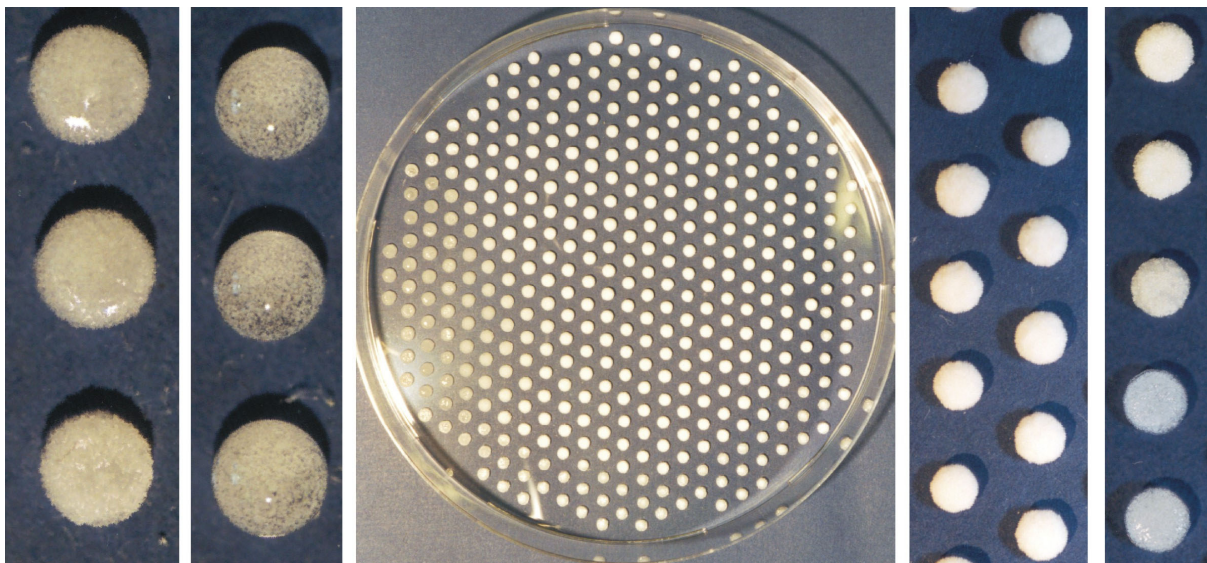
#### 4.2.3.1 Untersuchungen zur Immobilisierung von Calciumsulfit in LentiKats<sup>®</sup>

Die Immobilisierung schwer löslicher Sulfitpezies in PVA-Perlen wurde zuerst am Beispiel von Calciumsulfit untersucht.

Hierzu wurden jeweils 100 mL einer 2M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und einer 2M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung gemischt. Das weiße Präzipitat von Calciumsulfit wurde zunächst mit 500 mL bidest. H<sub>2</sub>O und dann mit 100 mL Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde dann im Vakuum getrocknet. Es wurden 27,44 g CaSO<sub>3</sub> erhalten. Davon wurden 12,5 g in 15 mL bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und in 128 g verflüssigte und auf ca. 30°C abgekühlte LentiKat<sup>®</sup>-Liquid eingerührt. Mit Hilfe

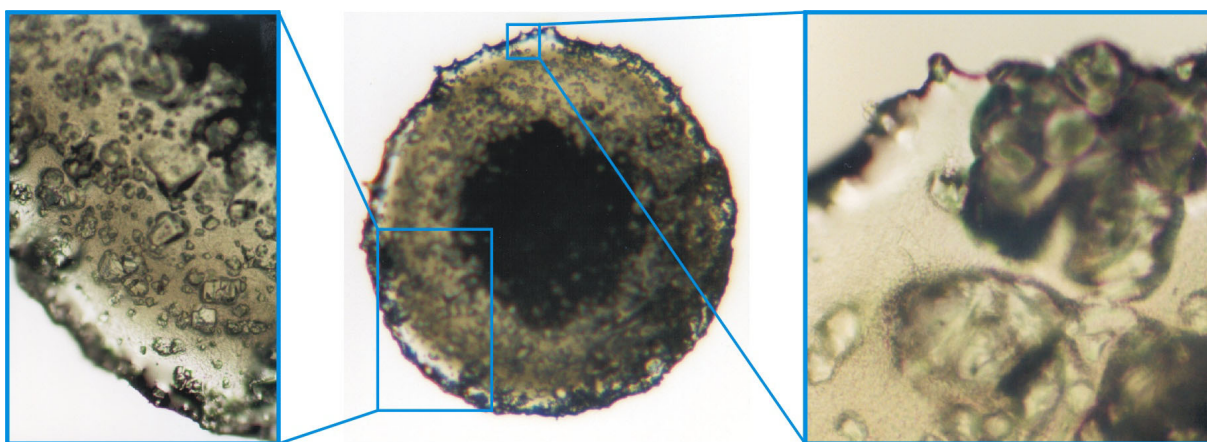
des oben beschriebenen LentiKat<sup>®</sup>-Printers wurden dann LentiKats<sup>®</sup> mit Calciumsulfit auf Polypropylen-Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm (Fa. Greiner Labortechnik) gedruckt. Die Trocknung erfolgte an der Raumluft.

Der Calciumsulfitgehalt der fertigen LentiKats<sup>®</sup> betrug 34%, bezogen auf die Trockenmasse. Abbildung 4-21 zeigt in der Mitte eine bedruckte Polypropylen-Petrischale. Die Ausschnitte rechts und links daneben zeigen Calciumsulfit-LentiKats<sup>®</sup> in verschiedenen Trocknungsstadien.



**Abbildung 4-21:** LentiKats<sup>®</sup> mit Calciumsulfit. Das mittlere Bild zeigt eine mit dem LentiKat Printer<sup>®</sup> bedruckte Petrischale. Rechts und links sind einzelne LentiKats<sup>®</sup> mit unterschiedlichen Trocknungsgraden abgebildet.

Abbildung 4-22 zeigt Mikroskopaufnahmen einer Calciumsulfit-PVA-Perle mit geringerer Beladung und veranschaulicht die Gestalt des Immobilisats.



**Abbildung 4-22:** LentiKat<sup>®</sup> von Calciumsulfit mit geringerer Beladung. Mikroskopaufnahmen mit Vergrößerung 10x (mittleres Bild) und 20x (linkes und rechtes Bild).

Abbildung 4-23 schließlich gibt eine Vorstellung von der Größe der getrockneten Calciumsulfid-LentiKats<sup>®</sup>. Wie die eingezeichnete Skala zeigt, haben die PVA-Perlen einen Durchmesser von ungefähr drei Millimetern.



Abbildung 4-23: LentiKats<sup>®</sup> mit Calciumsulfid. Größenvergleich.

Zur Überprüfung des Verlaufs der Sulfitkonzentration wurde ein Schüttelkolbenversuch mit CaSO<sub>3</sub>-LentiKats<sup>®</sup> in bidest. H<sub>2</sub>O durchgeführt.

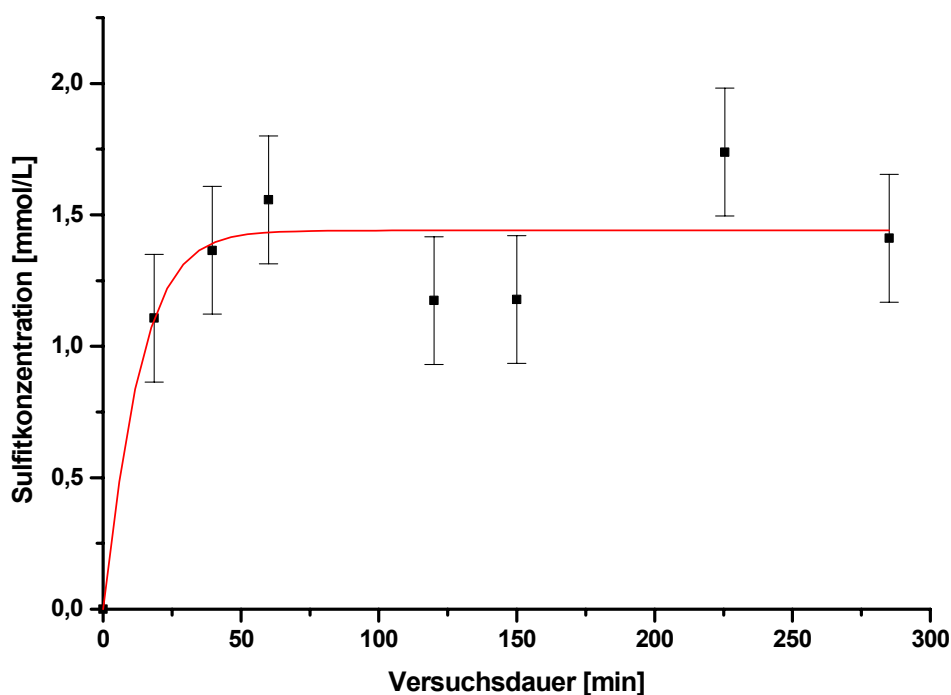
Hierzu wurden 1,002 g der calciumsulfidhaltigen LentiKats<sup>®</sup> eingewogen und mit je 30 mL bidest. H<sub>2</sub>O zweimal je 20 Minuten geschüttelt, um außen anhaftende CaSO<sub>3</sub>-Kristalle abzuwaschen. Die LentiKats<sup>®</sup> wurden dann vom Wasser abzentrifugiert (in einem Wascheinsatz für 50 mL Falcon-Zentrifugen-Röhrchen, Eigenbau) und in einen 300 mL Kulturkolben, der 50 mL vortemperiertes bidest. H<sub>2</sub>O enthielt, überführt. Der Kolben wurde dann bei 26°C und 120 rpm auf einem Rundschüttler Certomat S-II geschüttelt. Es wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, mit Hilfe eines 0,22 µm Celluloseacetat-Membranfilters (Membrex 25) filtriert und direkt mittels Kapillarelektrophorese vermessen.

CE-Parameter<sup>6</sup>:

<b>Elektrolyt:</b> 50 mM Phthalat-Puffer + 1,1 mM CTAB	<b>Kapillare:</b> Ø 50 µm, 50 cm Trennstrecke
<b>Probenaufbewahrung:</b> 4°C	<b>Spannung:</b> -20 kV
<b>Kapillarentemperatur:</b> 10°C	<b>UV-Detektion:</b> 254 nm
	<b>Injektion:</b> 0,5 psi, 5 s

Abbildung 4-24 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Sulfitkonzentration im Überstand.

<sup>6</sup> Informationen zur Methodenentwicklung für die Kapillarelektrophorese finden sich in Anhang 7.6.



**Abbildung 4-24:** Zeitlicher Verlauf der Sulfitkonzentration im Überstand. Schüttelversuch mit 1,002 g sulfitbeladener LentiKats<sup>®</sup> in 50 mL bidest. H<sub>2</sub>O bei 26°C und 120 rpm. Die eingezeichneten Fehlerbalken zeigen den maximalen Fehler (0,243 mmol/L). Die rote Kurve ergibt sich aus einem angenommenen sigmoidalen Verlauf.

Die Sulfitkonzentration steigt anfangs –erwartungsgemäß– an, zeigt jedoch im weiteren Verlauf größere Schwankungen um einen Wert von ca. 1,45 mmol/L. Der Schwankungsbereich ist dabei größer, als der maximale Fehler der Einzelmessungen erwarten lässt. Es stellt sich entweder kein konstanter Wert für die Sulfitkonzentration ein, oder –was wahrscheinlicher ist– die CE-Methode ist für die Sulfitanalytik nur bedingt geeignet. Wie die Daten in Anhang 7.6.1.3 zeigen, spielen insbesondere zeitliche Schwankungen zwischen Probenahme und Messung eine wichtige Rolle und können zu Schwankungen in den Messwerten führen.

Wichtiger für eine Umsetzung des Konzepts ist die Anwendbarkeit des Verfahrens in Schüttelkulturen. Um die Reproduzierbarkeit zu untersuchen, wurden in zwei Versuchsreihen jeweils 4 Schüttelkolben parallel beimpft und verfolgt. In der einen Versuchsreihe wurden nicht-stabilisierte Calciumsulfit-LentiKats<sup>®</sup> eingesetzt und in der anderen Versuchsreihe wurden die LentiKats<sup>®</sup> vor dem Einsatz in Schüttelkulturen lt. Vorschrift in der LentiKat<sup>®</sup>-Stabilizer Lösung stabilisiert.

Die Calciumsulfit-LentiKats<sup>®</sup> wurden hergestellt wie oben beschrieben. Pro Ansatz wurden jeweils 2 g eingewogen. Von den insgesamt 8 Portionen wurden vier in jeweils 35 mL

LentiKat<sup>®</sup>-Stabilizer-Lösung für ca. 1h geschüttelt. Die LentiKats<sup>®</sup> wurden dann abzentrifugiert und zweimal mit jeweils 35 mL bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen.

In acht 300 mL Kulturkolben wurden dann jeweils 50 mL steriles Medium (MB50+EDTA+HEPES, siehe Anhang 7.1.2) vorgelegt. Die Kolben wurden dann mit den zuvor abgewogenen LentiKat<sup>®</sup>-Portionen versetzt und bei 26°C und 120 rpm ca. 6h geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde mit einer Anfangszellzahl von 10<sup>7</sup> Zellen pro Milliliter beimpft.

Die Messung der Optischen Dichte erfolgte bei 430 nm wie in Anhang 7.4.4 beschrieben. Der Zellaufschluss und die Bestimmung der Volumenaktivitäten erfolgte nach Abschnitt 5.3.2 bzw. Anhang 7.2.2 und der Proteingehalt wurde mit dem Micro BCA-Test (Pierce, siehe Anhang 7.3.1) bestimmt.

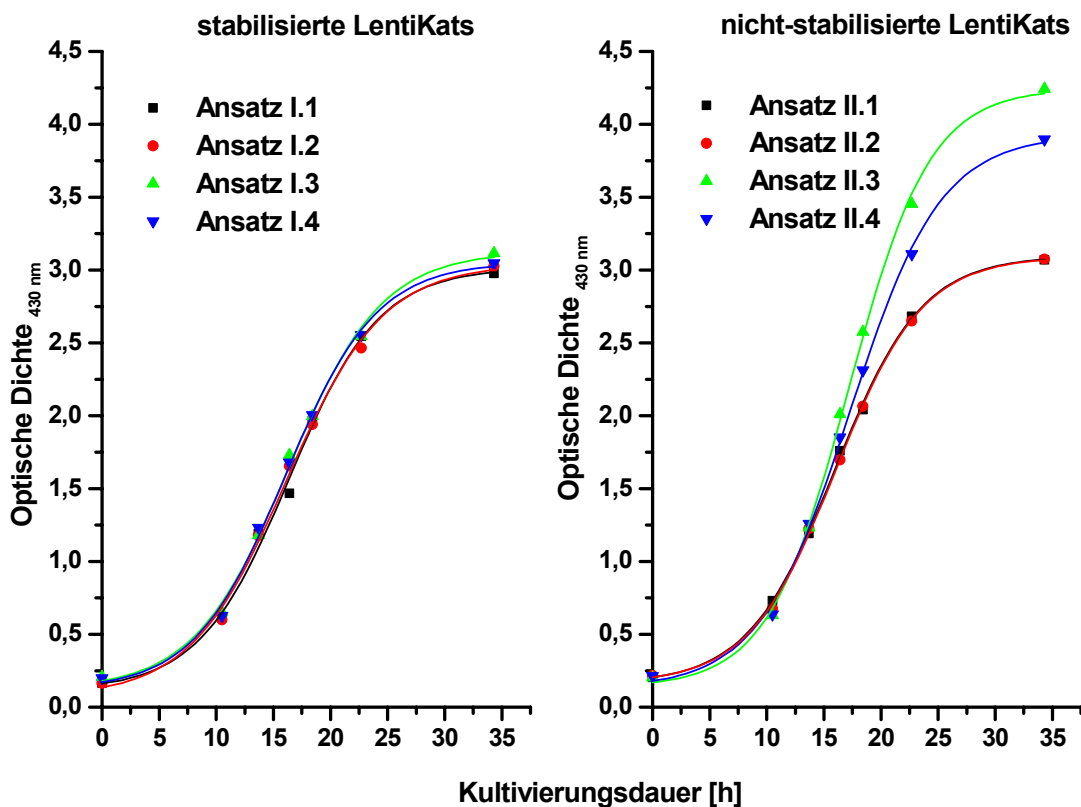
In Abbildung 4-25 sind die Wachstumskurven der Schüttelkulturen mit stabilisierten LentiKats<sup>®</sup> denen mit unstabilisierten gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass die Wachstumskurven in der Versuchsreihe mit stabilisierten LentiKats<sup>®</sup> wesentlich gleichmäßiger und reproduzierbarer verlaufen als in der Versuchsreihe mit den nicht stabilisierten LentiKats<sup>®</sup>.

Ein Vergleich der spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten zeigt jedoch, dass diese auch innerhalb der einzelnen Messreihen sehr deutlich schwanken (Tab. 4-17).

**Tabelle 4-17:** Wachstumsverhalten von *S. pontiacus* in Schüttelkulturen mit Calciumsulfit-LentiKats<sup>®</sup>.

	<b>Generationszeit</b>	<b>Biotrockenmasse</b>	<b>Spezifische Aktivität</b>
	<b>[h]</b>	<b>[g/L]</b>	<b>[U/mg]</b>
<i>Stabilisierte LentiKats<sup>®</sup>:</i>			
I.1	5,6	0,468	2,2
I.2	5,9	0,471	0,9
I.3	6,0	0,485	1,9
I.4	5,9	0,475	0,6
<i>Nicht-stabilisierte LentiKats<sup>®</sup>:</i>			
II.1	5,1	0,482	2,0
II.2	6,1	0,482	1,6
II.3	5,1	0,662	2,2
II.4	5,7	0,609	1,8

Trotz des reproduzierbareren Wachstumsverhaltens bei den stabilisierten LentiKats<sup>®</sup> schwanken hier die spezifischen Enzymaktivitäten doch wesentlich stärker als in der Versuchsreihe mit den nicht-stabilisierten LentiKats<sup>®</sup>.



**Abbildung 4-25:** Wachstumsverhalten von *S. pontiacus* in Schüttelkulturen mit Sulfitzufütterung über in LentiKats<sup>®</sup> immobilisiertes Calciumsulfid. Die linke Seite zeigt Kulturen mit stabilisierten LentiKats<sup>®</sup>, die rechte Seite zeigt Kulturen mit nicht-stabilisierten LentiKats<sup>®</sup>.

Die Stabilisierung der LentiKats<sup>®</sup> hat offensichtlich einen sehr großen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Dies könnte darin begründet liegen, dass Freisetzung einzelner CaSO<sub>3</sub>-Kristalle in den stabilisierten Gelen deutlich reduziert wird, dass also Sulfid wirklich nur gelöst und durch Diffusion aus den LentiKats<sup>®</sup> austritt, während aus den nicht stabilisierten Gelen wahrscheinlich auch ganze Kristalle austreten.

Eine eingehendere Untersuchung dieses Ansatzes zur kontinuierlichen Versorgung der *S. pontiacus* Kulturen sollte also insbesondere den Aspekt der Stabilisierung der LentiKats<sup>®</sup> intensiver verfolgen.

#### 4.2.3.2 Untersuchungen zur Immobilisierung von Magnesiumsulfit in LentiKats®

Neben der Sulfitversorgung mit in LentiKats® immobilisiertem CaSO<sub>3</sub> wurde derselbe Ansatz mit immobilisiertem Magnesiumsulfit untersucht. Hierzu wurde durch Vereinigung von jeweils 250 mL einer 4M Magnesiumchlorid-Lösung mit einer 2M Natriumsulfit-Lösung Magnesiumsulfit ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 90 mL destilliertem Wasser aufgeschlämmt und in 150 mL LentiKat®-Liquid eingerührt. Mit Hilfe des LentiKat®-Printers wurden, wie unter 4.2.3.1 beschrieben, Magnesiumsulfit-LentiKats® mit einem Durchmesser von ca. 3 mm hergestellt. Die Perlen wurden 2 Tage an der Raumluft getrocknet.

Ein Teil der MgSO<sub>3</sub>-LentiKats® wurde in der Stabiliser-Lösung stabilisiert, der andere Teil wurde direkt unstabilisiert eingesetzt.

Zur Überprüfung der Einsetzbarkeit der Immobilisate in *S. pontiacus* Kulturen wurden, gemäß dem in nachfolgender Tabelle beschriebenen Schema, beimpfte 300 mL Kulturkolben (MB50+EDTA+HEPES,  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL) mit MgSO<sub>3</sub>-LentiKats® versetzt.

**Tabelle 4-18:** Untersuchungen zum Einsatz von immobilisiertem MgSO<sub>3</sub>.

Ansatz	Einwaage MgSO <sub>3</sub> -LentiKats®	Stabilisierung	Wachstum
2 I	2 g	Ja	Nein
2 II	2 g	Ja	Nein
2 III	2 g	Nein	Nein
2 IV	2 g	Nein	Nein
3 I	3 g	Ja	Nein
3 II	3 g	Nein	Nein
3 III	3 g	Nein	Nein
4 I	4 g	Ja	Nein
4 II	4 g	Nein	Nein
4 III	4 g	Nein	Nein

Wie Tabelle 4-18 zeigt, wurden verschiedene Einwaagen an MgSO<sub>3</sub>-LentiKats® untersucht. Weiterhin wurde, basierend auf den Erfahrungen mit den CaSO<sub>3</sub>-LentiKats®, auch der Parameter „Stabilisierung“ untersucht. Aus der Tabelle ist jedoch ersichtlich, dass unter allen untersuchten Bedingungen trotz der relativ hohen Anfangszelldichte kein weiteres Wachstum zu beobachten war. Offensichtlich stellen sich im Kultivierungsmedium deutlich zu hohe Sulfit-Konzentrationen ein. Infolgedessen wird das Wachstum von *S. pontiacus* unterbunden. Eine Sulfitversorgung von *S. pontiacus* Kulturen mit immobilisiertem Magnesiumsulfit ist deshalb nicht praktikabel.



#### 4.2.4 Fazit

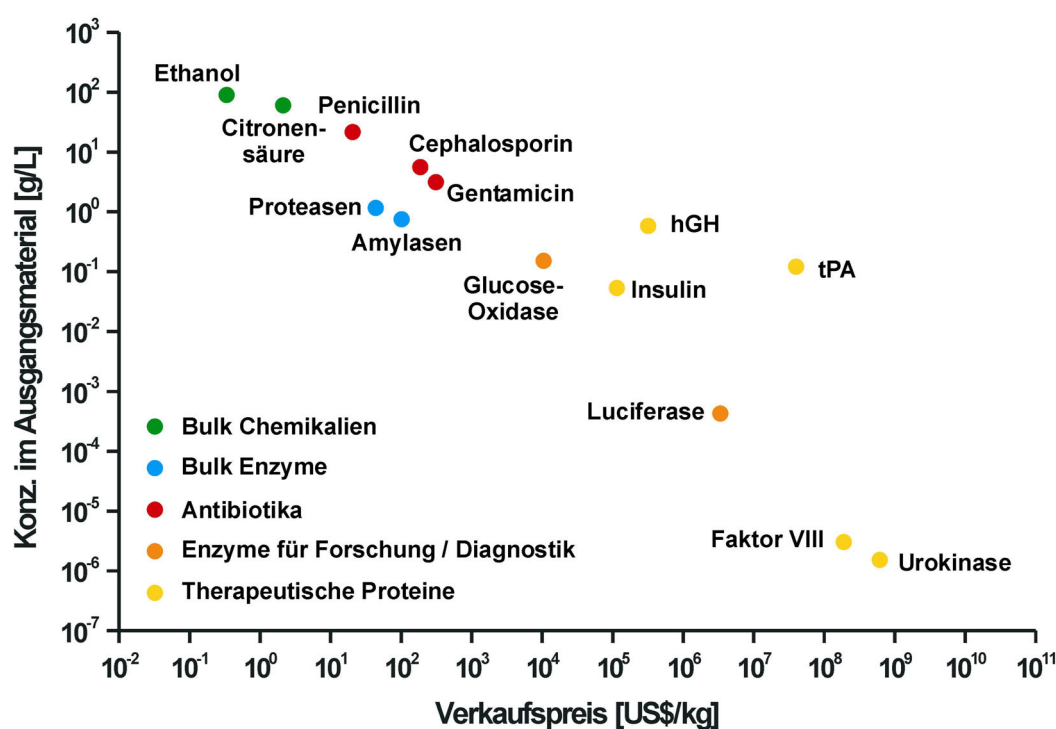
Es konnte gezeigt werden, dass der Ansatz, eine dauerhafte Sulfid-Versorgung der Kulturen durch Zugabe immobilisierter Sulfid-Spezies zu gewährleisten, durchaus ein praktikabler Weg ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Alginat als Immobilisierungsmatrix ungeeignet ist, da bei den in marinen Medien herrschenden Salzgehalten eine Auflösung der Alginatperlen zu beobachten ist.

Vielversprechendere Ergebnisse wurden mit Polyvinylalkohol als Immobilisierungsmatrix erreicht. Wenn auch die Reproduzierbarkeit unter den bisher untersuchten Bedingungen nicht befriedigend war, so konnten doch Schüttelkulturen durchgeführt werden, aus denen aktive Biomasse erhalten wurde. Es wurde allerdings auch nachgewiesen, dass der Einsatz stabilisierter  $\text{CaSO}_3$ -LentiKats<sup>®</sup> zu anderen Ergebnissen führt als der Einsatz nicht-stabilisierter LentiKats<sup>®</sup>. Hier besteht also noch Bedarf für eingehendere Untersuchungen. Der Einsatz von  $\text{MgSO}_3$  als immobilisierter Sulfid-Spezies führt dagegen zu derart hohen Sulfidkonzentrationen im Kultivierungsmedium, dass ein Wachstum von *S. pontiacus* unterblieb. Es konnte somit eindeutig nachgewiesen werden, dass  $\text{MgSO}_3$  für die hier beschriebene Anwendung ungeeignet ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode Potential für zukünftige Anwendungen hat, allerdings noch eingehender untersucht werden müsste, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen. Eine zusätzliche Betrachtung anderer Immobilisierungsverfahren könnte außerdem zu weiteren Erkenntnissen führen.

## 5 Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus*

An den Fermentationsprozess schließt sich in der Regel der Prozess der Produktaufreinigung an. Die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe bestimmt wesentlich die Effektivität des gesamten Bioprozesses und verursacht nicht selten 80-90% der Gesamtkosten (Doran, 1995). Von entscheidender Bedeutung für die Effektivität des Aufreinigungsprozesses ist die Konzentration des Produktes im Ausgangsmaterial. Abbildung 5-1 gibt für verschiedene biotechnologisch hergestellte Produkte einen Überblick über den Zusammenhang zwischen Verkaufspreis, der im Wesentlichen durch die Produktionskosten bestimmt wird, und Produktkonzentration im Ausgangsmaterial.



**Abbildung 5-1:** Zusammenhang zwischen dem Verkaufspreis und der Konzentration des Produktes im Ausgangsmaterial für verschiedene biotechnologisch hergestellte Produkte (nach Doran, 1995).

Je geringer die Konzentration des Produktes im Ausgangsmaterial, desto höher sind die Kosten, die der Aufreinigungsprozess verursacht. Für Aufreinigungsprozesse, die mehrere Schritte umfassen, sind weiterhin die Ausbeuten auf den einzelnen Stufen des Gesamtprozesses von entscheidender Bedeutung: Je geringer die Ausbeuten der einzelnen Stufen, desto geringer ist natürlich auch die Ausbeute des Gesamtprozesses. Abbildung 5-2 verdeutlicht den Zusammenhang. Schon bei einer Ausbeute von 80% für jeden einzelnen

Aufreinigungsschritt reduziert sich die Gesamtausbeute nach fünf Stufen auf nur noch 33% und bei acht<sup>1</sup> Stufen sogar nur noch auf 17%.

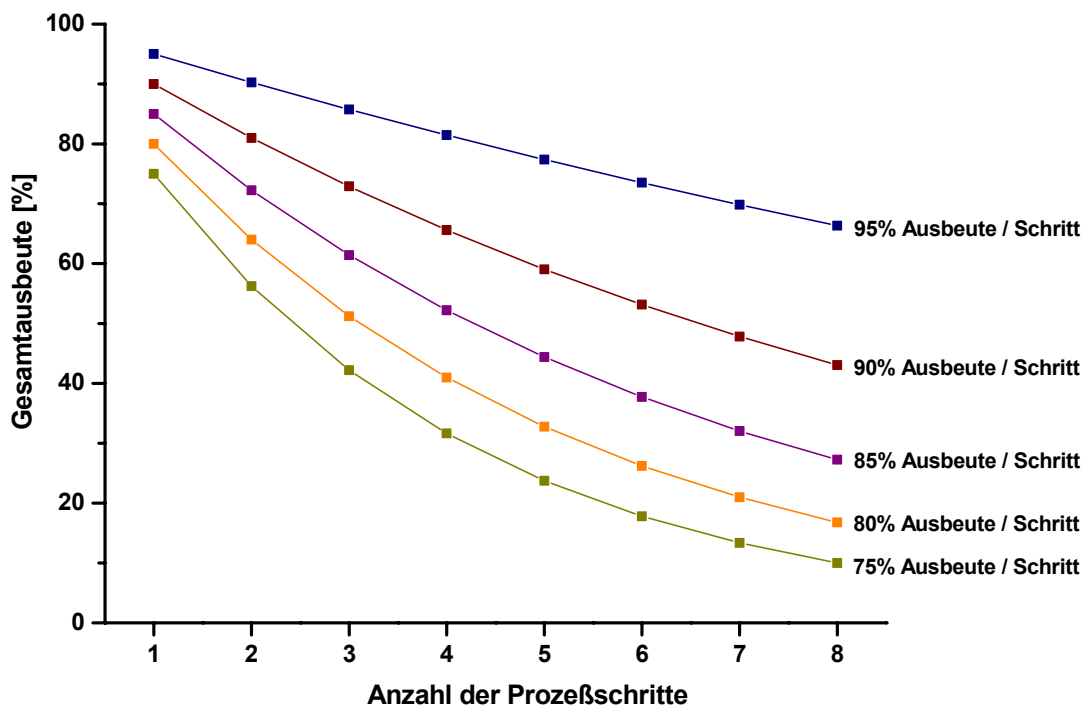


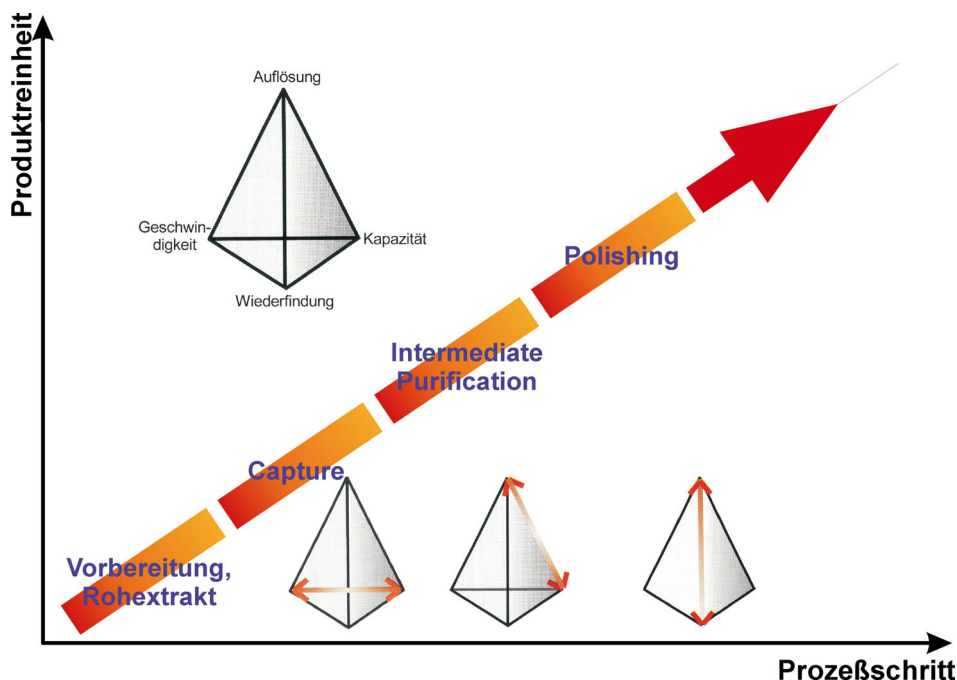
Abbildung 5-2: Gesamtausbeute bei mehrstufigen Aufreinigungsprozessen.

Zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten sollte der Aufreinigungsprozess deshalb in möglichst wenigen und sinnvoll aufeinander abgestimmten Schritten zur gewünschten Produktreinheit führen. In der einschlägigen Literatur wird für die chromatographische Aufreinigung von Proteinen oft eine Strategie vorgeschlagen, die nach der Gewinnung des Ausgangsmaterials drei Phasen umfasst (Amersham Pharmacia, 2001). In der ersten Phase, der *Capture* Phase, sollte das Protein aufkonzentriert und stabilisiert werden. Für fermentativ gewonnene Proteine heißt das zum Beispiel, dass in dieser Phase möglichst Proteasen abgetrennt werden sollten. Eine Abwägung zwischen den Parametern

- Auflösung,
- Wiederfindung des Proteins,
- Geschwindigkeit des Prozessschrittes und
- Kapazität des Prozessschrittes für das Zielprotein

<sup>1</sup> Diese Anzahl an Prozessstufen erscheint sehr hoch, wird aber, z.B. bei der Aufreinigung therapeutischer Proteine aus Zellkulturüberständen, durchaus erreicht.

fällt in dieser Prozessphase meist zu Gunsten der Geschwindigkeit und der Kapazität für das Zielprotein aus (Abbildung 5-3).



**Abbildung 5-3:** Drei-Phasen-Strategie zur chromatographischen Aufreinigung von Proteinen (nach Amersham Pharmacia, 2001).

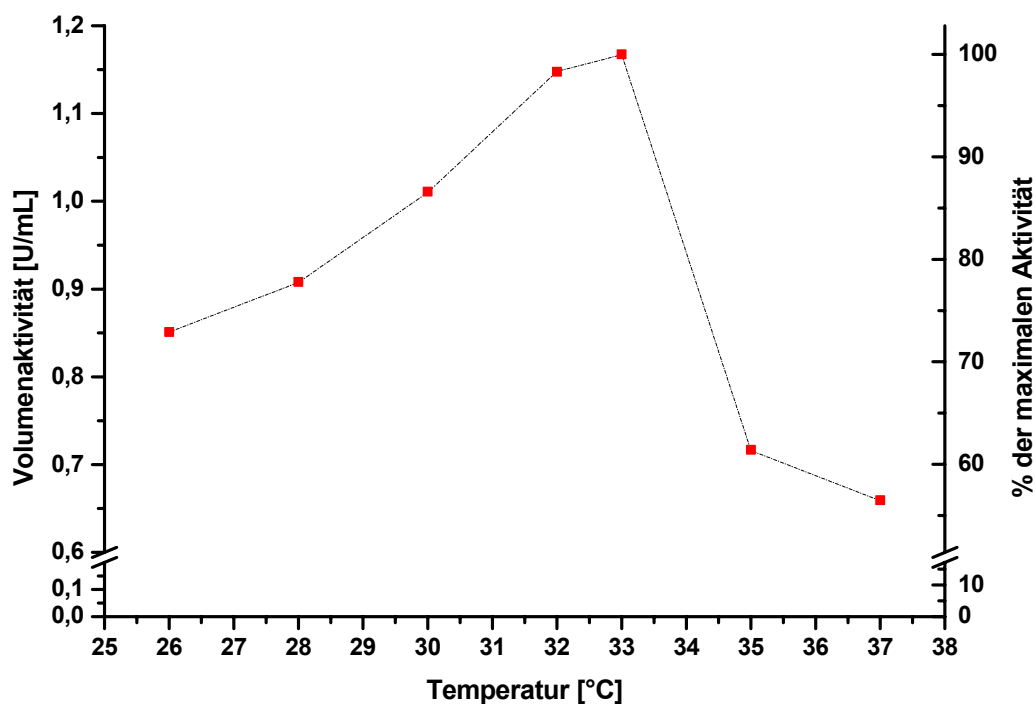
Eine hohe Geschwindigkeit in dieser Phase bewirkt eine schnelle Abtrennung des Zielproteins von produktzerstörenden Proteasen, und eine hohe Kapazität für das Zielprotein ermöglicht eine schnelle und effektive Aufkonzentrierung des Proteins. Die Phase der *Intermediate Purification* soll das Produkt dann möglichst schon auf die benötigte Reinheit bringen und die meisten Verunreinigungen abtrennen. In dieser Phase tritt der Parameter Auflösung in den Vordergrund. Eine hohe Auflösung bei gleichzeitig hoher Kapazität für das Zielprotein ermöglicht eine gute Abtrennung der Verunreinigungen. Sollte die gewünschte Verwendung des Zielproteins eine sehr hohe Reinheit erfordern, so schließt sich noch die Phase des *Polishing* an. In dieser Phase sind die meisten Verunreinigungen bereits abgetrennt, und es sind nur noch Spurenverunreinigungen und Proteine mit dem Zielprotein sehr ähnlichen Eigenschaften, wie z.B. Aggregate des Zielproteins, vorhanden. Für therapeutische Proteine, die an Patienten verabreicht werden sollen, ist ein Polishing immer erforderlich. Bei Proteinen, die für analytische, bzw. diagnostische Zwecke eingesetzt werden, wie z.B. Antikörpern für ELISA-Testkits<sup>2</sup>, kann auf diesen Schritt hingegen meist verzichtet werden.

<sup>2</sup> ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

## 5.1 Voruntersuchungen

Im Vorfeld einer Enzymaufreinigung sollte, neben der Etablierung eines Assayverfahrens zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität (siehe hierzu Anhang 7.2), auch eine grobe Untersuchung zur Stabilität des Enzyms erfolgen. Diese dient hauptsächlich dazu, einen Arbeitsbereich bezüglich der Temperatur und des pH-Wertes abzugrenzen, um während der eigentlichen Aufreinigung Verluste an Enzymaktivität zu vermeiden. Außerdem sollte ein Temperaturoptimum für den Enzymassay gefunden werden.

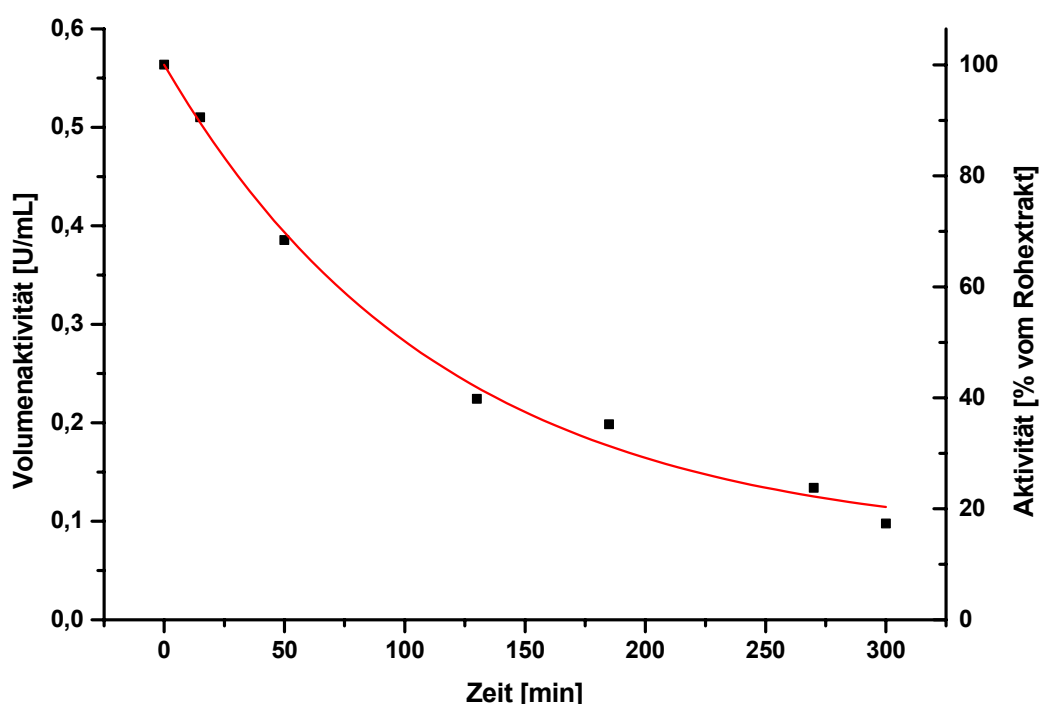
Für die Ermittlung des Temperaturoptimums wurde mit der in Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Methode ein Rohextrakt in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, hergestellt. Mit diesem wurden die Volumenaktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-4 aufgetragen.



**Abbildung 5-4:** Volumenaktivität von *S. pontiacus* Sulfitoxidase in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Messung wurde bei pH 7,5 unter den Standardbedingungen (siehe Anhang 7.2.2) durchgeführt. Der Rohextrakt wurde durch einen Standard-Ultraschallaufschluss, wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben, gewonnen.

Die Darstellung zeigt, dass die maximale Enzymaktivität bei 33°C erreicht wurde. Weiterhin wird deutlich, dass die Enzymaktivität bei Temperaturen über 35°C deutlich absinkt. Um während der Enzymaufreinigung Schädigungen der Sulfitoxidase auszuschließen, sollten Temperaturen über 35°C also vermieden werden.

Ein weiterer wichtiger Parameter für den Aufreinigungserfolg ist die Stabilität des Enzyms im Rohextrakt. Um eine Abschätzung der Langzeitstabilität der Sulfitoxidase zu ermöglichen, wurde ein Rohextrakt in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, hergestellt und bei Raumtemperatur (20°C) über einen Zeitraum von fünf Stunden aufbewahrt. Insgesamt sieben Mal innerhalb dieser fünf Stunden wurde eine Aktivitätsmessung durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Volumenaktivität bereits nach ca. 90 Minuten auf einen Wert von 50% und nach fünf Stunden sogar nur auf einen Wert von 20% der ursprünglichen Aktivität abgesunken war. Abbildung 5-5 gibt einen Überblick.



**Abbildung 5-5:** Entwicklung der Volumenaktivität in Abhängigkeit von der Zeit in einem Rohextrakt in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei Raumtemperatur.

Um eine möglichst schonende Aufreinigung des Enzyms zu bewerkstelligen, sollten also zumindest die ersten Aufreinigungsschritte bei niedrigeren Temperaturen oder unter Bedingungen durchgeführt werden, die die vermutete Protease-Aktivität unterbinden.

Geeignete Lagerbedingungen für den Rohextrakt wurden bereits früher in Vorversuchen etabliert (siehe auch Hanke, 1999). Es wurde ermittelt, dass bei einer Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nach mehreren Tagen bzw. bei einer Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  auch nach einem Monat keine Aktivitätsverluste auftraten.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurde die Stabilität des Enzyms über einen größeren pH-Bereich ermittelt. Hierzu wurden Suspensionen gleicher Zusammensetzung von *S. pontiacus* Biomasse in Puffern des jeweiligen pH-Wertes

hergestellt und nach der in Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Methodik mit Ultraschall aufgeschlossen. Im Bereich von pH 3,8 – 5,4 wurde mit 50 mM Acetat-Puffer und im pH-Bereich von 7,4 – 9,0 mit 50 mM Tris-HCl-Puffer gearbeitet.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität beim jeweiligen pH-Wert wurden auch die Assay-Reagenzien mit den jeweiligen Puffern angesetzt. Um jedoch auszuschließen, dass die geringe Stabilität des Sulfite-Ions im sauren pH-Bereich zu Verfälschungen der Ergebnisse führt, wurden die „sauren“ Rohextrakte zusätzlich mit dem Standard-Enzymassay (siehe Anhang 7.2.2) vermessen.

**Tabelle 5-1:** Volumenaktivitäten im *S. pontiacus* Rohextrakt bei verschiedenen pH-Werten.

Aufschlussbedingungen und Messbedingungen		Volumenaktivität
pH Aufschluss	pH Enzymassay	[U/mL]
3,8	3,8	Keine Aktivität
3,8	7,5	Keine Aktivität
4,2	4,2	Keine Aktivität
4,2	7,5	Keine Aktivität
4,6	4,6	0,68
4,6	7,5	1,15
5,0	5,0	1,44
5,0	7,5	1,22
5,4	5,4	1,18
5,4	7,5	1,10
7,4	7,4	1,03
7,8	7,8	1,03
8,2	8,2	0,98
8,6	8,6	0,65
9,0	9,0	0,18

Wie Tabelle 5-1 zeigt, wurde unterhalb von pH 4,6 keine Aktivität mehr festgestellt. Auch im basischen Bereich konnte über pH 8,2 ein deutliches Absinken der Volumenaktivität beobachtet werden. Das „Stabilitätsfenster“ bezüglich des pH-Wertes wird also im sauren Bereich durch einen pH-Wert von 4,6 und im basischen Bereich durch einen pH-Wert im Bereich von pH 8,5 bis pH 9,0 begrenzt.

In den nun folgenden Abschnitten werden Ergebnisse aus Untersuchungen zur Aufreinigung des Enzyms Sulfiteoxidase vorgestellt. Die verschiedenen Phasen der Aufreinigung, beginnend mit der Abtrennung der Zellen vom Kultivierungsmedium und dem Aufschluss der Zellen, werden dabei einzeln betrachtet.

## 5.2 Abtrennung der Biomasse vom Kultivierungsmedium

In aller Regel erfolgt als erster Schritt eine Trennung der Biomasse vom Kultivierungsmedium, unabhängig davon, ob es sich um ein intrazelluläres oder ein im Medium akkumuliertes Produkt handelt. Die Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* ist ein nicht-membrangebundenes Enzym und ist intrazellulär lokalisiert, so dass das Kultivierungsmedium nach der Fest-Flüssig-Trennung verworfen werden konnte.

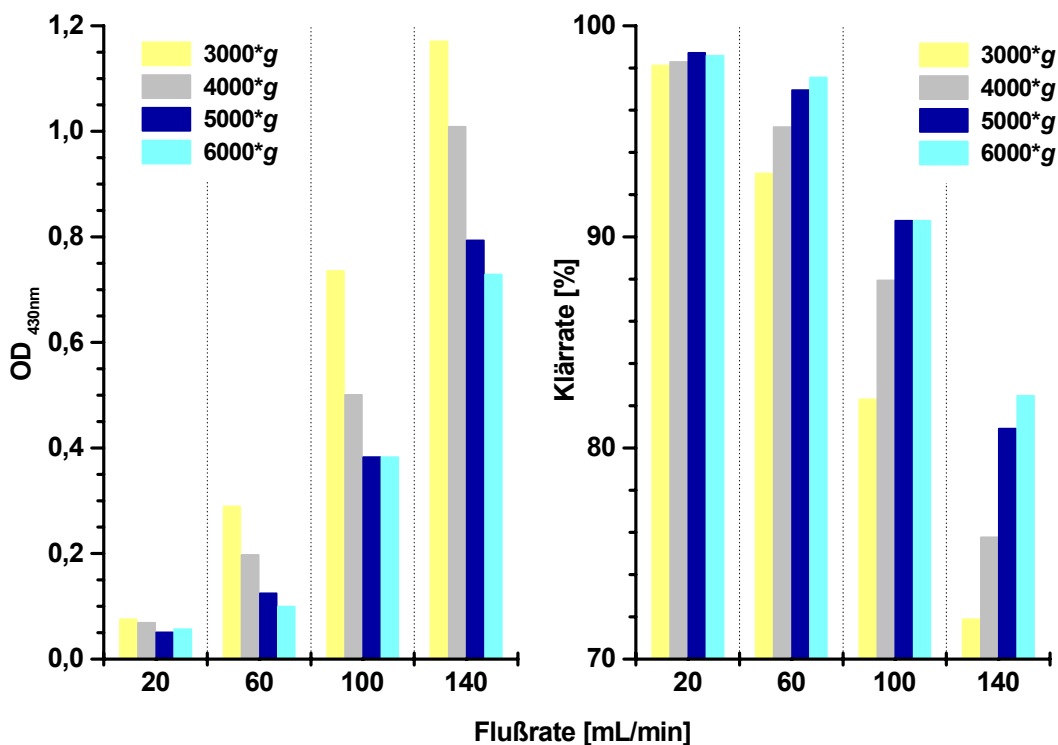
Bei kleineren Ansätzen, wie z.B. bei Schüttelkulturen, erfolgte die Gewinnung der Biomasse diskontinuierlich durch einfache Zentrifugation. Verwendet wurde dabei eine Laborkühlzentrifuge Sigma 3K20 mit dem Rotor 12158 (Fa. B. Braun). Zentrifugiert wurde in 30 mL Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Centrifuge Tubes, PC, Fa. Nalgene Nunc) bei 4°C mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 6.000 g. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Menge an Biomasse und lag zwischen 10 und 20 Minuten. Mit diesen Parametern konnte eine gute Abtrennung der Biomasse erreicht werden, ohne dass die Zellen zerstört wurden oder sich das Zellpellet nicht wieder resuspendieren ließ.

Größere Mengen an Kulturbrühe, wie sie aus Fermenterkultivierungen im 10 Liter-Maßstab resultierten, erforderten jedoch zur Zellabtrennung den Einsatz eines kontinuierlichen Verfahrens. Die Gewinnung der Biomasse aus der Kulturbrühe sollte in diesem Fall durch Zentrifugation in einer kontinuierlich betriebenen Zentrifuge erfolgen. Eingesetzt wurde eine Biofuge 28 RS (Fa. Heraeus Sepatech) mit einem Titandurchflussrotor 8575.

Um eine optimale Zellabtrennung zu gewährleisten, mussten die Parameter „Pumprate“ – und damit die Verweilzeit im Zentrifugenrotor – und „Zentrifugalbeschleunigung“ optimiert werden. Dabei war besonders zu beachten, dass einerseits ein möglichst optimaler Klärgrad erreicht werden sollte, um in möglichst kurzer Zeit eine hinreichend große Menge an Biomasse abzutrennen. Andererseits sollte aber auch eine größere Beanspruchung der Zellen verhindert werden, da andernfalls Zellen hätten zerstört werden können, was zum Verlust von Enzymaktivität geführt hätte. Da beim verwendeten Rotortyp nur eine diskontinuierliche Gewinnung der Biomasse möglich war, da also die abzentrifugierte Biomasse im Rotor verblieb und damit für die Dauer des Prozesses der Zentrifugalkraft ausgesetzt war, musste außerdem ein Kompromiss aus hoher Klärrate und kurzer Prozesszeit gefunden werden.

Mit der Kultivierungsbrühe einer Biostat C-Kultivierung wurden deshalb Optimierungsversuche durchgeführt. Die Kultivierungsbrühe wurde in einem Kühlraum auf 4°C vorgekühlt und dann mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Easy-Load, Masterflex) unter Rühren (Magnetrührer Biodrive, Fa. Braun) in die ebenfalls auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge gepumpt. Im Verlauf des Versuches wurden sowohl die Pumprate als auch die Zentrifugalbeschleunigung variiert. Abbildung 5-6 gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse.





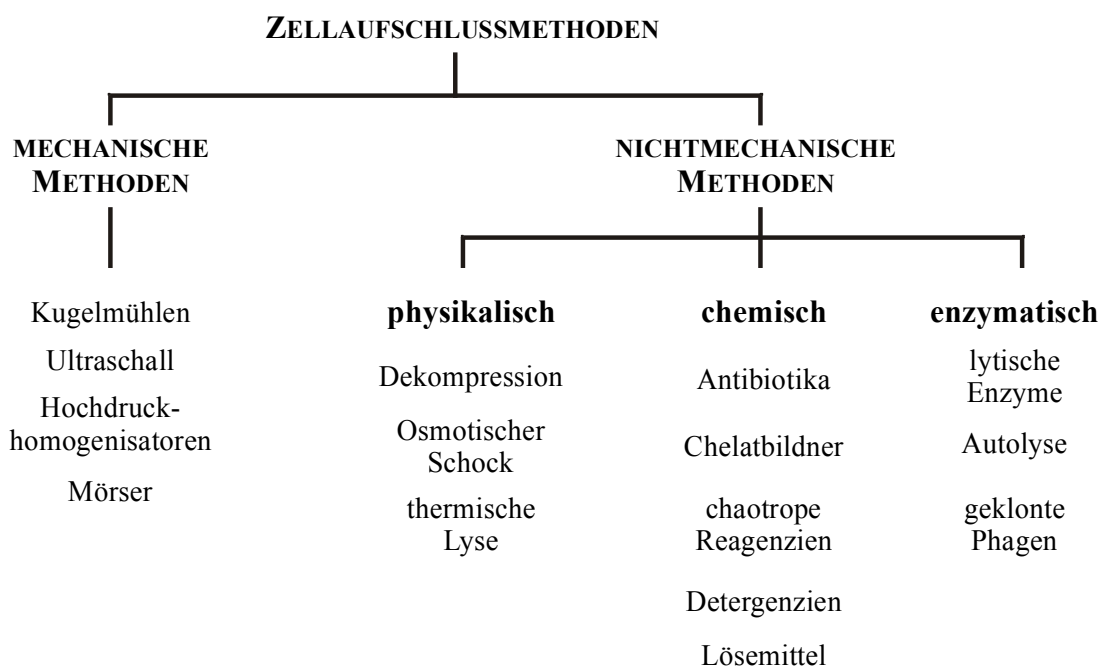
**Abbildung 5-6:** Variation der Parameter Flussrate und Zentrifugalbeschleunigung bei der kontinuierlichen Zellabtrennung von *Sulfitobacter pontiacus*. Die linke Darstellung zeigt die Auswirkung der Parametervariation auf die Optische Dichte im Zentrifugat. Die rechte Grafik zeigt die Klärrate in % in Abhängigkeit von Flussrate und Zentrifugalbeschleunigung.

Anhand der Darstellung wird deutlich, dass bei einer Flussrate von 20 mL/min kaum noch eine Abhängigkeit von der einwirkenden Zentrifugalbeschleunigung besteht. Für die Prozessierung eines ganzen 10 Liter-Ansatzes würden unter diesen Bedingungen aber unrealistisch lange Prozesszeiten von über acht Stunden resultieren. Mit zunehmender Flussrate werden die Abhängigkeiten von der Zentrifugalbeschleunigung größer, und die Klärraten nehmen teilweise deutlich ab. Während auch bei höheren Flussraten der Unterschied zwischen 5.000 g und 6.000 g immer noch sehr gering und die Klärrate relativ groß bleibt, gehen hohe Flussraten bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 3.000 g eindeutig zulasten der Klärung. Bei einer Flussrate von 140 mL/min und einer Zentrifugalbeschleunigung von 3.000 g sinkt die Klärrate auf unter 72%.

Eine Flussrate von 80-100 mL/min bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 5.000 g hat sich als guter Kompromiss erwiesen. Unter diesen Bedingungen können die 10 Liter Kulturbrühe aus einem Biostat C-Fermenteransatz bei guten Klärraten und relativ kurzen Prozesszeiten von 1,5 – 2 Stunden prozessiert werden.

### 5.3 Untersuchungen zum Zellaufschluss der *S. pontiacus* Biomasse

Eine Freisetzung der intrazellulären Komponenten eines Bakteriums setzt eine Zerstörung der stabilisierenden Komponenten der Bakterienzellwand voraus. Eine vollständige und unspezifische Zerstörung der Zellwand wird gewöhnlich durch mechanische Methoden erreicht. Mit nichtmechanischen Methoden kann der Zellaufschluss dagegen schonender und spezifischer gestaltet werden. Man unterscheidet physikalische, chemische und enzymatische Methoden. Einen Überblick über verschiedene Techniken gibt Abbildung 5-7.



**Abbildung 5-7:** Überblick über verschiedene Methoden zum Zellaufschluss (nach Middelberg, 1995).

Für die Gewinnung der Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* wurden anfangs nur mechanische Methoden in Betracht gezogen. Eingehender untersucht wurden der Einsatz einer Schwingkugelmühle zum Aufschluss kleinerer Mengen und das Mörsern der Biomasse zur Bearbeitung größerer Mengen. Als Universal-Methode wurde außerdem der Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall untersucht.

In einer späteren Phase wurde dann auch ein schonenderes enzymatisches Zellaufschlussverfahren eingehender untersucht.

### 5.3.1 Mechanischer Zellaufschluss: Mörsern der Biomasse und Aufschluss mit der Schwingkugelmühle

In Vorversuchen wurden für größere Ansätze das Mörsern der Zellsubstanz und für kleinere Ansätze der Zellaufschluss mit der Schwingkugelmühle untersucht (Hanke, 1999).

Der Zellaufschluss mit der Schwingkugelmühle MM-2 (Fa. Retsch) erfolgte für 30 Minuten, bei einer Temperatur von 4°C mit maximaler Schwingfrequenz (Einstellung 100, 30 Hz). Als Mahlkörper wurden Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,25 – 0,5 mm eingesetzt, wobei der Mahlkörperfüllgrad pro Reaktionsgefäß (2 mL-Reaktionsgefäß, Fa. Eppendorf) 80% (v/v) betrug. Die Abtrennung der Mahlkörper und der Zelltrümmer erfolgte durch dreißigminütige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 g. Als Vergleich wurde ein Ultraschallaufschluss (Labsonic U, Fa. B. Braun Biotech) unter den zu diesem Zeitpunkt etablierten Standardbedingungen durchgeführt. Dazu wurden zwei Milliliter einer Zellsuspension mit 100 mg Biofeuchtmasse pro Milliliter Aufschlusspuffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Ultraschall behandelt. Der Leistungseintrag betrug 65 W und das Verhältnis Beschallungszeit / Abkühlungszeit betrug 0,2. Die Probe wurde für drei Minuten beschallt.

Es wurde festgestellt, dass bei dem Aufschluss mit der Schwingkugelmühle im Vergleich zum Aufschluss mit der Ultraschallsonde bei zehnfacher Behandlungsdauer nur ca. 30% der Menge an Sulfitoxidase freigesetzt wurde. Dieser Ansatz wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Der Zellaufschluss durch Mörsern der Zellsubstanz wurde mit einem handelsüblichen Feinmörser durchgeführt. Dieser wurde vorab in einem –80°C-Kühlschrank vorgekühlt und anschließend in einer Schaumstoffverkleidung mit flüssigem Stickstoff kühl gehalten. Ein Gramm der feuchten Biomasse wurde bei 4°C aufgetaut und unter regelmäßiger Zugabe kleiner Mengen flüssigen Stickstoffs über einen Zeitraum von 15 Minuten zermörsert. Die Zellmasse wurde dann mit 10 mL des Aufschlusspuffers versetzt, in ein 30 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und 30 Minuten bei 4°C und 15.000 g zentrifugiert. Um den Erfolg des Aufschlusses zu beurteilen, wurde das Zellpellet im Aufschlusspuffer resuspendiert und unter den im vorigen Absatz genannten Bedingungen mit Ultraschall behandelt. Als Referenzexperiment wurde eine Probe des Ausgangsmaterials direkt unter den genannten Bedingungen mit Ultraschall behandelt. Es zeigte sich, dass über 80% der Sulfitoxidase-Aktivität erst bei der nachträglich durchgeführten Ultraschallbehandlung freigesetzt wurden, dass also der Aufschluss durch Mörsern der Biomasse nur zu relativ geringen Ausbeuten führte. Auch dieser Ansatz wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

### 5.3.2 Mechanischer Zellaufschluss: Behandlung von *S. pontiacus* mit Ultraschall

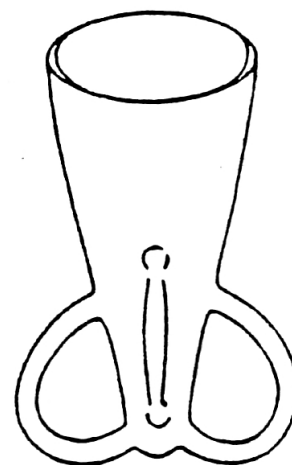
Untersuchungen zum Aufschluss von *S. pontiacus* mit Ultraschall wurden mit einem Ultraschallgerät Labsonic U (Fa. B. Braun Biotech) durchgeführt. Dieses besteht aus einem Generator, der eine Ausgangsleistung mit einer Frequenz von 20 kHz erzeugt, einem piezoelektrischen Wandler, der die Leistung des Generators in eine mechanische Bewegung transformiert, und einer Titansonde, über die die Schallenergie in die Probe fokussiert wird. Das Labsonic U ist mit einem Impulsregler ausgerüstet, der eine Einstellung des Verhältnisses Beschallungszeit / Abkühlzeit im Bereich von 0,1 bis 0,9 Sekunden ermöglicht. Betrieben wurde das Gerät mit einer Nadelsonde (Nadelsonde 40 T) mit 4 mm Durchmesser, die Ausgangsleistungen bis zu 80 W erlaubt.

In Vorversuchen wurden Aufschlüsse in 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dabei wurde bei Variation der Parameter „Behandlungsdauer“ und „Impulsregelung“ festgestellt, dass sich – trotz Eiskühlung – bei Ausgangsleistungen über 65 W und bei Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnissen über 0,2 deutliche Erwärmungseffekte zeigten, die die Enzymstabilität im Rohextrakt negativ beeinflussten (Hanke, 1999).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde deshalb mit 10 mL-Rosettenzellen gearbeitet, deren besondere Geometrie (siehe Abbildung 5-8) eine besonders effiziente Kühlung der aufzuschließenden Probe ermöglicht. Die Zirkulation der Probe durch die drei seitlichen Röhren während der Behandlung mit Ultraschall garantiert dabei einen guten Wärmeaustausch mit dem umgebenden Medium.

Die Proben wurden auf Eis vorgekühlt und dann in die ebenfalls vorgekühlte Rosettenzelle überführt. Während des gesamten Zellaufschlusses befand sich diese dann in einem Eisbad.

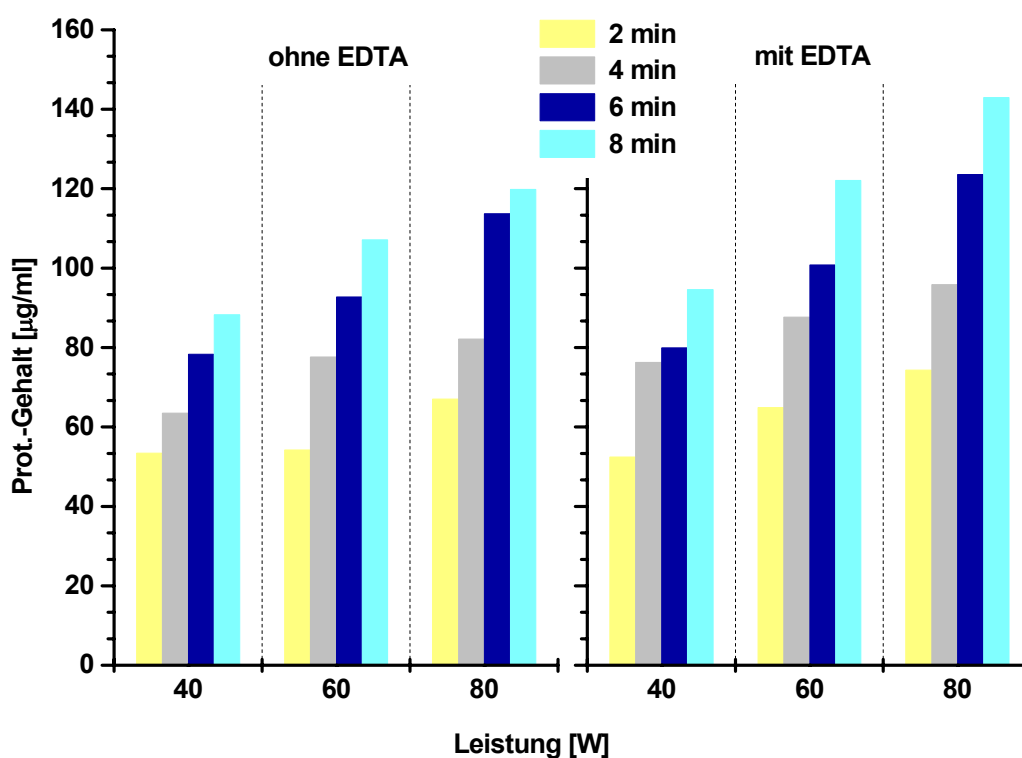
Durch dieses Vorgehen konnten nennenswerte Erwärmungen des Probematerials, selbst bei längeren Behandlungszeiten und bei höheren Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnissen bzw. bei höherer Leistungseinstrahlung, verhindert werden.



**Abbildung 5-8:**

Rosettenzelle zum Ultraschallaufschluss der *S. pontiacus*-Biomasse.

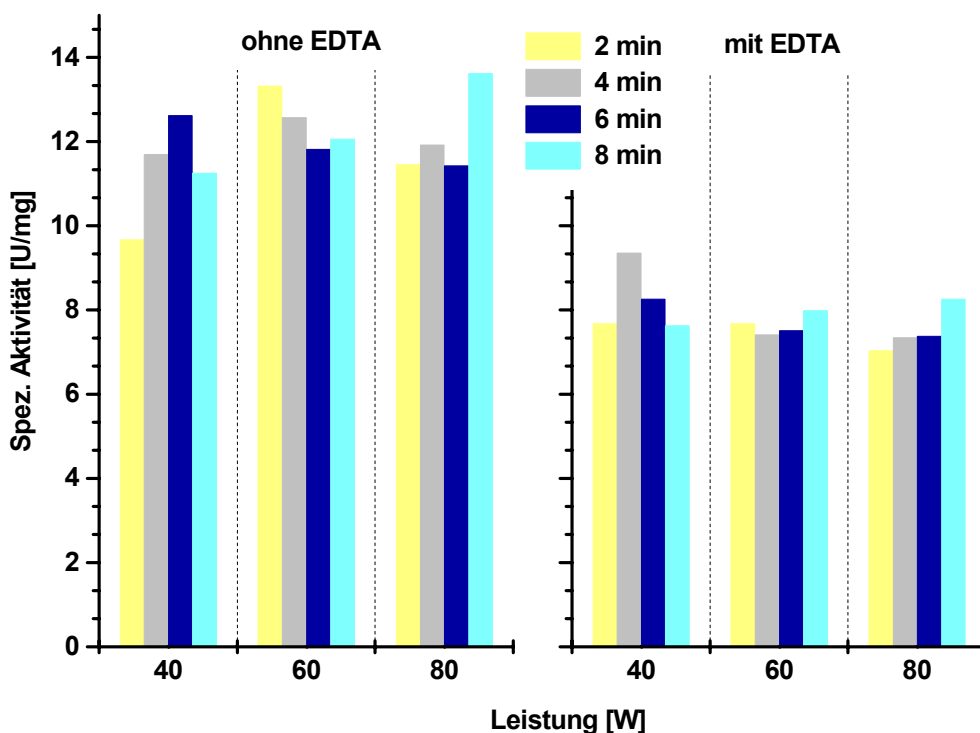
Zur Überprüfung der Ultraschallparameter wurde eine Zellsuspension mit 20 mg Biofeuchtmasse pro Milliliter Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) hergestellt. Die Probe wurde aliquotiert und die Aliquots von fünf Millilitern wurden in der 10 mL-Rosettenzelle unter Eiskühlung und mit einem Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnis von 0,5 mit Ultraschall behandelt. Dabei wurden die Parameter „Behandlungsdauer“ und „Leistungseinstrahlung“ im Bereich von 2-8 Minuten bzw. 40 bis 80 W variiert. In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Aufschlusspuffer zusätzlich mit 1 mmol/L EDTA versetzt. Nach dem Aufschluss wurden die Proben dann jeweils bei 4°C und 30.000 g abzentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20). Abbildung 5-9 zeigt die Proteingehalte im Rohextrakt.



**Abbildung 5-9:** Proteinfreisetzung bei der Behandlung von *S. pontiacus* mit Ultraschall. Variiert wurden die Parameter „Behandlungsdauer“ und „Leistungseinstrahlung“. Die linke Darstellung zeigt die Ergebnisse einer Versuchsreihe ohne Zusatz von EDTA. Die rechte Darstellung zeigt die Ergebnisse mit EDTA-Zusatz (jeweils bei einem Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnis von 0,5 und unter Eiskühlung).

Es ist deutlich zu erkennen, dass – wie zu erwarten – sowohl eine Verlängerung der Ultraschallbehandlung als auch eine Steigerung des Leistungseintrags zu einer Erhöhung der Menge an freigesetztem Protein führt. Außerdem bewirkt auch die Zugabe von EDTA zum Aufschlusspuffer eine Steigerung der freigesetzten Proteinmenge im Vergleich zur Versuchsreihe ohne Zusatz von EDTA. Dieser Effekt lässt sich anhand des Aufbaus der Zellwand gram-negativer Bakterien (siehe Abschnitt 5.3.3.1) erklären: EDTA komplexiert die

am Aufbau der Lipopolysaccharidschicht beteiligten Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und bewirkt somit eine Destabilisierung dieses Bestandteils der Zellwand. Für die Beurteilung der Aufschlussparameter ist dagegen die Menge an freigesetzter Sulfitoxidase bzw. das Verhältnis Sulfitoxidase / restliche Zellproteine interessanter. Abbildung 5-10 zeigt die spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt.



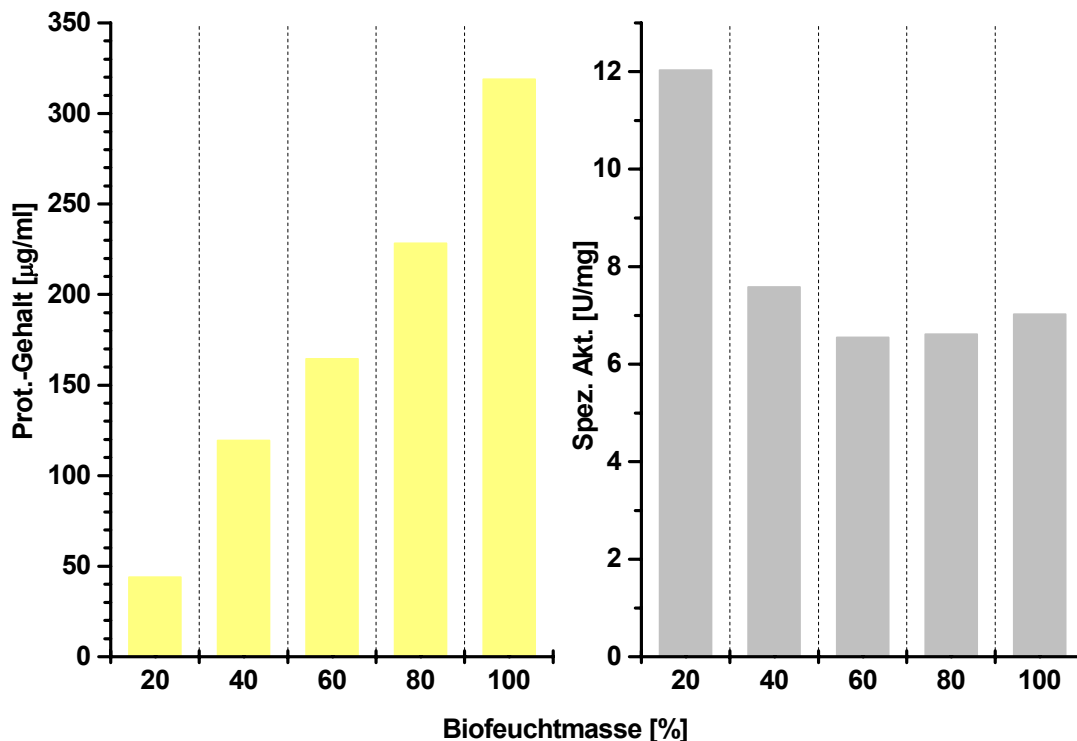
**Abbildung 5-10:** Abhängigkeit der spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität von den Ultraschallparametern „Behandlungsdauer“ und „Leistungseintrag“. Die linke Darstellung zeigt die Ergebnisse einer Versuchsreihe ohne Zusatz von EDTA. Die rechte Darstellung zeigt die Ergebnisse mit EDTA-Zusatz (jeweils bei einem Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnis von 0,5 und unter Eiskühlung).

Es wird deutlich, dass in der Versuchsreihe ohne Zusatz von EDTA deutlich höhere spezifische Aktivitäten erhalten wurden als in der Versuchsreihe mit Zusatz von EDTA zum Aufschlusspuffer. Diese Beobachtung lässt sich anhand der oben diskutierten höheren Freisetzung an Gesamtprotein unter Einfluss von EDTA erklären: Je mehr andere Proteine freigesetzt werden, desto geringer ist die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität, die ja in Units pro Milligramm Protein ausgedrückt wird.

Die spezifischen Aktivitäten in der Versuchsreihe ohne Zusatz von EDTA zeigen ein indifferentes Verhalten mit Werten zwischen 11 und 13 Units/mg<sub>Protein</sub>. Deutlichere Abweichungen von diesem Bereich zeigen lediglich der Zellaufschluss mit 40 W und einer Behandlungsdauer von 2 Minuten, der zu einer spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität von unter 10 Units/mg<sub>Protein</sub> führte, und der Aufschluss mit einem Leistungseintrag von 80 W und einer

Behandlungsdauer von 8 Minuten, der zu einer spezifischen Aktivität deutlich über 13 Units/mg<sub>Protein</sub> führte. In der Versuchsreihe unter Zusatz von EDTA schwanken die spezifischen Aktivitäten um einen Wert von 8 Units/mg<sub>Protein</sub>. Es fällt jedoch auf, dass der Ansatz mit einer Behandlungsdauer von 4 Minuten und einem Leistungseintrag von nur 40 W zu einer deutlich höheren spezifischen Sulfitoxidase-Aktivität im Rohextrakt führt als die anderen untersuchten Ansätze. Diese relativ milden Bedingungen reichen offenbar aus, um die Sulfitoxidase freizusetzen, ohne dass viele der restlichen Proteine mit freigesetzt werden. Auch dieses Ergebnis lässt sich anhand des Zellwandaufbaus gram-negativer Bakterien erklären (siehe Abschnitt 5.3.3.1).

Der Einfluss der Zelldichte im Aufschlusspuffer wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit einem Biofeuchtmassengehalt von 36 mg/mL in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (entsprechend 100%) hergestellt, die mit Aufschlusspuffer zusätzlich auf 80%, 60%, 40% und 20% verdünnt wurde. Fünf Milliliter dieser Zellsuspensionen wurden jeweils unter Eiskühlung in einer 10 mL-Rosettenzelle aufgeschlossen. Das Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnis betrug 0,5. Es wurde mit einem Leistungseintrag von 80 W bei einer Behandlungsdauer von 8 Minuten gearbeitet. Abbildung 5-11 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



**Abbildung 5-11:** Einfluß der *S. pontiacus* Zelldichte im Aufschlusspuffer auf die Freisetzung der Sulfitoxidase während der Ultraschallbehandlung. Der 100%-Wert entspricht einer Zelldichte von 36 mg Biofeuchtmasse pro Milliliter Aufschlusspuffer. Alle Versuche wurden mit 5 mL Zellsuspension in einer 10 mL-Rosettenzelle unter Eiskühlung durchgeführt. Die Ultraschallparameter waren: Leistungseintrag 80 W; Beschallungszeit / Abkühlungszeit-Verhältnis 0,5; Behandlungsdauer 8 Minuten.

Die Gesamtmenge an freigesetztem Protein steigt mit zunehmender Zelldichte erwartungsgemäß an. Die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität ist jedoch bei den beiden niedrigsten Zelldichten am höchsten, wobei die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität mit einem Wert von 12 Units/mg<sub>Protein</sub> bei dem Versuch mit einer Zelldichte von 20%, entsprechend einem Biofeuchtmassegehalt von ca. 7 mg pro Milliliter Aufschlusspuffer, fast doppelt so hoch lag wie bei den anderen untersuchten Konzentrationen. Eine geringe Zelldichte im Aufschlusspuffer bewirkt also eine bessere Freisetzung des Enzyms Sulfitoxidase.

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden Standardbedingungen für den Ultraschallaufschluss von *S. pontiacus* etabliert. Einen Überblick über die Standardbedingungen gibt Tabelle 5-2.

**Tabelle 5-2:** Standardbedingungen für *S. pontiacus*-Zellaufschlüsse mit Ultraschall.

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>
Leistungseintrag	80 W
Verhältnis Beschallungszeit / Abkühlungszeit	0,5
Temperatur	Eiskühlung (Rosettenzelle)
Behandlungsdauer	8-20 Minuten
Zelldichte	10-50 mg BFM pro Milliliter

Die Parameter „Behandlungsdauer“ und „Zelldichte“ wurden abhängig voneinander eingestellt. Bei einer Zelldichte von 10 mg Biofeuchtmasse pro Milliliter wurden die Proben 8 Minuten behandelt, bei der maximalen Zelldichte von 50 mg pro Milliliter Zellaufschlusspuffer entsprechend 20 Minuten.

Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte bei größeren Ansätzen durch dreißigminütige Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge Sigma 3K20 (Rotor 12158, Fa. B. Braun) bei einer Temperatur von 4°C und einer Zentrifugalbeschleunigung von 30.000 g in 30 mL Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Centrifuge Tubes PC, Fa. Nalgene Nunc). Bei kleineren Ansätzen erfolgte die Abtrennung ebenfalls durch dreißigminütige Zentrifugation in der oben genannten Kühlzentrifuge (Rotor 12153) bei 4°C und einer Zentrifugalbeschleunigung von 16 100 g in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf).



### 5.3.3 Fraktionierter enzymatischer Zellaufschluss: Ein alternativer Ansatz?

Laut Sorokin (1995) soll die Sulfitoxidase von *Sulfitobacter pontiacus* im Cytoplasma lokalisiert sein. Wie die weiteren Ausführungen in diesem Abschnitt zeigen werden, lassen sich einige der Ergebnisse aus der Optimierung des Ultraschallaufschlusses aber gut mit einer Lokalisierung des Enzyms im Periplasma erklären. Weiteren Hinweis auf eine eventuelle periplasmatische Lokalisierung der Sulfitoxidase geben die Sulfitoxidationsmechanismen anderer Bakterien. Das in Abschnitt 4.1.4 beschriebene System von *Thiobacillus versutus* befindet sich ebenso im Periplasma (siehe Abb. 4-6) wie die von Dahl (2000) und Brüser (2000) beschreiben bakteriellen Sulfitoxidasen<sup>3</sup>.

Nachdem mit dem vorab beschriebenen Weg zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* ein Weg mit einem klassischen mechanischen Zellaufschlussverfahren etabliert werden konnte, wurden deshalb später enzymatische Verfahren, die zu einem fraktionierten Aufschluss der Zellen – also zu einer gezielten Freisetzung nur der Proteine aus dem Periplasma – führen, untersucht. In den nun folgenden Abschnitten wird, zum besseren Verständnis der Vorgänge, kurz der Aufbau der Zellwand gram-negativer Bakterien erläutert. Anschließend werden Ergebnisse aus Untersuchungen zum fraktionierten Aufschluss von *S. pontiacus* vorgestellt.

#### 5.3.3.1 Die Zellwand gram-negativer Bakterien

Die Zellwand gram-negativer Bakterien besteht aus einer äußeren Membran und einer **Peptidoglykan-** oder **Mureinschicht** (siehe Abb. 5-12). Die äußeren Zellwandkomponenten, hauptsächlich jedoch die quervernetzte Peptidoglykanschicht, sorgen für die mechanische Stabilität der Zellen. Die osmotisch wirksame Komponente der Zellwand ist die **Cytoplasmamembran**. Es handelt sich um eine Phospholipiddoppelschicht mit einer Dicke von ca. 8 nm, die die Zelle vollständig umgibt. Die Cytoplasmamembran ist semipermeabel und kontrolliert den Ein- und Austritt gelöster Substanzen, trägt jedoch nicht zur mechanischen Stabilität der Zellen bei.

Die Peptidoglykanschicht besteht aus zwei Zuckerderivaten, N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, und einer kleinen Gruppe verschiedener Aminosäuren, bestehend aus L- und D-Alanin, D-Glutaminsäure und Diaminopimelinsäure. Aus diesen Grundbausteinen wird eine sich wiederholende Grundstruktur, das Glykantetrapeptid, gebildet. Die  $\beta$ -1,4-glykosidische Verknüpfung von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure in alternierender Reihenfolge führt zur Bildung von Ketten, die durch Peptidbindungen zwischen den Aminosäureseitenketten zu einem Netz verknüpft sind (siehe Abb. 5-13).

---

<sup>3</sup> Während Dahl den sehr speziellen Fall des Schwefelpurpurbakteriums *Allochromatium vinosum* beschreibt, gibt Brüser einen allgemeineren Überblick über verschiedene bakterielle Sulfitoxidationswege unter Beteiligung periplasmatischer Sulfitoxidasen.

In frühen Modellen wurde eine Peptidoglykan-Einfachschicht postuliert (Braun et al., 1973), neuere Untersuchungen an *Escherichia coli* schlagen aber eine Peptidoglykan-Multischicht vor, deren Dicke zwischen  $6,6 \pm 1,5$  nm für Zellen in der exponentiellen Phase und  $8,8 \pm 1,8$  nm für Zellen in der stationären Wachstumsphase variiert (Leduc et al., 1989). Beim Wechsel von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase steigt besonders der Grad der Quervernetzung zwischen den Schichten an (Pisabarro et al., 1985).

Die äußere Membran gram-negativer Bakterien besteht aus einer Lipiddoppelschicht und beinhaltet Transmembranproteine, Phospholipide und Lipopolysaccharide (LPS). Benachbarte LPS-Moleküle sind nicht-kovalent über divalente Kationen, hauptsächlich  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ , miteinander verbunden. Der untere Teil der Lipiddoppelschicht, der aus Phospholipiden besteht, ist über einen Lipoproteinkomplex in der Peptidoglykanschicht verankert. Im Gegensatz zur Cytoplasmamembran ist die äußere Membran gram-negativer Bakterien für kleine Moleküle relativ durchlässig. Die Transmembranproteine, Porine genannt, dienen als Kanäle für den Ein- und Austritt niedermolekularer hydrophiler Komponenten. Die äußere Membran ist jedoch für größere Moleküle und Enzyme undurchlässig. Der von der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran begrenzte Raum wird als **Periplasma** bezeichnet und hat vermutlich eine gelartige Konsistenz. Das Periplasma beherbergt verschiedene Enzymarten, z.B. hydrolytische Enzyme, die den Abbau von Nährstoffmolekülen einleiten, Proteine, die den Transport von Substraten über die Cytoplasmamembran einleiten, und Chemorezeptoren, die bei chemotaktischen Prozessen eine Rolle spielen.

Eine Aufstellung bei Janson und Rydén (1998) gibt einen Überblick über die Verteilung exprimierter Proteine in *E. coli* (siehe Tabelle 5-3).

**Tabelle 5-3:** Lokalisierung und ungefähre Anzahl von Proteinen in *E. coli* (nach Janson und Rydén, 1998).

Ort	Anzahl der Proteine
Cytoplasma	~ 2000
Periplasma	~ 100
Kultivierungsmedium	< 10

Wie die Tabelle zeigt, befindet sich nur ein relativ geringer Anteil der exprimierten Proteine im Periplasma. Der weitaus größere Teil ist im Cytoplasma lokalisiert. Ein fraktionierter Zellaufschluss, der nur die periplasmatischen Proteine freisetzt, hätte also deutliche Vorteile für die Aufreinigung eines solchen periplasmatischen Proteins.

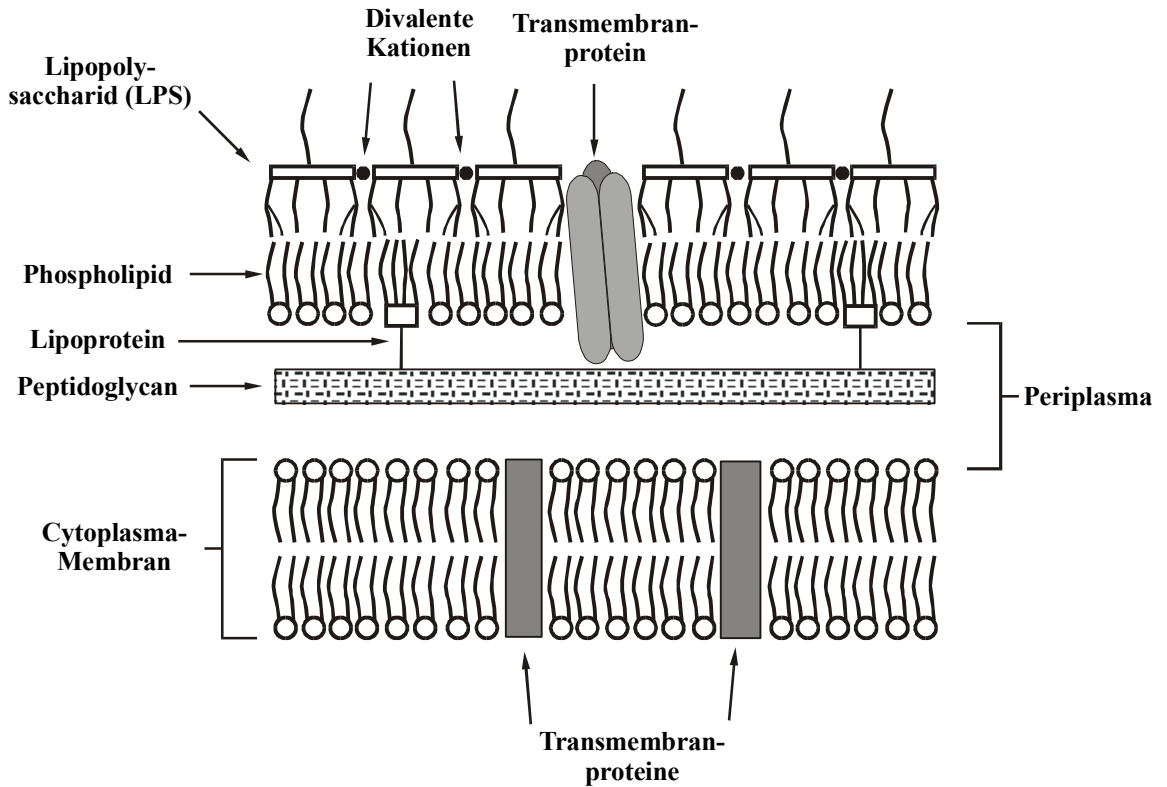


Abbildung 5-12: Zellwandaufbau bei gram-negativen Bakterien (nach Middelberg, 1995).

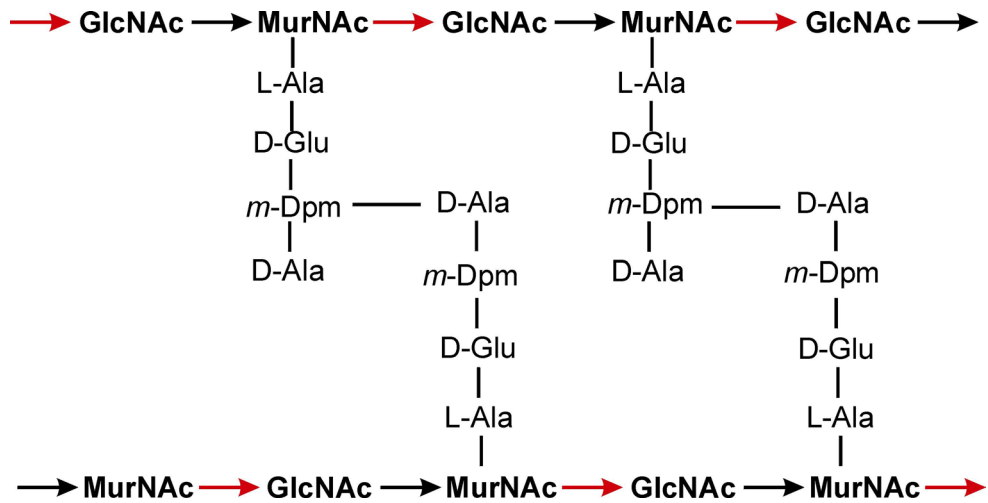


Abbildung 5-13: Struktur der Peptidoglykanschicht von *E. coli*. Die in Rot dargestellten Bindungen sind durch Lysozym spaltbar (siehe Abschnitt 5.3.3.2).

Insbesondere einige Ergebnisse aus der Optimierung des Ultraschallaufschlusses deuteten auf eine periplasmatische Lokalisierung des Enzyms Sulfitoxidase hin: So wurde z.B. festgestellt, dass unter dem Einfluss des Komplexbildners EDTA ein relativ geringer Leistungseintrag von 40 W und eine relativ geringe Ultraschallbehandlungsdauer von 4 Minuten ausreichten, um die Sulfitoxidase freizusetzen (siehe auch Abbildung 5-14). Anhand des Zellwandaufbaus gram-negativer Bakterien lässt sich dieser Befund durch eine EDTA-bedingte Schwächung der Lipopolysaccharidschicht erklären. Ist diese nämlich durch Komplexierung der  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen geschwächt, so sollten schon relativ milde Bedingungen ausreichen, um die periplasmatischen Proteine freizusetzen.

Vor diesem Hintergrund erschien eine Untersuchung zum fraktionierten Zellaufschluss, d.h. zu einer selektiven Freisetzung der periplasmatischen Proteine, lohnenswert.

### 5.3.3.2 Enzymatische Zell-Lyse und fraktionierte Zellaufschlussverfahren

Verschiedene Enzyme bewirken eine Lyse von Mikroorganismen (Andrews und Asenjo, 1987). Am meisten untersucht und am besten beschrieben ist sicherlich das Lysozym<sup>4</sup>, ein weit verbreitetes Enzym, das beim Menschen in der Tränenflüssigkeit, im Nasen- und Darmsekret, im Blutplasma und in Leukozyten vorkommt, aber auch z.B. von Bakteriophagen produziert wird. Lysozym katalysiert die Hydrolyse von  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen und bewirkt so eine Zerstörung des Peptidoglykananteils der Bakterienzellwand. Bei gram-negativen Bakterien schirmt die zusätzlich vorhandene Lipopolysaccharidschicht die Peptidoglykanschicht allerdings ab, weshalb gram-negative Bakterien weniger empfindlich gegen Lysozym sind als gram-positive Bakterien. Der Zusatz von chelatisierenden Reagenzien, wie z.B. EDTA, bewirkt eine Schwächung der Lipopolysaccharidschicht und macht auch gram-negative Bakterien empfindlich für den Angriff von Lysozym (Salisbury, 1989). Infolge des hohen osmotischen Druckes im Zellinneren platzt ein Bakterium nach der lytischen Zerstörung der Zellwand sofort auf. Wenn jedoch die osmotischen Bedingungen außerhalb der Zellen denen im Zellinneren entsprechen, wenn also der osmotische Druck im Inneren der Zellen ausgeglichen wird, bleibt das von der inneren Membran umschlossene Cytoplasma intakt. Eine derartige fraktionierte Lyse von Bakterienzellen macht also die Proteine aus dem Periplasma zugänglich, bewirkt aber andererseits, dass die cytoplasmatischen Proteine weiterhin zurückgehalten werden. Es werden so genannte Späroplasten gebildet.

Insbesondere für *E. coli* wurden verschiedene Ansätze zum fraktionierten Zellaufschluss beschrieben. Simmonds und Toye (1966) und Witholt et al. (1976) beschreiben z.B. die

---

<sup>4</sup> Lysozym wurde im Jahre 1922 von Alexander Fleming durch Zufall entdeckt, als er während einer Erkältung eine paar Tropfen seines Nasensekrets auf eine bewachsene Bakterienkulturplatte fallen ließ und einige Zeit später feststellte, dass sich die Bakterien in der Nähe des Schleims aufgelöst hatten.

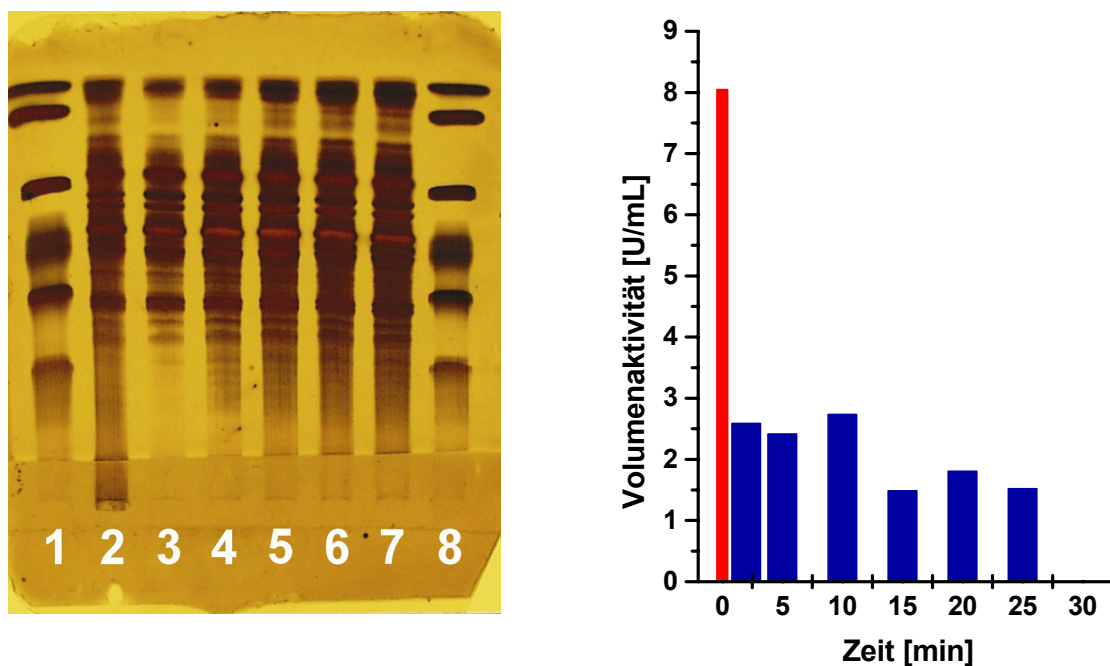
Herstellung von *E. coli*-Sphäroplasten durch Einwirkung von Lysozym und EDTA bei pH 8,0. Als osmotischer Stabilisator wurde in beiden Fällen Saccharose genutzt. Novella et al. (1994) beschreiben die selektive Extraktion des periplasmatisch exprimierten Enzyms Penicillin-Acylase aus einem rekombinanten *E. coli*-Stamm durch einen fraktionierten Zellaufschluss bei pH 7,5. In diesem Fall wurde eine Mischung aus Saccharose und Kochsalz zur osmotischen Stabilisierung der Zellen eingesetzt. Zhu et al. (1999) schließlich beschreiben den fraktionierten Aufschluss von *Alcaligenes faecalis*. Hier erfolgte die Stabilisierung durch Zugabe von Glucose, Glycin oder NaCl.

Die enzymatische Lyse von Bakterienzellen hat, wegen der milden Bedingungen und des spezifischen Mechanismus der Enzyme, auch Potential für industrielle Anwendungen (Engler, 1985). Lysozym wird heute in sehr großen Mengen aus Hühnereiweiß gewonnen und ist deshalb ein relativ billiges Enzym (Hopkins, 1991). Eine Immobilisierung des Enzyms könnte, wegen der zusätzlich verringerten Prozesskosten und der leichteren Abtrennbarkeit während des Downstream-Prozesses, zur weiteren Verbreitung des Lysozyms in industriellen Prozessen beitragen (White und Marcus, 1988; Crapisi et al., 1993; Lee und Ku, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zum fraktionierten Zellaufschluss von *S. pontiacus* untersucht.

### **5.3.3.3 Untersuchungen zum fraktionierten Zellaufschluss von *Sulfitobacter pontiacus***

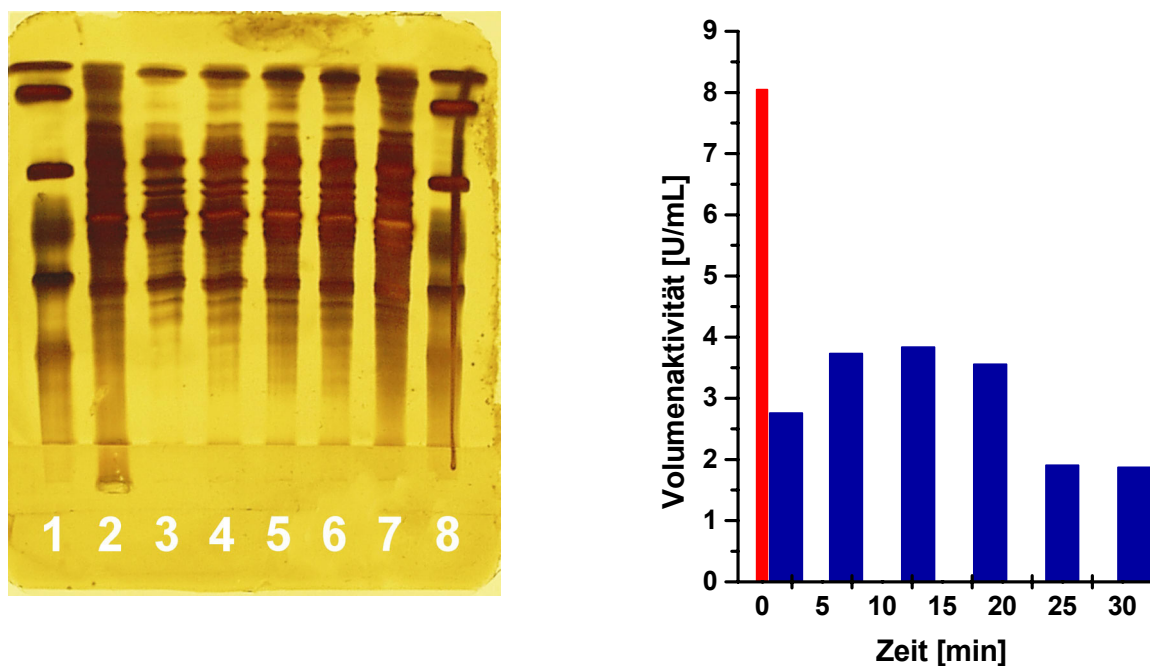
In einem ersten Experiment wurde eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von ca. 60 mg/mL im Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl, 0,5M Saccharose, pH 7,5) hergestellt. Von dieser Suspension wurden als Referenz 5 mL per Ultraschall aufgeschlossen, wie unter 5.2.2.1 beschrieben. Der restliche Teil der Zellsuspension wurde in Aliquots von 1,35 mL (in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen) aufgeteilt. Sechs der Aliquots wurden in einem Thermoschüttler (Thermomixer compact, Fa. Eppendorf) auf 37°C vortemperiert. Dann wurden jeweils 150 µL einer Lösung aus 14,6 mg Lysozym in 20 mL 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 7,5, zupipettiert. Die Ansätze wurden bei 37°C mit 500 rpm geschüttelt. Nach 2, 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten wurden je ein Aliquot entnommen und in einer Kühlzentrifuge (Sigma 3K20, Fa. B. Braun) bei 4°C und mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 16.100 g abzentrifugiert. Bereits nach 5 Minuten wurde beobachtet, dass sich die Konsistenz der Probe deutlich veränderte. Die Probe erschien „flockig“ und unterschied sich in ihrer Konsistenz damit sehr deutlich von den bisher bei Ultraschallaufschlüssen beobachteten Zellrückständen. Außerdem ließ sich das Zellmaterial nur noch sehr schwer abzentrifugieren. In den Überständen wurden jeweils die Aktivitäten gemessen. Zusätzlich wurden von ihnen SDS-PAGE-Gele angefertigt (siehe Anhang 7.3.2).



**Abbildung 5-14:** Fraktionierter Zellaufschluss von *S. pontiacus* bei 37°C. Die linke Seite zeigt das SDS-PAGE-Gel (Laufrichtung: nach oben). Dabei ist in den Spuren 1 und 8 ein Low Molecular Weight Calibration Kit aufgetragen (14.400, 20.100, 30.000, 45.000, 66.000, 97.000 Dalton; Amersham Pharmacia, siehe Anhang 7.3.2). Spur 2 zeigt den Ultraschallaufschluss und die Spuren 3 bis 7 entsprechend die Proben nach 2, 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten. Die rechte Seite zeigt die gemessenen Volumenaktivitäten in Blau und als Vergleich die Volumenaktivität der Referenzprobe in Rot.

Abbildung 5-14 zeigt deutlich, dass nach 2 Minuten schon fast die höchste Volumenaktivität dieses Ansatzes gemessen wurde, dass aber gleichzeitig zu diesem Zeitpunkt das Lysat nur wenige der Banden des Ultraschallaufschlusses aufweist. Die Aufstellung der Volumenaktivitäten zeigt aber auch, dass über den gesamten Verlauf des Experiments nur maximal 34% der Volumenaktivität des Referenzaufschlusses erreicht werden. Außerdem sinkt die Volumenaktivität mit zunehmender Prozessdauer deutlich ab.

In einem zweiten Experiment wurde unter den oben genannten Bedingungen, allerdings bei einer Temperatur von 30°C, gearbeitet. In diesem Experiment wurden nach 2, 7, 13, 19, 25 und 31 Minuten je ein Aliquot entnommen und aufgearbeitet, wie oben beschrieben. In diesem Experiment wurde die Änderung der Konsistenz erst deutlich später, nämlich nach ca. 13 Minuten, beobachtet. Abbildung 5-15 zeigt die Ergebnisse dieses Ansatzes.



**Abbildung 5-15:** Fraktionierter Zellaufschluss von *S. pontiacus* bei 30°C. Die linke Seite zeigt das SDS-PAGE-Gel (Laufrichtung: nach oben). Dabei ist in den Spuren 1 und 8 ein Low Molecular Weight Calibration Kit aufgetragen (14.400, 20.100, 30.000, 45.000, 66.000, 97.000 Dalton; Amersham Pharmacia, siehe Anhang 7.3.2). Spur 2 zeigt den Ultraschallaufschluss und die Spuren 3 bis 7 entsprechend die Proben nach 2, 7, 13, 19, 25 und 31 Minuten. Die rechte Seite zeigt die gemessenen Volumenaktivitäten in Blau und als Vergleich die Volumenaktivität der Referenzprobe in Rot.

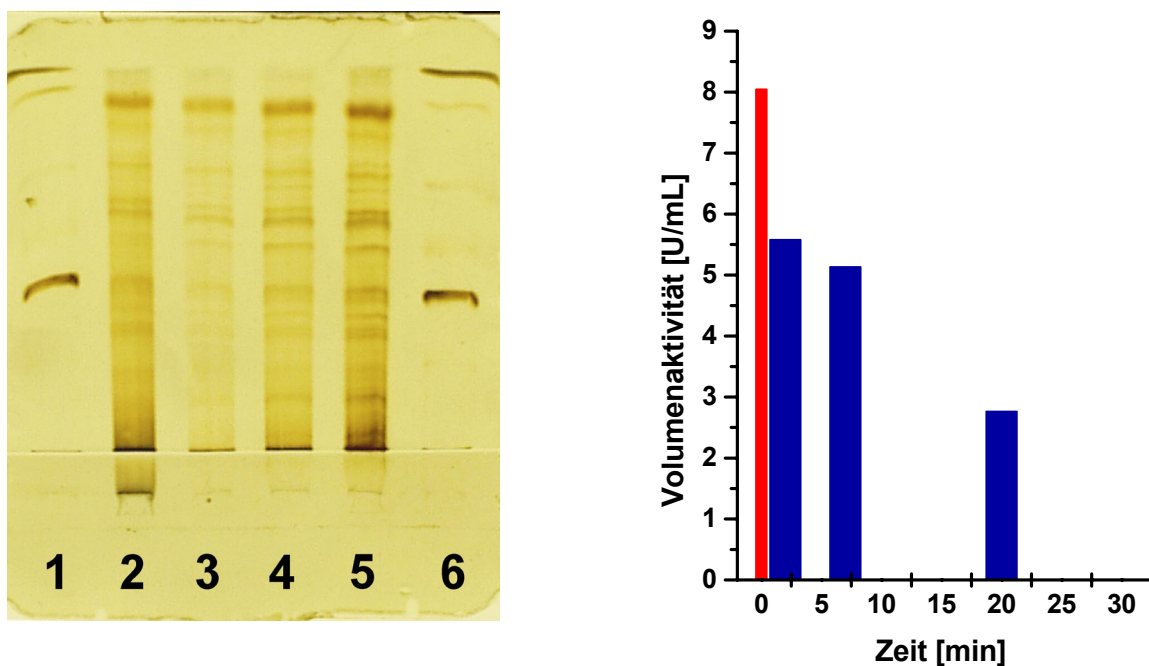
Die höchste Volumenaktivität wurde unter diesen Bedingungen erst etwas später erreicht. Auch anhand des SDS-PAGE-Gels zeigte sich, dass die Zell-Lyse bei der niedrigeren Temperatur von 30°C langsamer verlief. Es wurden allerdings auch in diesem Experiment nur ca. 48% der Volumenaktivität des Referenzexperiments erreicht.

In einem dritten Experiment wurde unter denselben Bedingungen – allerdings mit Zusatz des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid<sup>5</sup> (PMSF) – gearbeitet. Dabei wurden den Aliquots jeweils 5 µL einer Lösung von 38,4 mg PMSF in 2 mL 2-Propanol<sup>6</sup> zupipettiert. Nach 2, 7 und 20 Minuten wurden je ein Aliquot entnommen und aufgearbeitet. Die oben beschriebene Änderung der Konsistenz war auch während dieses Experiments zu beobachten.

Das SDS-PAGE-Gel und die Volumenaktivitäten sind in Abbildung 5-16 dargestellt.

<sup>5</sup> PMSF ist ein sehr potenter Inhibitor von Serinproteasen, wie z.B. Chymotrypsin, Trypsin, oder Thrombin. Neben den Serinproteasen wird auch die Cysteinprotease Papain gehemmt. Eine Hemmung der Metalloproteasen findet dagegen nicht statt.

<sup>6</sup> Die Lösung muss frisch angesetzt werden, da PMSF selbst in alkoholischer Lösung relativ instabil ist.

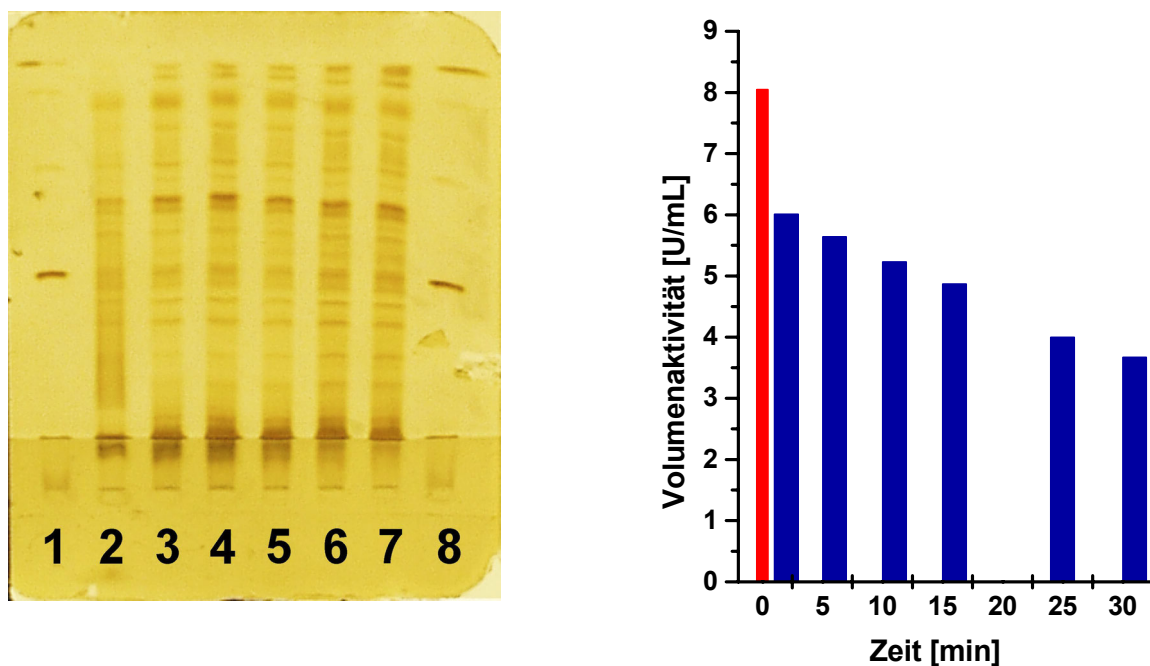


**Abbildung 5-16:** Fraktionierter Zellaufschluss von *S. pontiacus* bei 30°C unter Zusatz von PMSF. Die linke Seite zeigt das SDS-PAGE-Gel (Laufrichtung: nach oben). Dabei ist in den Spuren 1 und 6 ein Low Molecular Weight Calibration Kit aufgetragen (14.400, 20.100, 30.000, 45.000, 66.000, 97.000 Dalton; Amersham Pharmacia, siehe Anhang 7.3.2). Spur 2 zeigt den Ultraschallaufschluss und die Spuren 3 bis 5 entsprechend die Proben nach 2, 7 und 20 Minuten. Die rechte Seite zeigt die gemessenen Volumenaktivitäten in Blau und als Vergleich die Volumenaktivität der Referenzprobe in Rot.

Unter diesen Bedingungen wurden bereits nach zwei Minuten 69% der Volumenaktivität des Referenzexperiments erhalten. Die Volumenaktivität im Überstand lag also deutlich höher als in den vorher vorgestellten Experimenten, die ohne Zusatz eines Proteaseinhibitors durchgeführt wurden.

In einem weiteren Experiment wurde dann, ebenfalls unter Zugabe von PMSF, bei einer Temperatur von 10°C gearbeitet. Dazu wurde der Thermoschüttler in einem 4°C-Kühlraum betrieben. Proben wurden nach 2, 6, 11, 16, 25 und 31 Minuten aufgearbeitet. Abbildung 5-17 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments. Die höchste Volumenaktivität wurde bereits nach 2 Minuten erreicht und lag mit ca. 74%, bezogen auf das Referenzexperiment, erneut höher als die in den vorab dargestellten Experimenten erzielten Ergebnisse.



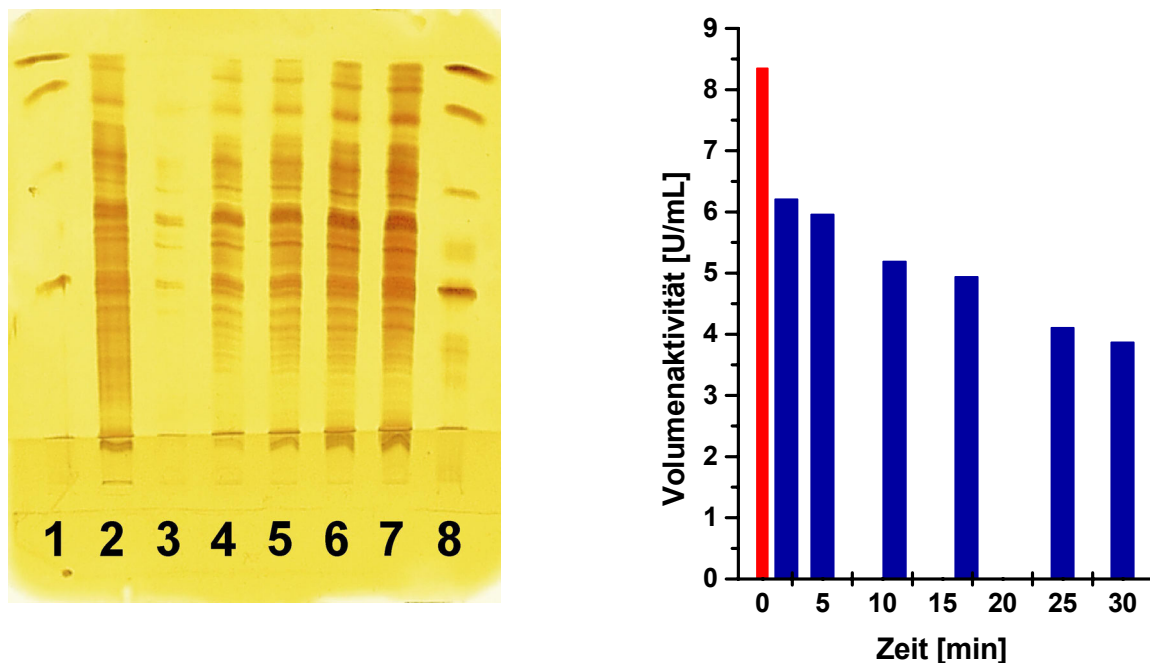


**Abbildung 5-17:** Fraktionierter Zellaufschluss von *S. pontiacus* bei 10°C unter Zusatz von PMSF. Die linke Seite zeigt das SDS-PAGE-Gel (Laufrichtung: nach oben). Dabei ist in den Spuren 1 und 6 ein Low Molecular Weight Calibration Kit aufgetragen (14.400, 20.100, 30.000, 45.000, 66.000, 97.000 Dalton; Amersham Pharmacia, siehe Anhang 7.3.2). Spur 2 zeigt den Ultraschallaufschluss und die Spuren 3 bis 7 entsprechend die Proben nach 2, 6, 11, 16, 25 und 31 Minuten. Die rechte Seite zeigt die gemessenen Volumenaktivitäten in Blau und als Vergleich die Volumenaktivität der Referenzprobe in Rot.

Auffallend bei allen bisher beschriebenen Experimenten war, dass unter allen untersuchten Bedingungen nach einer bestimmten Zeit doch eine vollständige Lyse der Zellen zu beobachten war. Eine echte Fraktionierung der Zellen in unterschiedliche Kompartimente war also allenfalls am Anfang der jeweiligen Aufschlüsse zu beobachten. Prozesstechnisch wäre ein derartiger Aufschluss auch zu bewerkstelligen. Wünschenswerter wäre es jedoch, eine echte Fraktionierung zu erreichen.

Zhu et al. (1999) haben bei *Alcaligenes faecalis* die Beobachtung gemacht, dass ein fraktionierter Zellaufschluss mit Glucose besser gelang als mit Saccharose. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Porine der äußeren Zellmembran bei *Alcaligenes faecalis* zu klein sind, um eine ungehinderte Diffusion der Saccharose-Moleküle ins Zellinnere zu ermöglichen. Ähnliche Verhältnisse könnten auch bei dem marinen Bakterium *S. pontiacus* herrschen. Es wurde deshalb in einem abschließenden Experiment der Einsatz von Glucose als osmotischem Stabilisator untersucht. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von ca. 65 mg/mL im Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl, 0,5M Glucose, pH 7,5) hergestellt. Von dieser Suspension wurden als Referenz 5 mL per Ultraschall aufgeschlossen. Der Rest der Suspension wurde ebenfalls aliquotiert und mit der Lysozym/EDTA-Lösung bei 10°C und in Gegenwart von PMSF behandelt. Während des Aufschlusses wurde beobachtet, dass sich die Konsistenz des Materials deutlich von der oben beschriebenen unterschied. Es

wurde in diesem Experiment eine eher gelartige Konsistenz der Zellmasse beobachtet. Abbildung 5-18 zeigt das SDS-PAGE-Gel und die Volumenaktivitäten aus diesem Ansatz.



**Abbildung 5-18:** Fraktionierter Zellaufschluss von *S. pontiacus* bei 10°C mit Glucose als osmotischem Stabilisator und Zusatz von PMSF. Die linke Seite zeigt das SDS-PAGE-Gel (Laufrichtung: nach oben). Dabei ist in den Spuren 1 und 6 ein Low Molecular Weight Calibration Kit aufgetragen (14.400, 20.100, 30.000, 45.000, 66.000, 97.000 Dalton; Amersham Pharmacia, siehe Anhang 7.3.2). Spur 2 zeigt den Ultraschallaufschluss und die Spuren 3 bis 7 entsprechend die Proben nach 2, 5, 11, 17, 25 und 30 Minuten. Die rechte Seite zeigt die gemessenen Volumenaktivitäten in Blau und als Vergleich die Volumenaktivität der Referenzprobe in Rot.

Offensichtlich ist mit Glucose eine bessere osmotische Stabilisierung der Sphäroplasten möglich. Insbesondere die Spuren 3 und 4 auf dem SDS-PAGE-Gel zeigen eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den vorab präsentierten Ergebnissen. Trotzdem ist auch mit Glucose nach einer längeren Einwirkzeit des Lysozyms eine vollständige Lyse der Zellen zu beobachten. Mit ca. 74% der Volumenaktivität des Referenzexperiments wurden ähnliche Werte erreicht wie in den vorab beschriebenen Experimenten.

### 5.3.4 Beurteilung der verschiedenen Zellaufschlussverfahren

In einer Reihe von Experimenten wurden verschiedene Methoden zum Zellaufschluss untersucht. Erste Untersuchungen zum Aufschluss kleinerer Mengen an Biomasse mit Hilfe einer Schwingkugelmühle führten hinsichtlich der Ausbeute an Sulfitoxidase zu ebenso unbefriedigenden Ergebnissen wie Untersuchungen zum Aufschluss größerer Mengen durch Mörsern der Biomasse. Mit beiden Methoden wurden wesentlich geringere Ausbeuten erzielt als mit dem zu diesem Zeitpunkt etablierten Zellaufschlussverfahren per Ultraschall.

Durch eine eingehendere Untersuchung der Parameter Leistungseinstrahlung und Beschallungszeit konnte diese Aufschlussmethode weiter optimiert werden. Verschiedene Ergebnisse dieser Untersuchungen deuteten auf eine periplasmatische Lokalisierung der Sulfitoxidase hin. In einer weiteren Versuchsreihe wurden deshalb Methoden zum fraktionierten Zellaufschluss, d.h. zu einer gezielten Freisetzung der periplasmatischen Proteine ohne Zerstörung des cytoplasmatischen Raums, untersucht. Durch Optimierung der Parameter Temperatur und Behandlungsdauer konnten Bedingungen gefunden werden, die selektiv die Proteine des Periplasma freisetzen. Die Ausbeuten an Sulfitoxidase konnten jedoch trotz des Einsatzes des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid nur maximal auf 75% des Referenzaufschlusses per Ultraschall gebracht werden. Eine Abwägung zwischen den beiden Methoden „Aufschluss per Ultraschall“ und „Fraktionierter Zellaufschluss durch Lysozym“ fiel zu diesem Zeitpunkt wegen der höheren Ausbeuten zu Gunsten des Ultraschallaufschlusses aus. Die im nachfolgenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen zur chromatographischen Aufreinigung der Sulfitoxidase wurden also mit Rohextrakten aus Zellaufschlüssen per Ultraschall durchgeführt.

## 5.4 Untersuchungen zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* über Ionenaustauschchromatographie

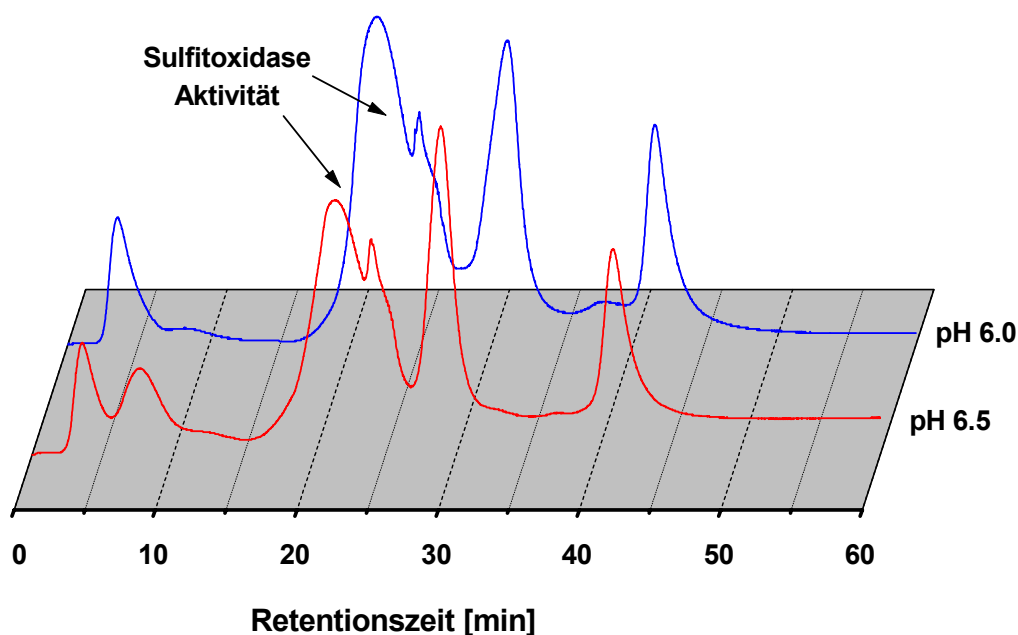
In Vorversuchen wurde auf gepackten Chromatographie-Matrizes das Bindungsverhalten an verschiedenen Ionenaustauscher-Medien untersucht. Später wurde dann auf ein Membranadsorber-Medium gewechselt.

Für die nachfolgend beschriebenen Chromatographie-Läufe wurde ein Niederdruckchromatographiesystem BioLogic LP (Fa. BioRad) verwendet. Mit dem System können über ein integriertes Ventil mit Mischkammer lineare Gradienten erzeugt werden. Dabei waren mit den installierten Pumpenschläuchen volumetrische Flussraten im Bereich von 0,2 bis 4 mL/min möglich. Die Detektion der eluierten Proteine erfolgte durch einen UV-Detektor, der mit zwei Filtern (Messwellenlängen 280 nm und 254 nm) und einer Durchflussmesszelle mit einer Länge von 2 mm ausgerüstet war. Zusätzlich waren eine Leitfähigkeitsmesszelle angeschlossen, mit der der Gradient überwacht werden konnte, und ein Fraktionensammler 2128. Die Aufnahme der Daten vom UV-Detektor und von der Leitfähigkeitszelle erfolgte über eine A/D-Wandlerkarte. Anfangs wurden die Daten mit einem selbstgeschriebenen Programm (Universität Leipzig) aufgenommen und gespeichert. Später wurde mit dem Programm LabTech Notebook gearbeitet. Mit keinem der Programme war jedoch eine Aufnahme und Darstellung von Absolutwerten für UV-Absorption (in mAU) und Leitfähigkeit (in mS/cm) möglich. Das vom BioLogic LP ausgegebene Spannungssignal wurde lediglich in einen Zahlenwert zwischen 0 und 1 übertragen und so dargestellt. Die Verarbeitung der Rohdaten zu einem Chromatogramm erfolgte dann mit der Software Origin 5.0.

### 5.4.1 Vorversuche zum Bindungsverhalten des Enzyms an verschiedenen Ionenaustauschern

Zur Abschätzung des Bindungsverhaltens des Enzyms an Ionenaustauschermedien wurden verschiedene Chromatographie-Läufe im kleinen Maßstab durchgeführt. Das Bindungsverhalten auf einem Anionenaustauscher-Medium wurde mit einer vorgepackten Econo-Pac-Säule untersucht. Verwendung fand eine High Q-Säule (5 mL, Fa. BioRad). Bei dem Gelmaterial handelt es sich um das Macro-Prep High Q-Gel, einen starken Anionenaustauscher mit der funktionellen Gruppe  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , als Ligand.

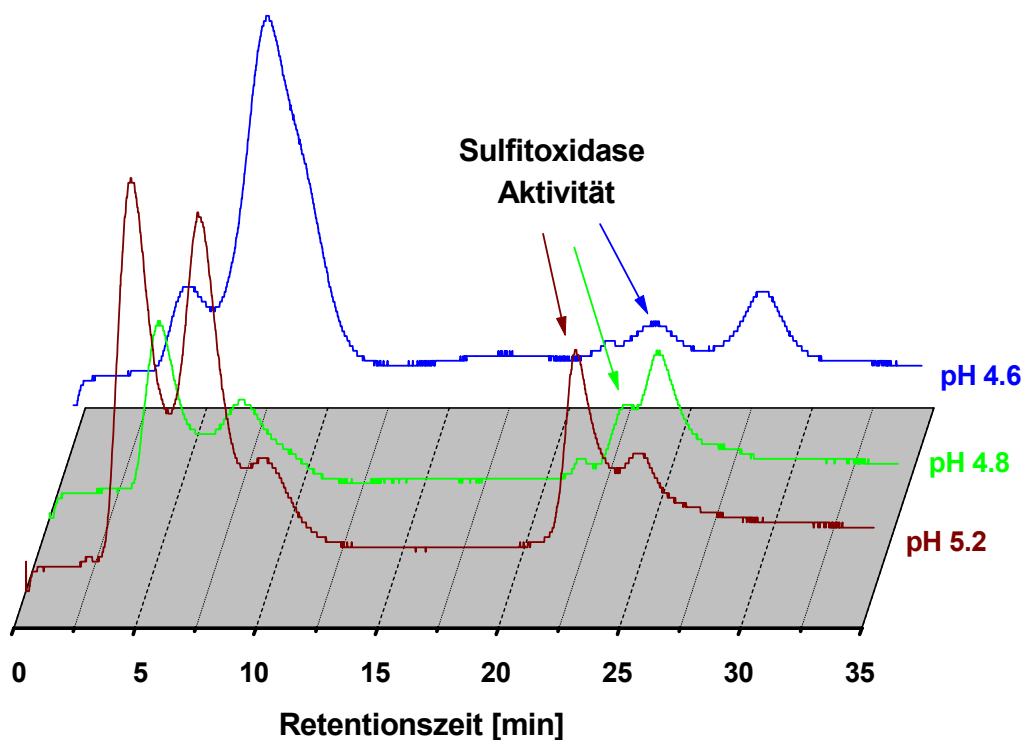
Als Puffer wurden 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0 und 6,5, verwendet. Abbildung 5-19 gibt einen Überblick über das Bindungs- und Elutionsverhalten der Sulfitoxidase auf diesem Anionenaustauscher-Medium.



**Abbildung 5-19:** Bindungsverhalten der Sulfitoxidase auf einem Anionenaustauscher-Medium. Verwendet wurde eine vorgepackte 5 mL EconoPac High S-Säule (BioRad). Elutionsbedingungen: Flussrate: 2 mL/min; 0-6 min Puffer A, 6-56 min 0-100% Puffer B. Puffer A: 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, Puffer B: 100 mM Kaliumphosphat-Puffer + 1 M NaCl.

Wie die Abbildung zeigt, waren im Elutionsprofil keine wesentlichen pH-Wert-abhängigen Änderungen festzustellen. Die Sulfitoxidase-Aktivität wurde außerdem in einem sehr großen Peak wiedergefunden, so dass weder eine Optimierung des pH-Wertes noch eine Optimierung des Gradienten großen Erfolg versprach. Eine Aufreinigung des Enzyms durch Anionenaustauschchromatographie wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Das Bindungsverhalten auf einem Kationenaustauscher-Medium wurde ebenfalls mit einer vorgepackten Econo-Pac Säule untersucht. Verwendet wurde eine High S-Säule (5 mL, Fa. BioRad), die mit dem Gelmaterial Macro-Prep High S, einem starken Kationenaustauscher mit der funktionellen Gruppe  $-\text{SO}_3^-$ , gefüllt war. Es wurden 20 mM Acetat-Puffer mit den pH-Werten pH 4,6, 4,8 und 5,2 eingesetzt. Abbildung 5-20 zeigt die Elutionsprofile auf dieser Kationenaustauscher-Matrix in Abhängigkeit vom pH-Wert.



**Abbildung 5-20:** Bindungsverhalten der Sulfitoxidase auf einem Kationenaustauscher-Medium. Verwendet wurde eine vorgepackte 5 mL EconoPac High S-Säule (BioRad). Elutionsbedingungen: Flussrate 2 mL/min; 0-6 min Puffer A, 6-56 min 0-100% Puffer B. Puffer A: 20 mM Acetat, Puffer B: 20 mM Acetat + 0,7 M NaCl.

Anders als beim Anionenaustauscher-Medium, waren beim Kationenaustauscher-Medium deutliche pH-Wert-abhängige Änderungen im Elutionsprofil festzustellen. Den größten Erfolg für eine Optimierung versprach das Elutionsprofil bei pH 4,6. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden deshalb mit 20 mM Acetat-Puffer, pH 4,6, auf einem Kationenaustauscher-Medium durchgeführt.

Bei diesen Untersuchungen wurde von einer gepackten Gelmatrix auf ein Membranadsorber-Medium gewechselt. Im nun folgenden Abschnitt wird erst das Prinzip der Membranchromatographie vorgestellt. Anschließend werden dann die mit einer Kationenaustauscher-Membran (Sartobind<sup>®</sup> S, Fa. Sartorius) erzielten Ergebnisse vorgestellt.

### 5.4.2 Membranadsorber-Medien in der Chromatographie

In den zurückliegenden Jahren wurden verstärkt Alternativen zur herkömmlichen Chromatographie mit gepackten Gelbetten entwickelt und vermarktet. Eine dieser neu entwickelten Techniken ist die Membranchromatographie (Brandt et al., 1988; Roper und Lightfoot, 1995; Thömmes und Kula, 1995; Charcosset, 1998). Anders als bei der herkömmlichen Chromatographie, befinden sich die funktionellen Gruppen hier nicht auf und innerhalb von Gelpartikeln, sondern auf mikroporösen Membranen, die von Probe und Puffern durchströmt werden.

Mikroporöse Membranen bieten einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Chromatographie-Matrizes:

- Membranen bieten einen geringen Strömungswiderstand. Dadurch sind hohe Flussraten, verbunden mit kurzen Verweilzeiten, bei geringen Transmembrandrücken möglich.
- An den Membranen finden fast ausschließlich konvektive Stofftransportvorgänge statt, wodurch praktisch keine diffusionsbedingten Hemmungen der Adsorption auftreten. Daraus resultieren bis zu zehnfach schnellere Bindungskinetiken im Vergleich zu gepackten Chromatographie-Matrizes (Briefs und Kula, 1992; McGregor et al., 1986; Prpic et al., 1993).
- Durch die gute Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen wird eine sterische Beanspruchung der Proteine weitestgehend unterbunden. Außerdem resultiert daraus eine hohe Bindungskapazität der Membranen (Champluvier und Kula, 1991; Charcosset et al., 1995; Krause et al., 1991; Lütkemeyer et al., 1993).
- Die Membranen selbst sind mechanisch hoch belastbar und bieten damit Vorteile gegenüber herkömmlichen Gelbetten, die, bedingt durch den sich entwickelnden Rückdruck, bei höheren Flussraten häufig nur eine geringe Gelbettstabilität aufweisen.
- Membran-chromatographische Verfahren erlauben ein relativ problemloses lineares Up-Scaling.

Die chromatographischen Techniken, die mit membrangebundenen Verfahren genutzt werden können, entsprechen weitgehend den aus der klassischen Chromatographie bekannten Techniken. So beschreiben z.B. Nachman et al. (1992) die Aufreinigung von humanem Interferon- $\alpha$ 2a und Interleukin 2 über eine Immunoaffinitätsmembran, und Champluvier und Kula (1992) berichten von der Aufreinigung von Glucose-6-phosphat Dehydrogenase über eine Cibacron Blue F3GA-Membran. Luksa et al. (1994) beschreiben die Aufreinigung des rekombinanten, humanen Tumor Nekrose Faktors (rh TNF) über membrangebundene hydrophobe Interaktionschromatographie, und Kubota et al. (1995) beschreiben die Charakterisierung einer hydrophoben Interaktionsmembran mit Hilfe von bovinem

Serumalbumin (BSA). Am weitesten verbreitet sind jedoch Membranen, die auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruhen (Sarfert und Etzel, 1997). Zietlow und Etzel (1995), Splitt et al. (1996) und Plate et al. (2000) beschreiben z.B. die Aufreinigung von Molkeproteinen, wie  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Lactoferrin, mit Hilfe von Ionenaustauschmembranen, und Petsch et al. (1997) beschreiben Untersuchungen zur Entfernung von bakteriellen Endotoxinen aus Puffern und Proteinlösungen mit Hilfe einer schwachen Anionenaustauscher-Membran.

Insbesondere Ionenaustauscher-Membranen werden mittlerweile von allen großen Herstellern von Filtrationsmembranen, wie z.B. Millipore, Sartorius und Pall, vermarktet. Dabei ist mittlerweile ein Trend zu Einwegmodulen festzustellen, der z.B. von der Fa. Pall mit der Produktreihe Mustang Q<sup>7</sup> bedient wird.

Hintergrund dieser Entwicklung sind sicherlich die immer strenger werdenden Zulassungsanforderungen für therapeutische Proteine. So werden nicht nur strenge Anforderungen an die Reinheit der Proteinzubereitungen gestellt, sondern auch die Reinheit der Prozesschemikalien und der Ausrüstung unterliegen strengen Anforderungen. Validierungsaktivitäten<sup>8</sup>, die die Zuverlässigkeit der einzelnen Produktionsschritte nachweisen sollen, verursachen im Bereich der Pharmafertigung nicht nur immense Kosten, sondern erfordern auch Zeit, und zwar bereits zum Zeitpunkt der Prozessentwicklung (Sofer und Hagel, 1997). Durch Verwendung von Einwegartikeln<sup>9</sup> kann ein wichtiger Teil dieser Validierungsaktivitäten eingeschränkt werden. Die Aspekte „Lebensdauer der Chromatographiemedien“ und „Reinigung der Chromatographiemedien“ können so bei der Prozessvalidierung ausgeklammert werden.

---

<sup>7</sup> „The first disposable process chromatography units“ (Pall, 2002).

<sup>8</sup> Die amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA) definiert Validierung als „Establishing documented evidence which provides a high degree of assurance that a specific process will consistently produce a product meeting its pre-determined specifications and quality attributes“ (FDA, 1987).

<sup>9</sup> Dies betrifft nicht nur die Chromatographiemedien, sondern auch und vor allem Gefäße für Puffer und Medien. In vielen Pharmabetrieben werden z.B. Puffer und Medien nicht mehr in Glasflaschen oder Edelstahlkesseln vorgelegt, sondern in sterilen Einweg-Kunststoffbehältern, die nach Beendigung des Prozesses entsorgt werden. Dies erspart den Aufwand der Reinigungsvalidierung.



### 5.4.3 Das verwendete Membran-System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Sartobind® Membranadsorbern (Fa. Sartorius) gearbeitet. Bei diesen handelt es sich um gebrauchsfertige Einheiten, die in verschiedenen Modi verwendet werden können. Als Spritzenvorsatzfilter oder mit peristaltischen Pumpen kann schnell adsorbiert / desorbiert werden. Als Bestandteil von Chromatographiesystemen können auch normale Elutionsprofile wie z.B. Gradienten- oder Stufenelutionen durchgeführt werden.

Das Gehäusematerial der verwendeten Sartobind® S 100-Einheiten ist Polysulfon, und die Membranen selbst bestehen aus regenerierter Cellulose. Als funktionelle Gruppen sind Sulfonsäuregruppen  $R-CH_2-SO_3^-$  immobilisiert. Die wichtigsten Eigenschaften des S 100-Moduls sind in Tabelle 5-5 zusammengefasst.



**Abbildung 5-21:** Sartobind®-Membranadsorber (Sartorius, 1998).

**Tabelle 5-4:** Eigenschaften des verwendeten Sartobind® S 100-Moduls (Sartorius, 1998).

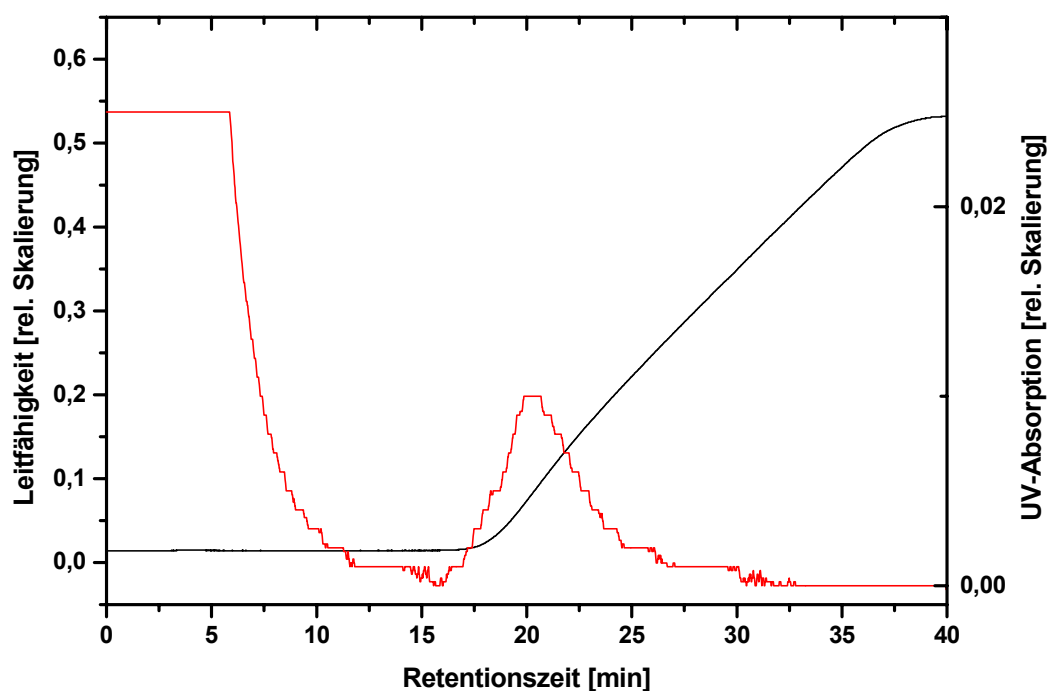
Membranmaterial	Regenerierte quervernetzte Cellulose
Membranfläche	100 cm <sup>2</sup>
Proteinbindungskapazität (Lysozym)	80 mg
Wiederfindung	90-100%
Flussrate	> 75 mL/min
Drucklimit	6 bar

Das Sartobind®-Modul wurde nach jedem Lauf entsprechend den Herstellerangaben mit 0,2N NaOH regeneriert und, bei längeren Benutzungspausen, in 20% Ethanol in 1M KCl gelagert.

#### 5.4.4 Untersuchungen zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* über ein Sartobind® S 100-Modul

Angelehnt an die Voruntersuchungen mit dem gepackten Säulenmaterial Macroprep High S (siehe Abschnitt 5.4.1), wurden die Untersuchungen mit dem Sartobind® S 100-Modul mit 20 mM Acetat-Puffer bei pH 4,6 durchgeführt. Die Rohextrakte wurden analog zu den in Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Standardbedingungen ebenfalls in 20 mM Acetat-Puffer, pH 4,6, hergestellt.

In einem ersten Chromatographie-Lauf wurde der Rohextrakt mit 20 mM Acetat-Puffer, pH 4,6, 1:5 verdünnt und es wurde etwa 1 mg Protein auf die Membran aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0% auf 100% 20 mM Acetat-Puffer, 0,7M NaCl, pH 4,6, in 20 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Wie Abbildung 5-17 zeigt, resultierte unter diesen Bedingungen ein einziger Peak.



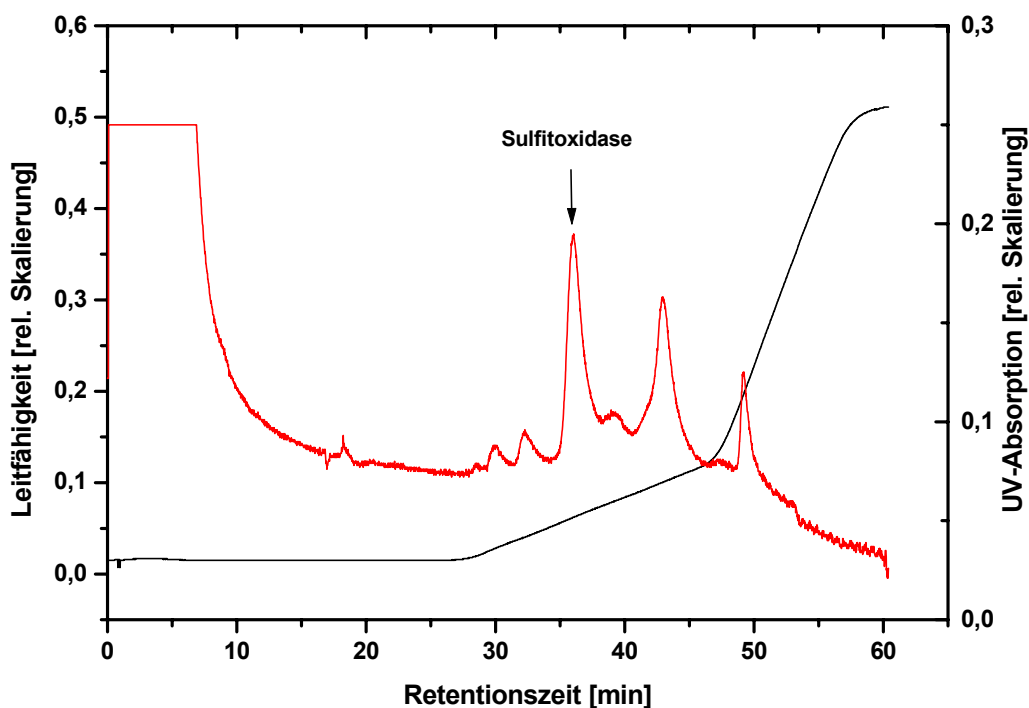
**Abbildung 5-22:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,7 M NaCl. Gradient: 0-100%B in 20 Minuten.

In einem weiteren Ansatz wurde die vierfache Menge an Protein (4 mg) auf die Membran aufgetragen, und es wurden die Elutionsbedingungen verändert. Die Elution erfolgte nun durch einen linearen Gradienten von 0 auf 20% 20 mM Acetat, 0,7M NaCl, pH 4,6, in 20 Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten von 20 auf 100% 20 mM Acetat, 0,7M NaCl, pH 4,6, in 10 Minuten.

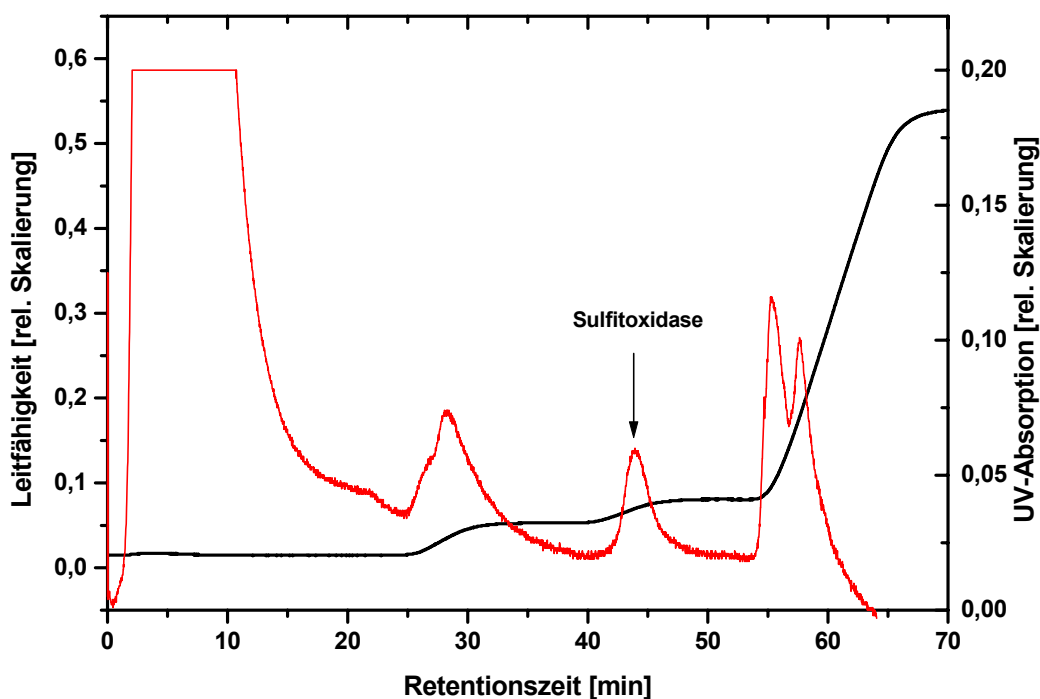
Abbildung 5-23 zeigt, dass unter diesen Bedingungen bereits eine deutliche Aufspaltung in mehrere Peaks zu beobachten war, die allerdings relativ schlecht voneinander getrennt waren.

Mit den gleichen Auftragsbedingungen wurde dann zu einem Stufen-Elutionsprofil gewechselt. Es wurde zuerst ein linearer Gradient in 5 Minuten auf 6% des Elutionspuffers gefahren. Diese Konzentration wurde für 10 Minuten beibehalten, um dann einen linearen Gradienten in 5 Minuten auf 11% des Elutionspuffers durchzuführen. Diese Konzentration wurde weitere 10 Minuten beibehalten, und erst dann erfolgte eine Elution der restlichen Proteine durch einen linearen Gradienten in 10 Minuten auf 100% 20 mM Acetat, 0,7M NaCl, pH 4,6.

Abbildung 5-24 zeigt, dass unter diesen Bedingungen ein relativ gut getrennter Peak resultiert, in dem die Sulfitoxidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte.



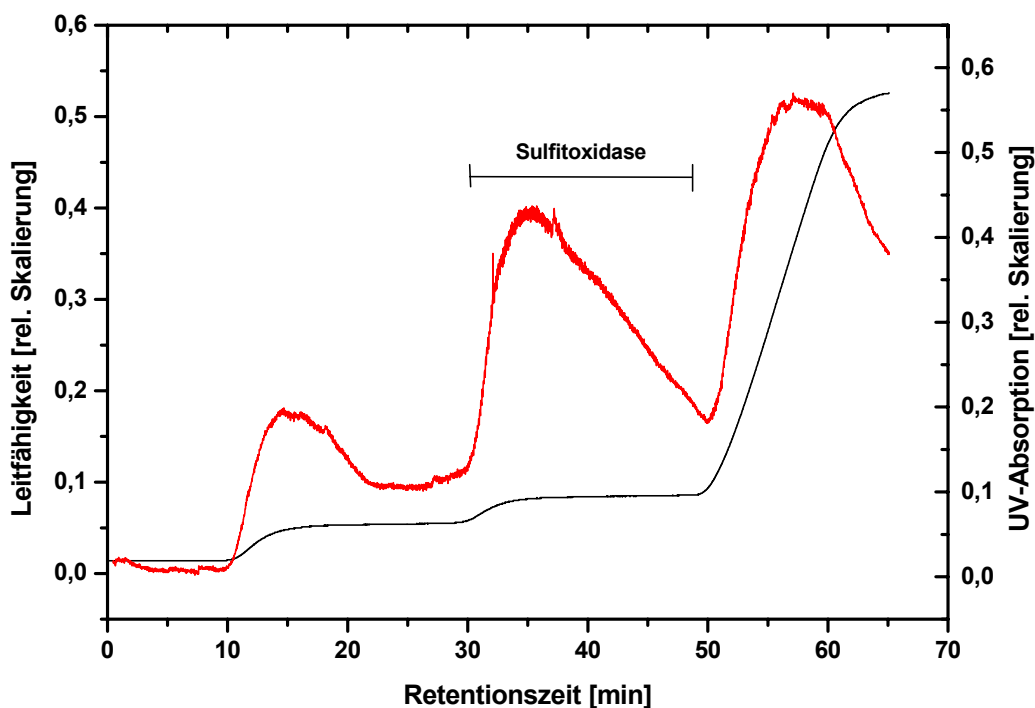
**Abbildung 5-23:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,7 M NaCl. Gradient: 0-20%B in 20 Minuten, dann 20-100%B in 10 Minuten.



**Abbildung 5-24:** Elutionsprofil Sartobind<sup>®</sup> S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,7 M NaCl. Stufe: 0-6% in 5 Minuten, dann 10 Minuten bei 6%B, dann 6-11%B in 5 Minuten, dann 10 Minuten 11%B, Gradient 11-100%B in 10 Minuten.

Mit neuem Rohextrakt wurde die Kapazität des Sartobind<sup>®</sup> S 100-Moduls für das Enzym Sulfitoxidase untersucht. Hierzu wurde der Rohextrakt (in 20 mM Acetat-Puffer, pH 4,6) mit einer Proteinkonzentration von 1,2 mg/mL über eine Peristaltikpumpe (Fa. Ismatec) auf die Membran aufgetragen. Die Flussrate dabei betrug 2 mL/min. Es wurde auch nach einem Auftrag von 50 Millilitern, entsprechend einer Proteinmenge von 60 mg kein Durchbruch der Sulfitoxidase festgestellt.

Das Membran-Modul wurde wieder an das BioLogic-Chromatographiesystem angeschlossen. Die Elution erfolgte, wie oben beschrieben durch zwei Stufen auf 6% bzw. auf 11% 20 mM Acetat-Puffer, 0,7M NaCl, pH 4,6. Wie der Abbildung 5-25 zu entnehmen ist, wurden die Haltezeiten auf den einzelnen Stufen allerdings auf 20 Minuten verlängert.

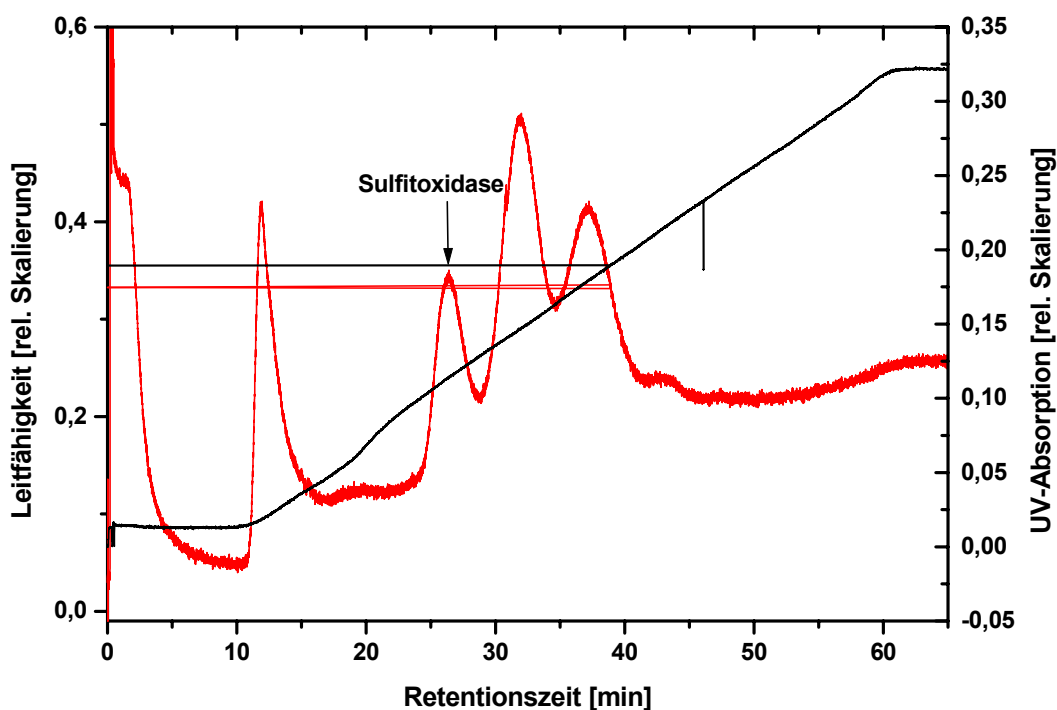


**Abbildung 5-25:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,7 M NaCl. Stufe: 0-6% in 5 Minuten, dann 20 Minuten bei 6%B, dann 6-11%B in 5 Minuten, dann 20 Minuten 11%B, Gradient 11-100%B in 10 Minuten.

Unter diesen Bedingungen wurde, infolge der hohen Beladung, bei allen Peaks ein sehr ausgeprägtes Tailing beobachtet. Die Sulfitoxidase eluierte unter diesen Bedingungen über einen Bereich von mehr als 20 Minuten (über 40 mL Elutionsvolumen). Mit den vom Hersteller empfohlenen höheren Flussraten (im Bereich von 50 mL/min) wäre diesem Problem wohl beizukommen. In diesem Flussratenbereich konnte mit dem Niederdrucksystem BioLogic LP jedoch nicht mehr gearbeitet werden.

In weiteren Experimenten wurden dann die Elutionsbedingungen weiter optimiert. Als erste Maßnahme wurde dabei die Zusammensetzung des Elutionspuffers B verändert. Die NaCl-Konzentration wurde auf 0,2 mol/L reduziert, so dass sich der Elutionspuffer folgendermaßen zusammensetzte: 20 mM Acetat, 0,2M NaCl, pH 4,6.

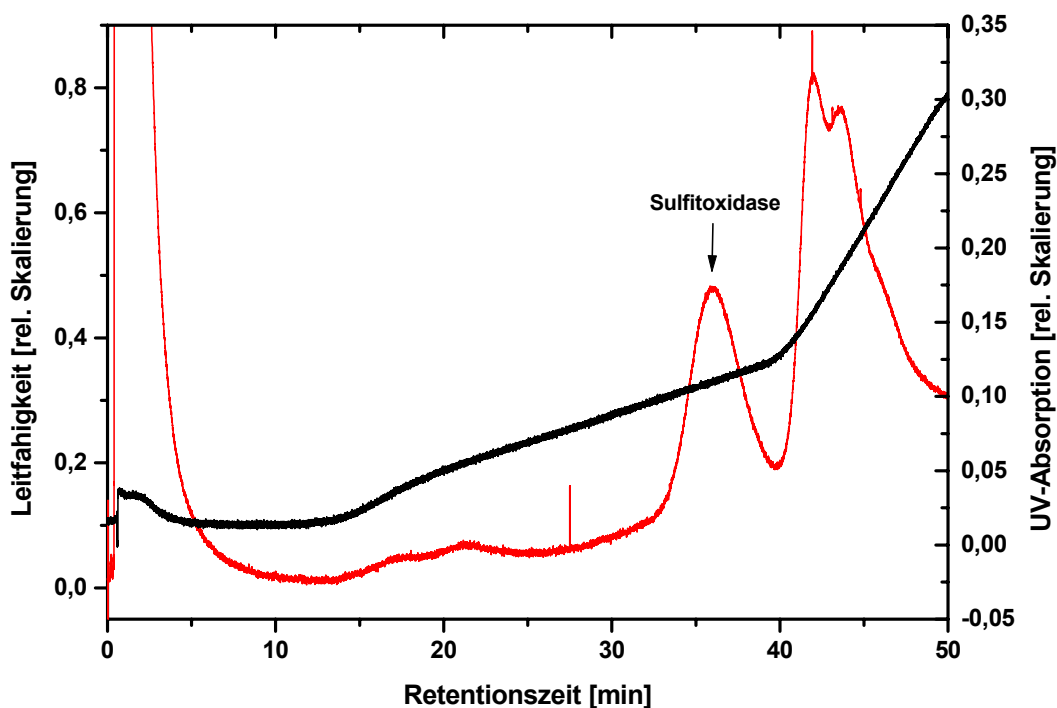
Abbildung 5-26 zeigt das Elutionsprofil eines Chromatographie-Laufs mit einem linearen Gradienten von 0 auf 100% 20 mM Acetat, 0,2M NaCl, pH 4,6, in 50 Minuten.



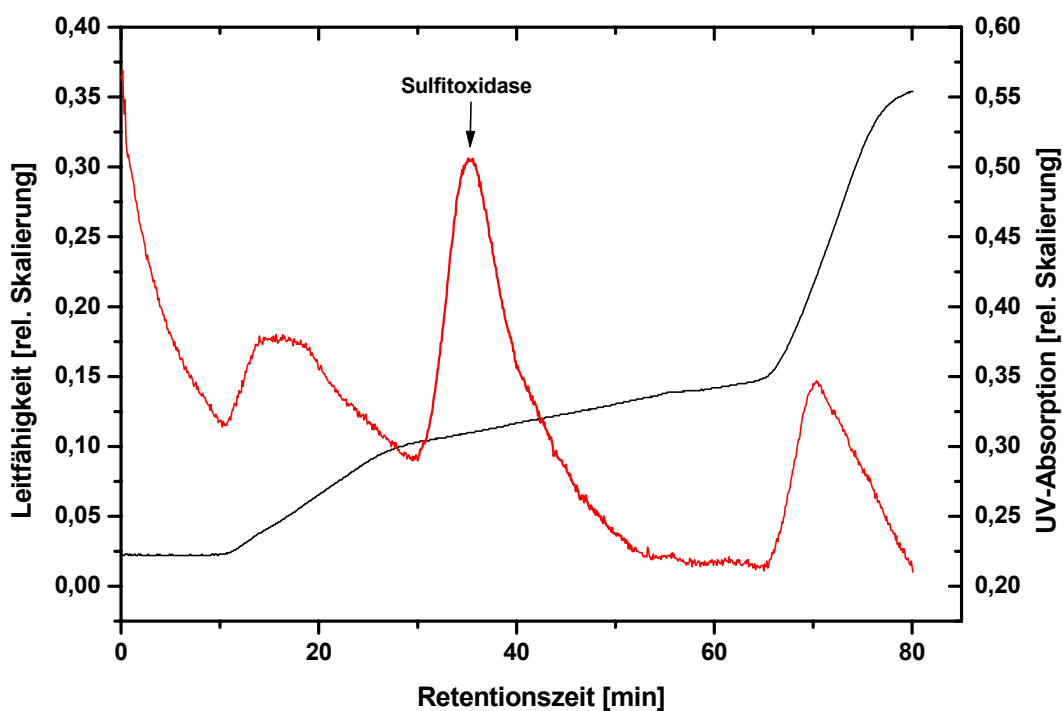
**Abbildung 5-26:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,2 M NaCl. Gradient: 0-100% in 50 Minuten.

In weiteren Optimierungen wurde dann die Steilheit des Gradienten angepasst. Abbildung 5-27 zeigt das Ergebnis eines Laufes mit einer Gradientensteigung von 35% in 30 Minuten. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Sulfitoxidase-Peak besser von den nachfolgenden Peaks getrennt wird.

Abbildung 5-23 zeigt einen Lauf mit einer Gradientensteigung von 15% in 30 Minuten im Elutionsbereich der Sulfitoxidase. Unter diesen Bedingungen ist eine relativ gute Trennung von den benachbarten Peaks möglich, allerdings weist das Elutionsprofil im Elutionsbereich der Sulfitoxidase ein Tailing auf.



**Abbildung 5-27:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,2 M NaCl. Gradient: 0-35% in 30 Minuten, dann Gradient 35-100%B in 10 Minuten.

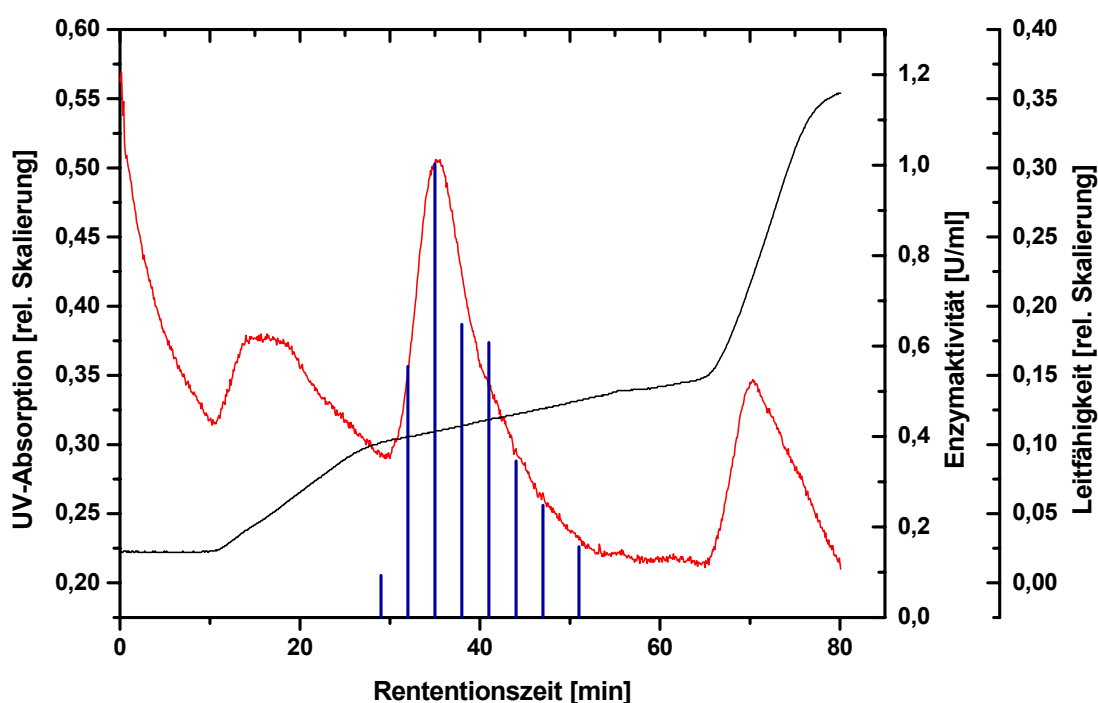


**Abbildung 5-28:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,2 M NaCl. Gradient: 0-20% in 15 Minuten, dann Gradient: 20-35%B in 30 Minuten, dann Gradient: 35-100%B in 10 Minuten.

## 5.5 Ein Konzept zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *S. pontiacus*

Aufbauend auf den in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Ergebnissen, wurde ein Ansatz zur Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* entwickelt. Dieser umfasst nach der Abtrennung der Biomasse vom Kultivierungsmedium einen Zellaufschluss per Ultraschall, eine Kationenaustausch-Chromatographie-Stufe und eine Ultrafiltrationsstufe.

Der Aufschluss wurde mit den in Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Parametern in 20 mM Acetat-Puffer, pH 4,6, durchgeführt. Direkt im Anschluss wurde der Rohextrakt über eine Membran-Ionenaustauschchromatographie auf dem starken Kationenaustauscher Sartobind® S 100 aufgereinigt. Abbildung 5-29 zeigt das aus der Parameteroptimierung in Abschnitt 5.4.4 resultierende Elutionsprofil mit den Volumenaktivitäten in den einzelnen Fraktionen.



**Abbildung 5-29:** Elutionsprofil Sartobind® S 100. Flussrate: 2 mL/min; Puffer A: 20 mM Acetat, pH 4,6; Puffer B: Puffer A + 0,2 M NaCl. Gradient: 0-20% in 15 Minuten, dann Gradient: 20-35%B in 30 Minuten, dann Gradient: 35-100%B in 10 Minuten. In Blau sind die Volumenaktivitäten der jeweiligen Fraktionen angegeben.

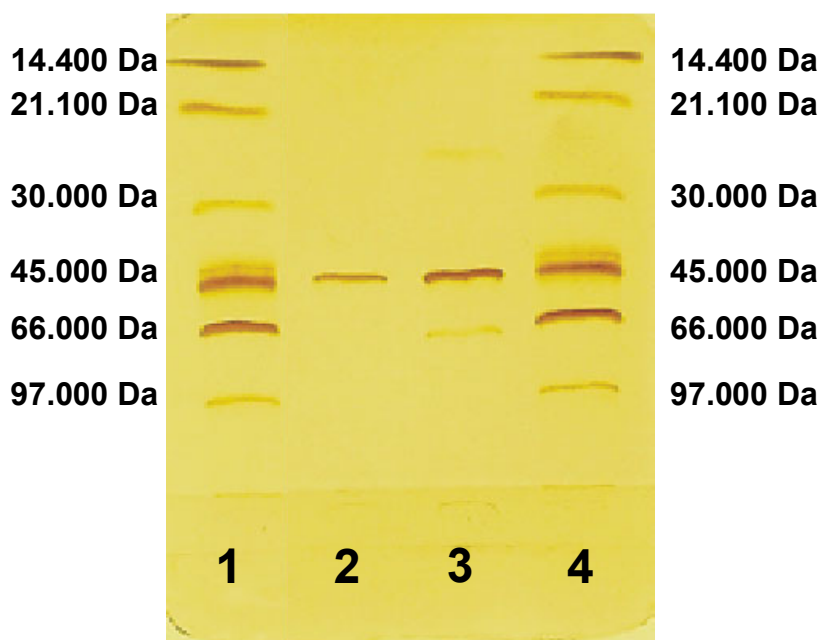
Von den Eluatfraktionen wurden die mit der höchsten Sulfitoxidase-Aktivität (Fraktionen 31-43) gepoolt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde bereits ein Aufreinigungsfaktor von 8 erreicht. Der Pool der Eluatfraktionen wurde einer Ultrafiltration unterzogen. Hierzu wurde dieser in zwei Durchgängen über einen Zentrifugalkonzentrator auf ca. 10% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Eingesetzt wurde ein Vivaspin 20-Modul mit einem Cut-Off von 30 kDa (Fa. Vivascience). Durch diesen Ultrafiltrationsschritt konnte eine weitere Aufreinigung um den Faktor 2,6 erreicht werden (siehe Tab. 5-5).



**Tabelle 5-5:** Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus*.

Fraktion	Vol. [mL]	Vol.- Akt. [U/mL]	Prot.- gehalt [µg/mL]	Gesamt- protein [µg]	Spez. Akt. [U/mg]	Units [U]	Ausbeute [%]
Rohex.	10	3,17	141	1415	22,5	31,76	100
IEC- Eluatpool	24	0,61	3,42	82,1	178,0	14,61	46
UF	2,2	6,24	13,57	29,9	460	13,73	43

Insgesamt resultiert aus dieser Abfolge an Schritten bereits ein sehr reines Produkt (Abb. 5-30) bei einem Aufreinigungsfaktor von ca. 20.



**Abbildung 5-30:** SDS-PAGE-Gel der aufgereinigten Sulfitoxidase (Laufrichtung: nach oben). In den Spuren 1 und 4 ist ein Low Molecular Weight Calibration Kit aufgetragen (14.400, 20.100, 30.000, 45.000, 66.000, 97.000 Dalton; Amersham Pharmacia, siehe Anhang 7.3.2). Die Spuren 2 und 3 zeigen das Retentat der Ultrafiltration.

Wegen der relativ eng gewählten Schnittgrenzen bei der Kationenaustausch-Chromatographie resultiert bei diesem Schritt eine Ausbeute von nur ca. 46%. Insgesamt ergibt sich eine Ausbeute von 43%, bezogen auf den Rohextrakt.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Das marine Bakterium *Sulfitobacter pontiacus* wurde während Untersuchungen zum Schwefelstoffwechsel an einer Schwefelwasserstoff- / Sauerstoffgrenzschicht im Schwarzen Meer isoliert. Der Organismus fiel dabei durch eine relativ niedrige Aktivität bezüglich der Oxidation von Thiosulfat, aber durch eine sehr hohe Aktivität bezüglich der Oxidation von Sulfit zum Sulfat auf. Für diese Aktivität ist eine lösliche AMP-unabhängige Sulfitoxidase verantwortlich. Ein möglicher Einsatz des Enzyms als Biokomponente eines Sulfit-Biosensors hat die Aufmerksamkeit auf dieses Enzym und den Organismus *S. pontiacus* gelenkt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Kultivierungsprozess von *S. pontiacus* im Hinblick auf eine Produktion der Sulfitoxidase zu optimieren. Da es sich bei der Sulfitoxidase um ein intrazelluläres Enzym handelt, war ein Optimierungsziel die Produktion möglichst großer Mengen an Biomasse. Andererseits musste die Biomasse natürlich auch große Mengen an Sulfitoxidase enthalten, so dass nicht ausschließlich auf das Ziel „Biomasseproduktion“ hin optimiert werden konnte. Um eine grundsätzliche Beurteilung des Optimierungserfolges zu ermöglichen, wurde ein Gütefaktor definiert, der sich aus dem Produkt aus „Biotrockenmasse“ und „Spezifische Sulfitoxidase-Aktivität im Rohextrakt“ ergab. Das Optimierungsziel konnte demnach als eine Maximierung des Gütefaktors definiert werden.

Die Optimierung des Kultivierungsmediums wurde ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Medium zur Kultivierung mariner Mikroorganismen, dem Medium Marine Broth 2216, betrieben. Für die Induzierung von Sulfitoxidase-Aktivität ist die Anwesenheit von Sulfit im Kultivierungsmedium zwingend erforderlich. Sulfit ist in wässrigen Lösungen jedoch relativ instabil und wird in Gegenwart von Sauerstoff leicht zum Sulfat oxidiert. Um den Einfluss der diese Reaktion katalysierenden Übergangsmetall-Kationen zu reduzieren, wurde der Einsatz des Komplexbildners EDTA untersucht. EDTA bewirkte zwar eine leichte Reduzierung der Ausbeuten an Biomasse, die erzielten Sulfitoxidase-Aktivitäten stiegen jedoch, ebenso wie der Gütefaktor, signifikant an.

Als weitere wichtige Einflussgröße für den Erfolg der Kultivierung wurde die Anfangskonzentration der Kohlenstoffquelle Acetat identifiziert. Es wurde festgestellt, dass höhere Konzentrationen an Acetat zwar zu etwas höheren Biomasseausbeuten führen, dass aber bei einer Acetatanfangskonzentration von nur 20 mmol/L eindeutig die höchsten spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten resultierten. Auch der für die Beurteilung der Kultivierung wichtigere Gütefaktor lag, im untersuchten Konzentrationsbereich, bei der niedrigsten Acetatanfangskonzentration von 20 mmol/L am höchsten.

Bei Vertretern der Gattung *Thiobacillus*, einer Gruppe gram-negativer Bakterien, die, ebenso wie *S. pontiacus*, zur Energiegewinnung durch Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen befähigt ist, wurde Sulfit als Schlüsselintermediat bei der Oxidation von Thiosulfat identifiziert. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Thiosulfat auf Kultivierungen von

*S. pontiacus* untersucht. Experimente mit zwei verschiedenen Thiosulfatkonzentrationen und drei verschiedenen Acetatanfangskonzentrationen haben dabei ganz eindeutig gezeigt, dass mit Thiosulfat im Medium zwar höhere Biomasseausbeuten erreicht werden, dass aber andererseits die spezifischen Sulfitoxidase-Aktivitäten im Vergleich zu Experimenten mit Sulfit als reduzierter Schwefelspezies deutlich niedriger lagen. Eine parallel durchgeführte Versuchsreihe mit Thiosulfat und Sulfit als zusätzlicher reduzierter Schwefelspezies zeigte, dass Thiosulfat auch unter diesen Bedingungen keinen positiven Einfluss auf die Leistung des Prozesses hat. Die Gütefaktoren lagen unter allen untersuchten Bedingungen deutlich unter denen vergleichbarer Experimente mit Sulfit als einziger reduzierter Schwefelspezies.

Als ein wichtiges Problem bei der Kultivierung von *S. pontiacus*, insbesondere in Schüttelkultur, wurde die durch die Zugabe des Sulfits ausgelöste pH-Wert-Änderung erkannt. Als Lösung für dieses Problem wurde die Pufferung der Kultivierungsmedien untersucht. Klassische Pufferkomponenten, wie z.B. Phosphat, kamen für einen Einsatz in *S. pontiacus*-Medien nicht in Frage, so dass einer der Good-Puffer, nämlich HEPES, eingehender untersucht wurde. In einem Referenzexperiment, bei dem auf die Zugabe von Sulfit verzichtet wurde, konnte festgestellt werden, dass HEPES im Konzentrationsbereich von 20-150 mmol/L das Wachstum von *S. pontiacus* nicht beeinflusst. Sobald jedoch die HEPES-gepufferten Kulturen mit Sulfit versetzt wurden, zeigte sich, dass mit zunehmender HEPES-Konzentration das Wachstum schlechter wurde. Bei einer HEPES-Konzentration von 150 mmol/L wurden nur noch 18% der Biomasse des Experiments ohne HEPES erreicht. In einem weiteren Experiment wurden dann Schüttelkulturen mit 100 mmol/L HEPES untersucht, die mit unterschiedlichen Sulfitmengen behandelt wurden. Hier zeigte sich, dass unter dem Einfluss von HEPES deutlich geringere Sulfitkonzentrationen ausreichen, um Sulfitoxidase-Aktivität zu induzieren. Dieser wichtige Effekt wurde auf eine Hemmung der Sulfitoxidation durch HEPES zurückgeführt und hat sowohl Auswirkungen auf Kultivierungen von *S. pontiacus* in Schüttelkolben wie auch auf Kultivierungen im Fermenter. In beiden Fällen kann die Menge an zugegebenem Sulfit deutlich reduziert werden, was gerade im Falle von Schüttelkulturen die Handhabung der Kulturen wesentlich vereinfacht. Bei Fermenterkulturen, denen kontinuierlich Sulfit zugeführt wird, konnte durch diesen Effekt die durch die Sulfitzufütterung verursachte Verdünnung des Kultivierungsmediums drastisch reduziert werden. Aufbauend auf den beschriebenen Ergebnissen, wurde ein optimiertes Kultivierungsmedium etabliert, welches sowohl in Schüttelkulturen wie auch in Fermenterkulturen zu deutlichen Steigerungen des Gütefaktors im Vergleich zum nicht-optimierten Medium führt. Mit diesem optimierten Medium, einem 50%igen Marine Broth 2216-Medium mit 22 g/L NaCl, 20 mol/L Acetat, 51,3 µmol/L EDTA und 50 mmol/L HEPES, wurden in Schüttelkultur die optimalen Zeitpunkte für die Induktion der Sulfitoxidase-Aktivität und für die Ernte der Biomasse ermittelt. Es zeigte sich, dass eine Induktion etwa in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase ideal ist. Als Erntezeitpunkt

sollte das Ende der exponentiellen Wachstumsphase, oder der Beginn der stationären Wachstumsphase gewählt werden.

Für eventuell beabsichtigte weitere Ansätze zur Mediumsoptimierung in Form von Schüttelkolbenexperimenten wurde die Sulfitversorgung der Kulturen als das Schlüsselproblem erkannt. Insbesondere für den Fall, dass das Kultivierungsmedium in Form einer Multiparameteroptimierung verbessert werden soll, wäre eine kontinuierliche Versorgung der Kulturen mit Sulfit wünschenswert. Diese sollte allerdings ohne größeren apparativen Aufwand möglich sein. Für dieses Problem wurde ein Lösungsansatz, basierend auf der Immobilisierung schwer löslicher Sulfite, entwickelt. Untersucht wurden die Erdalkalimetallsulfite  $\text{CaSO}_3$  und  $\text{MgSO}_3$  und die Immobilisierungsmatrices Calciumalginat und Polyvinylalkohol. Dabei wurde festgestellt, dass die Immobilisierungsmatrix Calciumalginat für den Einsatz in salzreichen, marinen Medien ungeeignet ist, da sich die Alginat-Gele infolge der hohen Salzkonzentrationen relativ schnell wieder auflösen. Polyvinylalkohol-Gele, deren Verwendung mit dem kommerziell erhältlichen LentiKat<sup>®</sup>-System untersucht wurde, haben sich dagegen als geeignete Immobilisierungsmatrix herausgestellt. Es wurden Schüttelkulturen mit in LentiKat<sup>®</sup>-Linsen immobilisiertem Calciumsulfit durchgeführt, die zu Biomasse mit Sulfitoxidase-Aktivität führten. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse für einen tatsächlichen Einsatz in Experimenten zur Mediumsoptimierung noch nicht ausreichend ist. Hier besteht für die Zukunft noch Optimierungsbedarf. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Magnesiumsulfit-Immobilisate zu Sulfitkonzentrationen im Kultivierungsmedium führen, die von *S. pontiacus* nicht mehr toleriert werden. Es wurde also eindeutig nachgewiesen, dass Magnesiumsulfit für die beschriebene Anwendung nicht geeignet ist.

Ein weiteres wichtiges Ziel, neben der Optimierung der Kultivierungsbedingungen, war die Gewinnung des Enzyms Sulfitoxidase aus der *S. pontiacus* Biomasse. In Voruntersuchungen wurden Stabilitätsbereiche bezüglich der Temperatur und des pH-Werts ermittelt. Es wurde dabei festgestellt, dass das Enzym ein Temperaturoptimum von 33°C hat und dass Temperaturen über 35°C während der Proteinaufreinigung vermieden werden sollten, um Schädigungen der Sulfitoxidase auszuschließen. Als Arbeitsbereich bezüglich des pH-Wertes konnte ein Bereich von pH 4,6 bis pH 8,5 ermittelt werden. Unterhalb von pH 4,6 konnte, wahrscheinlich infolge von Denaturierungsprozessen, keine Enzymaktivität mehr gemessen werden, und auch oberhalb von pH 8,5 sank die Enzymaktivität deutlich ab. Die Stabilität des Enzyms im Rohextrakt ist relativ gering. Es wurde festgestellt, dass nach fünf Stunden bei Raumtemperatur nur noch ca. 20% der ursprünglichen Enzymaktivität vorhanden waren. Bei einer Aufbewahrung des Rohextraktes bei -20°C konnten dagegen auch nach mehreren Tagen, und bei einer Aufbewahrung bei -80°C auch nach mehreren Wochen keine Aktivitätsverluste festgestellt werden. Die Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* wurde, beginnend bei der Abtrennung der Biomasse vom Kultivierungsmedium und dem

Aufschluss der Zellen, eingehend untersucht. Als mechanische Verfahren zum Zellaufschluss wurden der Aufschluss mit der Schwingkugelmühle, das Mörsern der Biomasse und der Aufschluss per Ultraschall untersucht. Es stellte sich schnell heraus, dass sowohl das Mörsern der Biomasse als auch der Aufschluss mit der Schwingkugelmühle hinsichtlich der Effektivität nicht mit dem Aufschluss per Ultraschall konkurrieren können. Eine eingehendere Untersuchung wurde also nur für den Ultraschallaufschluss durchgeführt. Durch Variation der Parameter „Leistungseintrag“ und „Behandlungsdauer“ konnten Bedingungen gefunden werden, die zu einer hohen Freisetzung des Enzyms Sulfitoxidase führten. Eine parallel durchgeführte Untersuchung zum Ultraschallaufschluss in Gegenwart von EDTA im Aufschlusspuffer hat gezeigt, dass unter diesen Bedingungen deutlich mildere Bedingungen ausreichen, um die Sulfitoxidase freizusetzen. Anhand des Zellwandaufbaus gram-negativer Bakterien wurde dieser Effekt durch eine mögliche Lokalisierung des Enzyms im Periplasma erklärt. Da eine selektive Freisetzung der periplasmatischen Proteine deutliche Vorteile für die spätere Aufreinigung des Enzyms hat, wurden Untersuchungen zum fraktionierten Zellaufschluss der *S. pontiacus*-Biomasse durch Einwirkung von Lysozym und EDTA, bei gleichzeitiger osmotischer Stabilisierung der resultierenden Sphäroplasten, durchgeführt. Bei diesen Experimenten konnte tatsächlich eine periplasmatische Lokalisierung des Enzyms gezeigt werden. Als osmotische Stabilisatoren wurden Saccharose und Glucose eingesetzt, außerdem wurde der Parameter „Temperatur“ verändert und es wurde der Einsatz des Proteaseinhibitors PMSF untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass unter der Einwirkung von PMSF deutlich geringere Aktivitätsverluste resultierten. Außerdem wurde festgestellt, dass bereits Temperaturen von 10°C ausreichen, um einen Aufschluss des periplasmatischen Raums zu bewirken. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glucose als osmotischer Stabilisator besser geeignet ist als Saccharose. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass selbst mit PMSF, bei einer Temperatur von 10°C und mit Glucose als osmotischem Stabilisator, nur ca. 70-75% der Sulfitoxidase-Aktivität des Referenzauflusses per Ultraschall freigesetzt wurden. Außerdem wurde beobachtet, dass, unter allen untersuchten Bedingungen, bei längerer Einwirkzeit des Lysozyms eine vollständige Lyse der Zellen resultierte. Selbst mit Glucose scheint die osmotische Stabilisierung der Sphäroplasten also nicht ausreichend zu sein. In der Zukunft sollten also andere Stabilisatoren, wie z.B. NaCl, untersucht werden.

Wegen der höheren Gesamtausbeute an Sulfitoxidase wurden die nachfolgenden Untersuchungen zur chromatographischen Aufreinigung des Enzyms mit Rohextrakten aus Ultraschallaufschlüssen durchgeführt. In Voruntersuchungen wurde das Bindungsverhalten der Sulfitoxidase an Ionenaustauscher-Medien untersucht. Eingesetzt wurden hierfür klassische Gel-Medien, die in Form von vorgepackten Säulen zur Verfügung standen. Auf dem eingesetzten starken Anionenaustauscher-Medium waren keine relevanten pH-Wert-abhängigen Änderungen im Elutionsprofil feststellbar. Die Elutionsprofile auf dem starken Kationenaustauscher-Medium zeigten hingegen deutliche Abhängigkeiten vom pH-Wert. Die

besten Aussichten für eine Optimierung versprach dabei das Elutionsprofil bei pH 4,6. Für die nachfolgende Untersuchung der chromatographischen Aufreinigung wurde dann auf ein membrangebundenes Chromatographiesystem, nämlich das System Sartobind® S 100, gewechselt. Durch Variation der Elutionsbedingungen hinsichtlich der Zusammensetzung des Elutionspuffers und der Steilheit des Gradienten konnten Bedingungen etabliert werden, die zu einer guten Aufreinigung des Enzyms führten. Durch eine sehr enge Festsetzung der Peak-Schnittgrenzen während der Elution lag die Ausbeute auf dieser Stufe allerdings unter 50%. Eine nachfolgend durchgeführte Ultrafiltration des Eluates über eine Ultrafiltrationsmembran mit einem Cut-Off von 30 kDa führte schließlich, bei geringen zusätzlichen Ausbeuteverlusten, zu einer weiteren Aufreinigung des Enzyms. Durch die Abfolge „Kationenaustausch-Chromatographie – Ultrafiltration“ konnte eine Aufreinigung des Enzyms um den Faktor 20 erreicht werden. Die Abfolge

„Zellaufschluss per Ultraschall – Kationenaustausch-Chromatographie bei pH 4,6 –  
Ultrafiltration über eine 30 kDa-Membran“

stellt also *ein* mögliches Schema für die Aufreinigung der Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* dar. Ausgehend von einer Kultivierung im 10 Liter-Maßstab, die eine Biofeuchtmasse von ca. 60 g liefert, könnten nach diesem Aufreinigungsschema ca. 1000-2000 Units der Sulfitoxidase gewonnen werden.

In der Zukunft sollte eine weitere Optimierung des Kultivierungsmediums, ausgehend von einem definierten Basismedium, erfolgen. Hier ist sicherlich insbesondere die Konzentration der verschiedenen Übergangsmetall-Kationen von großer Bedeutung. Eine Weiterentwicklung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Ansatzes der Sulfitversorgung durch immobilisierte schwer lösliche Sulfitpezies sollte hierbei einen wesentlichen Beitrag leisten.

Ausgehend von einem weiterentwickelten fraktionierten Zellaufschluss, könnte außerdem ein alternatives Aufreinigungsschema für die Sulfitoxidase aus *S. pontiacus* entwickelt werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Zusammensetzung der Kultivierungsmedien

#### 7.1.1 Marine Broth 2216

Das Basismedium Marine Broth 2216 wurde als fertige Mischung von Difco bezogen. Die Zusammensetzung des Mediums geht aus Tabelle 7-1 hervor. Für ein 100%iges Medium müssen von der Fertigmischung 37,4 g pro Liter des fertigen Mediums eingewogen werden.

**Tabelle 7-1:** Zusammensetzung des Basismediums Marine Broth 2216.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
NaCl	19,45 g/L
MgCl <sub>2</sub>	8,8 g/L
Pepton	5,0 g/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	3,24 g/L
CaCl <sub>2</sub>	1,8 g/L
Hefe-Extrakt	1,0 g/L
KCl	0,55 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	0,16 g/L
Fe(III)-Citrat	0,1 g/L
KBr	0,08 g/L
SrCl <sub>2</sub>	0,03 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,02 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 mg/L
Na <sub>2</sub> Si <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	5,3 mg/L
NaF	2,4 mg/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,6 mg/L

#### 7.1.2 Andere Medien: MB50, MB50+EDTA und MB50+EDTA+HEPES

Die Einwaagen für die Medien MB50, MB50+EDTA und MB50+EDTA+HEPES können der Tabelle 7-2 entnommen werden.

Die Medien wurden auf einen pH-Wert von 7,3-7,5 eingestellt und bei 30 Minuten bei 121°C autoklaviert (Laborautoklav, Fa. Fedegari). Für feste Medien (Agarplatten) wurden zusätzlich 15% (w/v) Agar-Agar eingewogen.

**Tabelle 7-2:** Zusammensetzung der Kultivierungsmedien MB50, MB50+EDTA und MB50+EDTA+HEPES.

Substanz	MB50	MB50	MB50
	Menge	+EDTA Menge	+EDTA +HEPES Menge
Marine Broth 2216	18,70 g/L	18,70 g/L	18,70 g/L
Natriumchlorid	12,27 g/L	12,27 g/L	12,27 g/L
Natriumacetat-Trihydrat	2,72 g/L	2,72 g/L	2,72 g/L
EDTA (Lösung 19,26 g/L)		1,00 mL/L	1,00 mL/L
HEPES			11,92 g/L

Bei Fermenterkulturen zusätzlich:

Desmophen 3900 (1:10)	1,00 mL/L	1,00 mL/L	1,00 mL/L
-----------------------	-----------	-----------	-----------

## 7.2 Etablierung eines Assays zur Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität

In der Literatur werden verschiedene Assay-Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Sulfitoxidasen beschrieben. Insbesondere für die Untersuchung von Säuger-Sulfitoxidasen hat sich ein Assay mit Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor durchgesetzt. So erfolgt z.B. die Bestimmung der Aktivitäten der –bei Sigma-Aldrich und ICN kommerziell erhältlichen– Sulfitoxidasen aus Hühnerleber mit Cytochrom *c* aus Pferde- oder Hühnerherzen. Die Reaktion läuft nach der folgenden Gleichung ab:



Detektiert wird die Zunahme der Absorption bei 550 nm (Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom *c*).

Sowohl für eukaryontische als auch für prokaryontische Sulfitoxidasen wird ein anderes Verfahren sehr häufig beschrieben. Bei diesem Assay wird Kaliumhexacyanoferrat (III) als Elektronenakzeptor eingesetzt. Die Reaktion verläuft dabei nach der folgenden Gleichung:



Detektiert wird die Abnahme der Absorption bei 420 nm (Absorptionsmaximum des Kaliumhexacyanoferrats (III)).

Weniger verbreitet sind hingegen Verfahren, die mit anderen Elektronenakzeptoren (z.B. Metylenblau) arbeiten, oder direkt manometrisch die Abnahme der Sauerstoffkonzentration



detektieren (Warburg-Methode). Tabelle 7-2 gibt einen Überblick über die verbreitetsten Methoden.

**Tabelle 7-3:** Assayverfahren für Sulfitoxidasen verschiedener Herkunft.

Herkunft der Sulfitoxidase	Elektronenakzeptor	Literatur
Hühnerleber	Cytochrom <i>c</i>	ICN, 1998; Sigma-Aldrich, 1993; Ratnam et al., 1996; Brody und Hille, 1999
Rinderleber	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Cabré et al., 1991
Rinderleber	Cytochrom <i>c</i> , O <sub>2</sub> , K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , Methylenblau	Cohen und Fridovich, 1971
Ratte (rekombinant)	Cytochrom <i>c</i>	Garett und Rajagopalan, 1996
<i>Thiobacillus novellus</i>	Cytochrom <i>c</i>	Kappler et al., 2000
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	Warburg Methode	Skłodowska, 1990
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Sugio et al., 1988
Spinatblätter	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Jolivet et al., 1995
Wilde Malve ( <i>Malva sylvestris</i> )	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Ganai et al., 1997

Aus der Literatur (Sorokin, 1995) ist bekannt, dass die Sulfitoxidase aus *Sulfitobacter pontiacus* nicht mit kommerziell erhältlichen Cytochrom *c*-Preparationen (z.B. aus Pferde- oder Hühnerherz) reagiert, so dass für Routine-Assays der Enzymaktivität nur das Kaliumhexacyanoferrat (III)-Verfahren in Betracht kam.

Da für die Assays nach diesem Reaktionsprinzip in der Literatur verschiedene Konzentrationsbereiche für die einzelnen Komponenten und außerdem unterschiedliche Werte für den molaren Extinktionskoeffizienten von K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> angegeben werden, wurden die Parameter „Arbeitskonzentration“ und „Extinktionskoeffizient“ vorab untersucht.

### 7.2.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Kaliumhexacyanoferrat (III) und Ermittlung des möglichen Arbeitsbereiches

Der molare Extinktionskoeffizient von Kaliumhexacyanoferrat (III) bei 420 nm wurde bestimmt, indem im Konzentrationsbereich bis 4 mmol/L die Absorption gegen die Konzentration aufgetragen wurde.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit

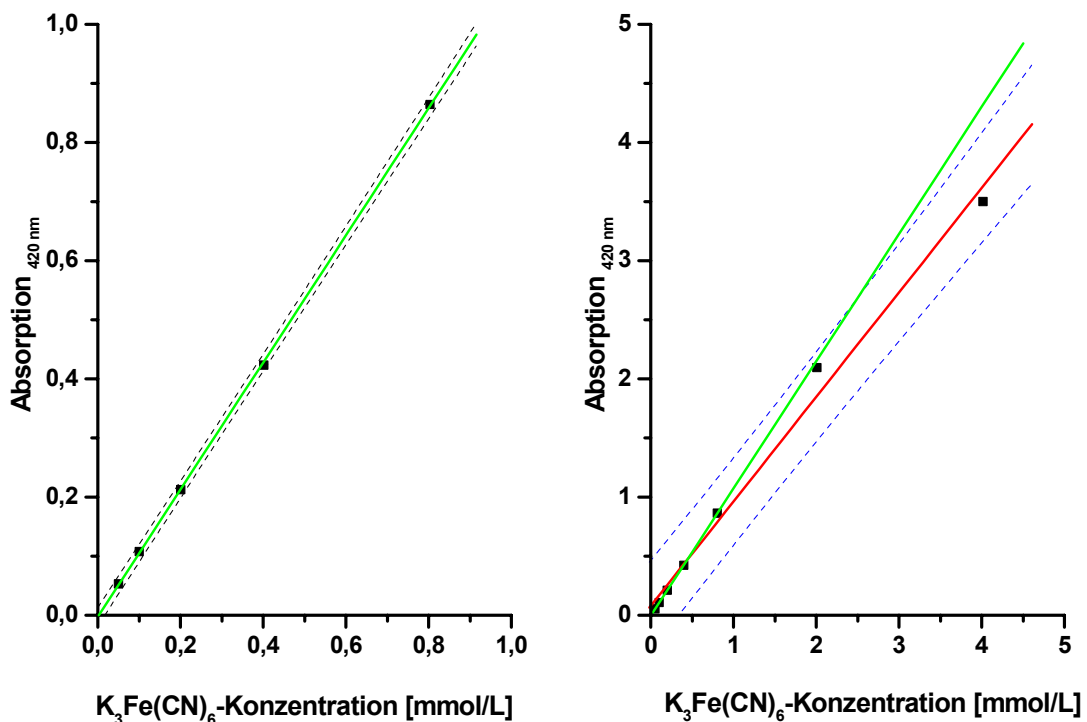
$A$  Absorption

$\varepsilon$  molarer Extinktionskoeffizient

$c$  Konzentration

$d$  Küvettschichtdicke (1 cm)

ergibt sich der molare Extinktionskoeffizient bei einer Auftragung der Absorption gegen die Konzentration aus der Steigung der resultierenden Geraden.



**Abbildung 7-1:** Absorption bei 420 nm in Abhängigkeit von der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Konzentration. *Linke Seite:* Regressionsgerade (grün), Fehlergrenzen (schwarz gestrichelt); *Rechte Seite:* lineare Regression über alle Messwerte (rot), Fehlergrenzen (blau gestrichelt) und als Vergleich die Regressionsgerade für den linearen Bereich (grün).

Die Auftragung in Abbildung 5-4 zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der  $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration und der Absorption bei 420 nm nur im Konzentrationsbereich bis ca. 1 mmol/L gegeben ist. In einem Sulfitoxidase-Assay sollte also eine Anfangskonzentration von 1 mmol/L für Kaliumhexacyanoferrat (III) nicht überschritten werden.

Für den molaren Extinktionskoeffizienten von Kaliumhexacyanoferrat (III) ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgerade (Abbildung 5-4, Linke Seite) ein Wert von:

$$\varepsilon = 1,076 \cdot 10^3 \frac{\text{cm}^2}{\text{mmol}}$$

### 7.2.2 Sulfitoxidase-Assay

Ausgehend von den oben ermittelten Daten für den praktikablen Konzentrationsbereich, wurden Standard-Bedingungen für die Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität etabliert:

Die Messungen wurden in einem Uvikon 922 Zweistrahlenspektrophotometer (Fa. Kontron) durchgeführt. Der Küvettenhalter wurde mit Hilfe eines Thermostaten (Haake F3 / Haake S, Fa. Haake) temperiert.

Als Geräteparameter wurden die in Tabelle 5-2 genannten gewählt.

**Tabelle 7-4:** Uvikon 922-Geräteeinstellungen für Sulfitoxidase-Aktivitätsmessungen.

Parameter	Einstellung
Messverfahren	Time Drive
Delay	5 s
Messfrequenz	50 Hz

Alle Messungen wurden in Einmal-Halbmikroküvetten (Küvettdicke 1 cm, Fa. Ratiolab) durchgeführt, welche die in Tabelle 5-3 genannten Puffer und Reagenzien enthielten.

**Tabelle 7-5:** Zusammensetzung des Enzymassays für die Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität.

Messküvette	Referenzküvette
250 $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 7,5	750 $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 7,5
250 $\mu$ l 0,1 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl pH 7,5	250 $\mu$ l 0,1 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl pH 7,5
250 $\mu$ l 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ in 50 mM Tris-HCl pH 7,5	250 $\mu$ l 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ in 50 mM Tris-HCl pH 7,5
250 $\mu$ l 0.95 mM $Na_2SO_3$ in 50 mM Tris-HCl pH 7,5	-----
250 $\mu$ l Enzymlösung	-----

Die Volumenaktivitäten wurden direkt anhand der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Für den Zusammenhang zwischen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch die Extinktionsänderung  $\Delta E$ , und Sulfitoxidase-Volumenaktivität ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{\text{Aktivität}}{\text{ml}} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right]$$

Dabei sind

$$\frac{\Delta E}{\text{min}} \quad \text{Extinktionsänderung pro Zeit zu Beginn der Reaktion} \left[ \frac{1}{\text{min}} \right]$$

$$\varepsilon \quad \text{molarer Extinktionskoeffizient von } \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \left[ \frac{\text{cm}^2}{\text{mmol}} \right]$$

$$d \quad \text{Schichtdicke der Küvette [cm]}$$

$$V_{\text{gesamt; Probe}} \quad \text{Gesamtvolumen in der Küvette; Volumen der Enzymlösung [mL].}$$

Als **eine Unit U** wurde die Menge an Sulfitoxidase definiert, die innerhalb von **einer Minute ein  $\mu\text{mol}$  Sulfit zum Sulfat oxidiert**.

Aus den Volumenaktivitäten kann unter Einbeziehung der jeweiligen Proteinkonzentrationen (Bestimmung siehe Anhang 7.3.1) die spezifische Sulfitoxidase-Aktivität dann direkt berechnet werden. Es gilt der folgende Zusammenhang:

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[ \frac{\text{U}}{\text{mg}_{\text{Prot.}}} \right] = \frac{\text{Volumenaktivität} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right]}{\text{Proteingehalt} \left[ \frac{\text{mg}_{\text{Prot.}}}{\text{mL}} \right]}$$

## 7.3 Proteinanalytische Methoden

### 7.3.1 Proteinbestimmungen an gereinigter Sulfit-Oxidase

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den verschiedenen Stadien der Proteinaufreinigung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Proteintest (Micro BCA Protein Assay, Fa. Pierce). Der Test kombiniert die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) mit der selektiven und sensitiven kolorimetrischen Detektion des  $\text{Cu}^{1+}$ -Kations durch 2,2'-Bichinoly-4,4'-Dicarbonsäure (Bicinchoninic acid, BCA) (SMITH, 1985 UND HINSON, 1988). Das pinkfarbige Reaktionsprodukt entsteht durch Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Kation (Abbildung 7-2). Der wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm mit einem linearen Zusammenhang zwischen Absorption und Proteinkonzentration im Bereich von 1  $\mu\text{g/mL}$  bis 40  $\mu\text{g/mL}$  BSA.

#### 1. Schritt:



#### 2. Schritt:

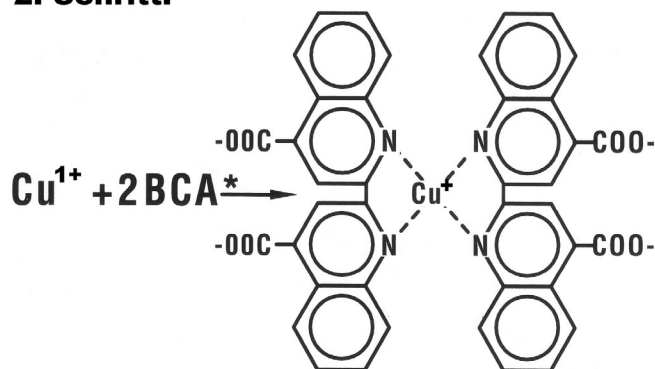


Abbildung 7-2: Reaktionsschema zum Proteintest nach der BCA-Methode.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt auf Microtiterplatten. Zunächst werden 150  $\mu\text{L}$  der Probe vorgelegt, dann werden 150  $\mu\text{L}$  des vorgemischten Arbeitsreagenzes zugegeben. Die Proben werden kurz durchmischt und dann für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wird bei 560 nm mit einem ImmunoReader NJ-2000 (Fa. Intermed) oder mit einem Microplate Reader Benchmark (Fa. BioRad) gemessen.

Zur Kalibration des Proteintests werden aus einer kommerziell erhältlichen Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung (2 mg/L, Fa. Pierce) 7 BSA-Konzentrationen im Bereich von 1-40  $\mu\text{g/mL}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  hergestellt. Der Blindwertabgleich erfolgt mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ . Der

Blindwertabgleich und die Kalibration erfolgen in Doppel-, die Protein Assays in Dreifachbestimmung.

### 7.3.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die dargestellten SDS-PAGE-Gele wurden mit dem PhastGel-System (Fa. Amersham Pharmacia) hergestellt. Es wurden durchweg homogene 12,5%-Gele (PhastGel homogeneous 12,5, Fa. Amersham Pharmacia) verwendet.

Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen vorbereitet. Hierzu wurden die Proben 1:1 mit dem SDS-Puffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5% SDS, 0,02% Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt, 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend 2-3 Minuten bei 16 100 g abzentrifugiert. Die Proben wurden dann mit Hilfe des Applikationskammes auf das Gel aufgetragen. Die Parameter für die Trennung sind Tabelle 7-6 zu entnehmen.

**Tabelle 7-6:** Parameter für die SDS-PAGE.

Sample Applicator Down At		2.2	0 Vh		
Sample Applicator Up At		2.3	0 Vh		
Sep 2.1	250 V	10 mA	3 W	15°C	1 Vh
Sep 2.2	250 V	1 mA	3 W	15°C	1 Vh
Sep 2.3	250 V	10 mA	3 W	15°C	70 Vh

Für die Entwicklung der Gele wurden die folgenden Lösungen verwendet:

Waschlösung: 10% Ethanol, 5% Eisessig

Fixierpuffer: 10 mL 5% Glutaraldehyd-Lösung,  
+ 30 mL 5% Eisessig in Ethanol,  
+ 60 mL Wasser (bidest.)

Entwickler: 150 mL 2,5%ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung,  
+ 1 mL 2%ige Formaldehyd-Lösung

Hintergrundreduzierer: 3,7 g Tris-HCl,  
+ 100 mL 1,6%ige Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung

Die Gele wurden in der Entwicklungskammer des PhastGel-Systems entwickelt. Die Entwicklungsparameter sind Tabelle 7-7 zu entnehmen.

**Tabelle 7-7:** Entwicklung der SDS-PAGE-Gele.

Schritt	Lösung	Zeit [min]	Temp. [°C]	Bemerkung
1	10% Ethanol, 5% Hac	2	50	Waschlösung
2	10% Ethanol, 5% Hac	4	50	Waschlösung
3	Fixierpuffer	6	50	Fixierlösung
4	10% Ethanol, 5% Hac	3	50	Waschlösung
5	10% Ethanol, 5% Hac	5	50	Waschlösung
6	Wasser (bidest.)	2	50	Waschlösung
7	Wasser (bidest.)	2	50	Waschlösung
8	0,4% AgNO <sub>3</sub>	6,5	40	Färbelösung
9	Wasser (bidest.)	0,5	30	Waschlösung
10	Wasser (bidest.)	0,5	30	Waschlösung
11	Entwickler	0,5	30	Entwickler
12	Entwickler	4	30	Entwickler
13	Hintergrundreduzierer	2	30	Reduzierer
14	5-10% Glycerin	5	50	Stopplösung

Als Größenstandard wurde das „Low Molecular Weight Calibration Kit“ von Amersham Pharmacia eingesetzt. Dieses enthält die in Tabelle 7-8 angegebenen Proteine.

**Tabelle 7-8:** Low Molecular Weight Calibration Kit.

Protein	Molekulargewicht [M <sub>r</sub> ]	Quelle
Phosphorylase b	97.000	Kaninchenmuskel
Albumin	66.000	Bovines Serum
Ovalbumin	45.000	Hühnereiweiß
Carboanhydrase	30.000	Bovine Erythrocyten
Trypsin Inhibitor	20.100	Sojabohne
α-Lactalbumin	14.400	Rindermilch

## 7.4 Prozessanalytik

### 7.4.1 pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit einer autoklavierbaren Einstabmesskette (Fa. Mettler-Toledo) gemessen. In dieser bilden eine Glas- und eine Vergleichselektrode eine galvanische Kette. Eigentliche Messgröße ist die Spannung bzw. genauer die Summe der Grenzflächenpotentiale, die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Über die Nernst'sche Gleichung errechnet sich dann der pH-Wert. Vor dem Autoklavieren im Fermenter wurde die Elektrode mit zwei kommerziell erhältlichen Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0, Fa. Mettler-Toledo) kalibriert. Zwischen den Kultivierungen wurde die Elektrode in einer 3M KCl-Lösung gelagert. Zur Regenerierung wurde eine kommerziell erhältliche Pepsin/HCl-Lösung (Fa. Mettler-Toledo) benutzt.

### 7.4.2 Gelöstsauerstoffgehalt

Die Messung des Gelöstsauerstoffgehalts im Kultivierungsmedium  $pO_2$  erfolgte mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Fa. Mettler-Toledo) als Sauerstoffpartialdruck nach dem Clark-Prinzip (Polarographisches Prinzip). Dabei diffundiert der gelöste Sauerstoff durch eine gaspermeable Teflonmembran, die die Messlösung von den beiden Elektroden (Ag-Anode und Pt-Kathode) trennt. An der Kathode wird der Sauerstoff reduziert, während an der Anode Silber oxidiert wird.

Die Kalibration der Elektrode erfolgt durch eine Zweipunktkalibration. Der Nullpunkt (0% Gelöstsauerstoff) wird während der Sterilisationszeit kalibriert, der 100%-Wert wird dann durch Begasung mit Druckluft für die höchste benötigte Begasungsrate bzw. Rührerdrehzahl kalibriert.

### 7.4.3 Abgaskohlendioxid und –sauerstoff

Die Analytik der Fermenterabluft erfolgte über das Abgasanalyzesystem EGAS 1 (Fa. Hartmann & Braun). Dieses System zur Messgasaufbereitung besteht aus einem Messgaskühler mit Kondensatauffanggefäß und der Messgasfördereinheit. Als eigentliches Analysegerät war ein URAS 10 E (Fa. Hartmann & Braun) eingebaut.

Der **Sauerstoffgehalt** wird elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Der Sauerstoffsensoren besteht im Wesentlichen aus einer elektrochemischen Zelle mit Festelektrolyten aus Sauerstoffionen leitender Zirkondioxidkeramik, auf deren Innen- und Außenseite poröse Elektronen leitende Schichten als Elektroden aufgebracht sind. Durch



Anlegen einer Gleichspannung wird in dem Festelektrolyten ein Gleichstromsignal erzeugt, welches der Sauerstoffkonzentration des zu messenden Gases direkt proportional ist.

Der Kohlendioxidgehalt wird durch ein auf CO<sub>2</sub> sensibilisiertes, einstrahliges IR-Photometer bestimmt. Dieses nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Die Kalibrierung des Analysengerätes erfolgte mit einem Prüfgas (Fa. Linde) mit der Zusammensetzung 19% O<sub>2</sub>, 2,0% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>.

#### 7.4.4 Bestimmung der Optischen Dichte

Zur Bestimmung der Optischen Dichte wurden die Proben mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung („physiologische Kochsalzlösung“) 1:10 verdünnt und in einem Zweistrahl-spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron) gegen eine 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung als Referenz bei einer Wellenlänge von 430 nm gemessen. Dabei ergeben sich Absorptionswerte, die stets kleiner als Eins sind. Die Werte für die Optische Dichte ergeben sich dann durch Multiplikation der gemessenen Absorption mit 10.

### 7.5 Komplexstabilitätskonstanten von Metallionen-EDTA-Komplexen

Chelatkomplexe zwischen Metallkationen und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), kurz H<sub>4</sub>Y, bilden sich nach:



Aus dem Massenwirkungsgesetz ergeben sich damit die Stabilitätskonstanten der Komplexe:

$$K_M = \frac{c([MY]^{-4+n})}{c(M^{n+}) \cdot c(Y^{4-})} \quad \text{und} \quad pK = \log K_M$$

Bedingt durch die Tatsache, dass die vierbasige EDTA zwei Protonen sehr fest bindet, zeigen die Komplexstabilitäten eine deutliche pH-Abhängigkeit. Unterhalb von pH 9 verursacht die konkurrierende Bildung der EDTA-Protonenkomplexe HY<sup>3-</sup> und H<sub>2</sub>Y<sup>2-</sup> eine zunehmende Schwächung der Metallkomplex-Stabilitäten. Die Einführung eines pH-abhängigen Wasserstoffkoeffizienten trägt dem Rechnung. Die effektiven Komplexstabilitäten errechnen sich dann nach:

$$pK' = pK - \lg \alpha_H$$

Tabelle 7-9 zeigt den Wasserstoffkoeffizienten  $\lg \alpha_H$  in Abhängigkeit vom pH-Wert im physiologisch interessanten Bereich.

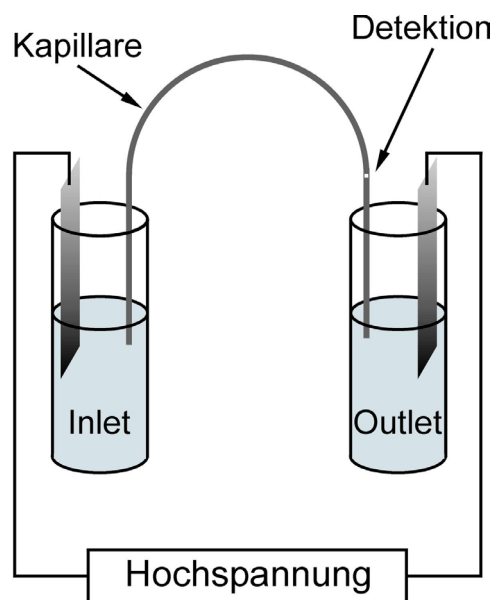
**Tabelle 7-9:**  $\lg \alpha_H$  als Funktion des pH-Wertes (nach Strähle und Schweda).

PH-Wert	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
$\lg \alpha_H$	4,65	3,92	3,32	2,78	2,27

## 7.6 Kapillarelektrophoretische Methoden

Die Kapillarelektrophorese, auch HPCE („High Performance Capillary Electrophoresis“), ist ein analytisches Trennverfahren, welches auf der Wanderung von gelösten oder dispergierten Teilchen im elektrischen Feld beruht. Mit diesem Verfahren können nicht nur Ionen, sondern unter Verwendung eines Micellbildners auch ungeladene Teilchen aufgetrennt werden (Engelhardt, 1994).

Der Geräteaufbau ist in Abbildung 7-3 schematisch dargestellt: Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Quarzglas kapillare taucht in zwei Puffergefäße ein. Außerdem sind beide Gefäße über Platinelektroden mit einer Hochspannungsquelle verbunden. Durch Anlegen einer Spannung von bis zu 30 kV zwischen Inlet- und Outletgefäß wird ein elektrisches Feld erzeugt, in dem sich die zu trennenden Teilchen bewegen. Bedingt durch die hohen Spannungen und die daraus resultierenden Stromstärken von bis zu 250  $\mu\text{A}$ , entsteht während der Elektrophorese Wärme, die meist durch Kühlung der gesamten Kapillare abgeführt wird. Die zu analysierende Probe wird entweder durch Druck, durch Anlegen einer Spannung oder hydrostatisch injiziert. Die Detektion der Analytionen erfolgt am Kapillarenende, meist optisch durch einen UV-Detektor.



**Abbildung 7-3:** Schematische Darstellung des Geräteaufbaus.

Die Trennwirkung der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten des zu analysierenden Gemisches. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Ions im elektrischen Feld hängt dabei – außer von Form, Größe und Ladung des Ions – auch von den Parametern elektrische Feldstärke, Viskosität des Mediums und der Temperatur ab. Es gilt der folgende Zusammenhang:

$$u = \frac{F_B}{F_R} = \frac{z \cdot F \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

$u$	Wanderungsgeschwindigkeit	$F$	Faraday-Konstante
$F_B$	Beschleunigungskraft	$E$	Feldstärke
$F_R$	Reibungskraft	$\eta$	Dynamische Viskosität
$z$	Ladung des Ions	$r$	Stokes'scher Radius

Allgemein lässt sich formulieren, dass ein Ion um so schneller das Detektorfenster erreicht, je kleiner seine Masse und je höher seine Ladung ist.

Neben der durch das elektrische Feld verursachten Wanderung der Ionen spielt auch der sogenannte Elektroosmotische Fluss eine Rolle. Auf der Innenseite der Kapillare befinden sich Silanolgruppen, die bereits bei pH-Werten über 2,5 teilweise deprotoniert sind und somit eine negative Ladung der Kapillaroberfläche bewirken. Als Gegenionen lagern sich die Kationen des Puffers an, und es bildet sich eine Doppelschicht. Im Gegensatz zu den ortsfesten Silanolgruppen wandert die Schicht aus Pufferkationen im elektrischen Feld jedoch zur Kathode. Dabei werden zusätzlich auch die mobilen Ionen und Moleküle im Inneren der Kapillare mitgerissen. Elektroosmotischer Fluss und normale elektrophoretische Bewegung der Ionen überlagern sich. Das heißt, dass für Kationen eine erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Kathode resultiert, während für Anionen keine allgemeingültige Aussage zu treffen ist. Die Richtung ihrer Wanderung hängt von der Größe ihrer elektrophoretischen Mobilität ab. Es wird jedoch in den meisten Fällen auch eine Wanderung in Richtung der Kathode beobachtet, d.h. die Migrationsrichtung wird vom Elektroosmotischen Fluss bestimmt. Die durch Elektroosmose bestimmte Mobilität lässt sich folgendermaßen beschreiben:

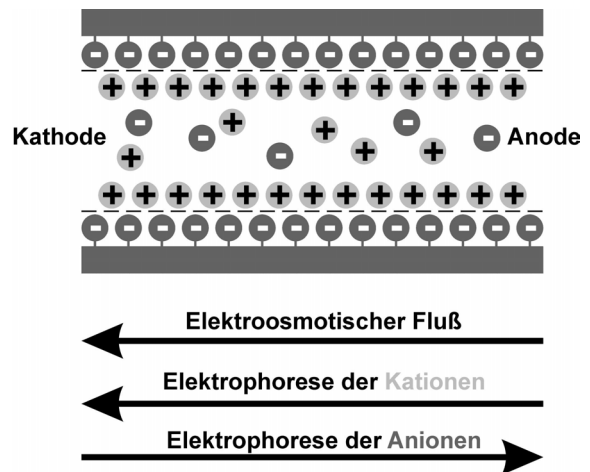


Abbildung 7-4: Elektroosmotischer Fluss.

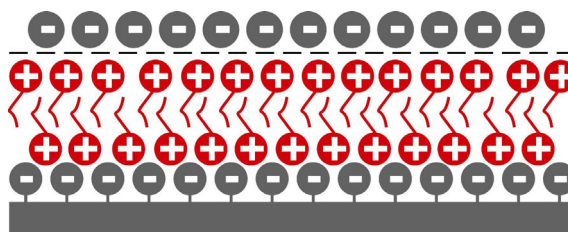
$$\mu_{EO} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \xi}{4 \cdot \pi \cdot \eta}$$

$\mu_{EO}$	Elektroosmotische Mobilität	$E$	Elektrische Feldstärke
$\varepsilon$	Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten	$\eta$	Dynamische Viskosität des Elektrolyten
$\xi$	Zahl der Ladungen an der Kapillarwand		

Der Elektroosmotische Fluss kann also auf verschiedene Arten beeinflusst werden:

- Eine pH-Wert-Erhöhung führt zu einer größeren Zahl an deprotonierten Silanolgruppen, d.h. die Zahl der Ladungen auf der Kapillarwand und folglich die Elektroosmotische Mobilität werden erhöht.
- Eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration bewirkt eine Erhöhung der Viskosität und folglich eine Reduzierung der Elektroosmotischen Beweglichkeit.

Durch Zugabe kationischer Detergentien kann sogar eine Umkehrung des Elektroosmotischen Flusses bewirkt werden. Die Detergenzien binden sich an die deprotonierten Silanolgruppen und bilden bei ausreichender Konzentration des Detergenzes eine Doppelschicht aus. Zur Seite des Elektrolyten ergibt sich also eine positive Ladung und somit eine Umkehrung des Elektroosmotischen Flusses. Ein Beispiel für ein solches kationisches Detergenz ist Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).



**Abbildung 7-5:** Umkehrung des Elektroosmotischen Flusses durch Zugabe eines kationischen Detergenzes (rot).

### 7.6.1 Bestimmung anorganischer Anionen durch Kapillarelektrophorese – Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Sulfit neben Sulfat

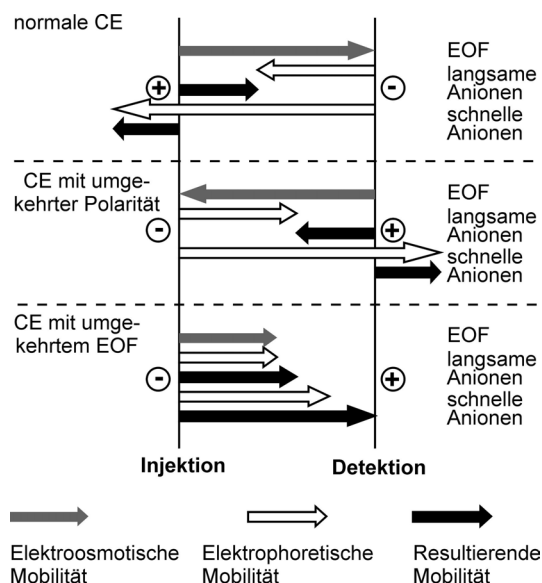
Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden mit einem Kapillarelektrophoresesystem Beckman P/ACE System MDQ durchgeführt.

Die meisten Anwendungen für kapillarelektrophoretische Analysenmethoden existieren immer noch für biologische Analyten wie Proteine und Nukleinsäuren (Grossman et al., 1989). Erst Anfang der neunziger Jahre wurden auch häufiger Anwendungen der Kapillarelektrophorese für die Analyse von anorganischen Ionen beschrieben (Jones und Jandik, 1992; Jackson und Haddad, 1993); sie fanden unter den Bezeichnungen „Inorganic Capillary Electrophoresis“ (Romano, et al., 1991), „Capillary Ion Electrophoresis“ (Grocott et al., 1992) oder „Capillary Ion Analysis“ (Jones et al., 1991) Eingang in die Literatur.

Insbesondere die Analyse von Anionen mit Hilfe der Kapillarelektrophorese ist jedoch unter normalen Bedingungen (d.h. mit der Detektion an der Kathode und dem Elektroosmotischen Fluss in Richtung Kathode) schwierig, da sich die Anionen wegen ihrer negativen Ladung entgegengesetzt zum Elektroosmotischen Fluss bewegen. Nachweisen lassen sich so also nur die Anionen, deren Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Anode geringer ist als die Geschwindigkeit des EOF in Richtung Kathode (siehe Abbildung 7-6). Anionen, die sich schneller bewegen, kommen nicht am Detektorfenster an, und für detektierbare Anionen

ergeben sich lange Analysezeiten. Kehrt man die Polarität um, so werden zwar die schnellen Anionen detektierbar, die langsamen Anionen bewegen sich aber nun mit dem EOF in Richtung Kathode. Erst eine Umkehrung der Polarität, verbunden mit einer Umkehr des EOF, erlaubt die Detektion aller Anionen auf der Anodenseite.

Die Detektion der Ionen am Kapillarenende erfolgt meist über Messung der UV-Absorption oder Fluoreszenz und seltener über die Leitfähigkeit. Sind die Analytionen – wie z.B. im Falle von Sulfid – selbst nicht UV-aktiv, so wird meist die indirekte UV-Detektion eingesetzt. In diesem Ansatz werden dem Puffer UV-aktive Komponenten beigemischt und die Analytionen werden über die Abnahme des Hintergrund-UV-Signals detektiert (Hjerten et al., 1987).



**Abbildung 7-6:** Migrationsrichtung von Anionen in Abhängigkeit von den Betriebsbedingungen.

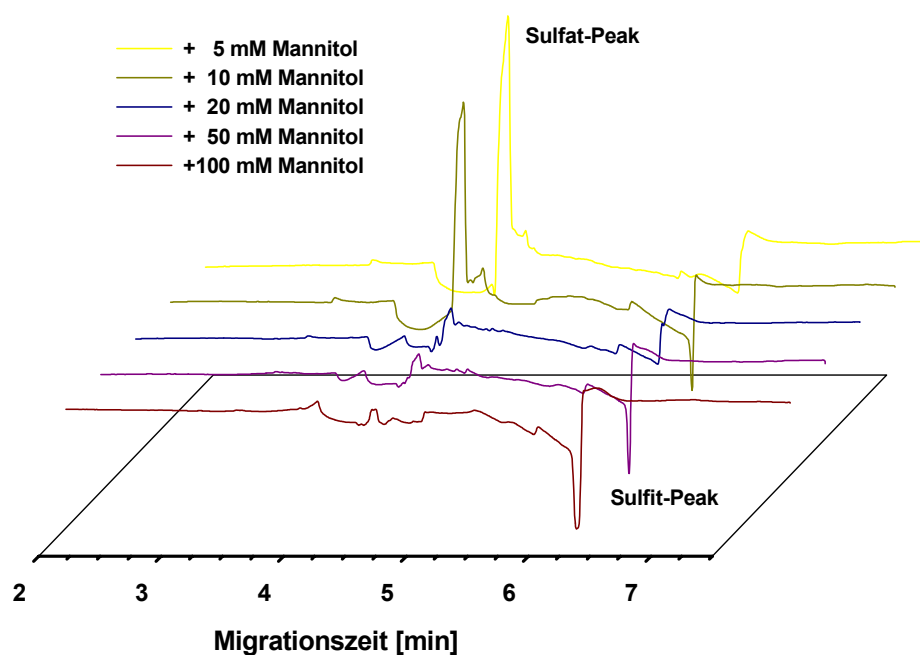
### 7.6.1.1 Methodenentwicklung mit Chromat als UV-aktiver Komponente

In der Literatur werden Methoden zur Bestimmung von Schwefel-Spezies in Abwässern aus der Papierherstellung beschrieben (Salomon und Romano, 1992; Masselter et al., 1996). In beiden Fällen wurde mit 5 mM Chromat in basischen Puffern gearbeitet. Die Proben wurden mit einer 10 mM Mannitol-Lösung (reduzierender Zucker) 1:500 verdünnt, um eine Oxidation des Sulfids durch den Chromatpuffer zu unterbinden bzw. einzuschränken („Samples were diluted in mannitol to minimize sulfite oxidation to sulfate.“).

Da für eine quantitative Sulfidanalytik die vollständige Unterdrückung der Sulfidoxidation nötig ist, wurde die Wirksamkeit der Mannitolzugabe überprüft. Als Elektrolyt wurden 5 mM Natriumchromat in 19 mM Natriumboratpuffer (pH 9) verwendet. Zur Umkehr des EOF wurden 1,045 mM CTAB zugesetzt. Die Geräteparameter waren die folgenden:

<b>Kapillare:</b> Ø 50 µm, Trennstrecke: 50 cm	<b>Detektion:</b> UV indirekt bei 254 nm
<b>Kapillarentemperatur:</b> 25°C	<b>Injektion:</b> 0,5 psi, 5 s
<b>Spannung:</b> -20 kV	

Es wurden fünf verschiedene Läufe mit Mannitol-Konzentrationen zwischen 5-100 mM durchgeführt (siehe Abbildung 7-7).



**Abbildung 7-7:** CE-Läufe mit einer Sulfitkonzentration von 5 mM in Chromat-Puffer. Die Proben wurden mit den jeweils angegebenen Mannitolkonzentrationen eingesetzt.

Abbildung 7-7 zeigt deutlich, dass der aus der ungewollten Oxidation des Sulfits zum Sulfat resultierende Sulfat-Peak tatsächlich mit steigender Konzentration des Mannitols abnimmt. Bei einer Mannitol-Konzentration von 100 mM ist er praktisch vollkommen verschwunden. Nachteilig an diesem Verfahren sind die unsauberen Peakgrenzen, die eine reproduzierbare Integration des Peaks und damit eine zuverlässige quantitative Bestimmung des Sulfits erschweren. Weitere Versuche mit dem ebenfalls UV-aktiven Hintergrundion Molybdat führten zu ähnlichen Ergebnissen: Obwohl Molybdat in der höchsten Oxidationsstufe +6 deutlich stabiler ist als das Chromat, wird ebenfalls eine Oxidation des Sulfits zum Sulfat

beobachtet. Eine Festlegung von Integrationsgrenzen ist ebenfalls nur schwer möglich. Für eine quantitative Sulfitbestimmung mittels CE sind die oxidierenden Hintergrundionen Chromat und Molybdat also selbst dann nicht geeignet, wenn den Proben der reduzierende Zucker Mannitol zugegeben wird.

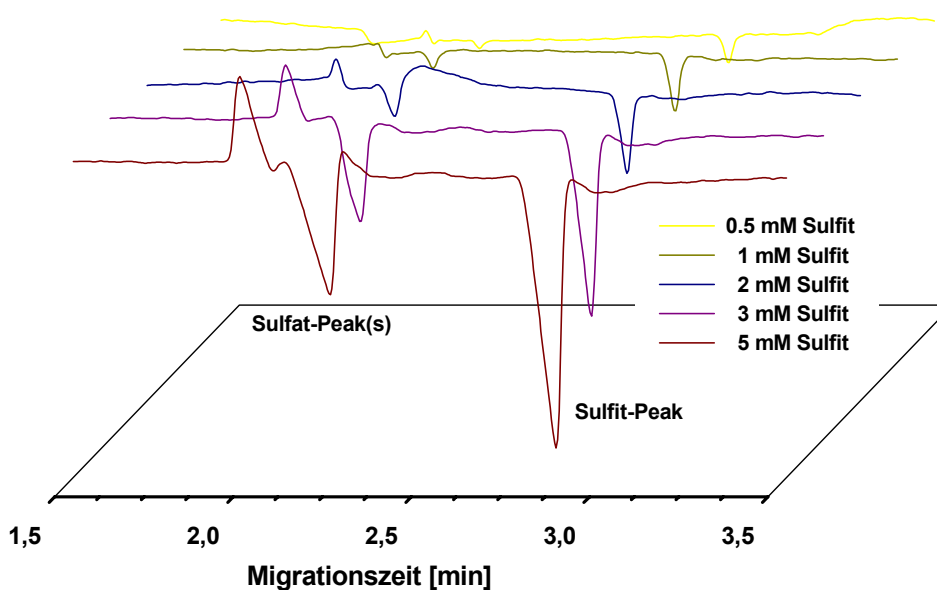
Erfolgversprechender sollten Ansätze mit nicht-oxidierenden Hintergrundionen sein.

### 7.6.1.2 Methodenentwicklung mit Phthalat als UV-aktiver Komponente

Als nicht-oxidierendes, UV-aktives Hintergrundion wurde Phthalat eingesetzt. Es wurden CE-Läufe mit fünf verschiedenen Sulfitkonzentrationen im Bereich von 0,5-5 mM durchgeführt. Als Elektrolyt wurde 50 mM Phthalat (pH 4) mit einem Zusatz von 1,1 mM CTAB eingesetzt. Weiterhin herrschten die folgenden Bedingungen:

<b>Kapillare:</b> Ø 50 µm, Trennstrecke: 50 cm	<b>Detektion:</b> UV indirekt bei 254 nm
<b>Kapillarentemperatur:</b> 10°C	<b>Injektion:</b> 0,5 psi, 5 s
<b>Spannung:</b> -20 kV	<b>Probenaufbewahrung:</b> 4°C

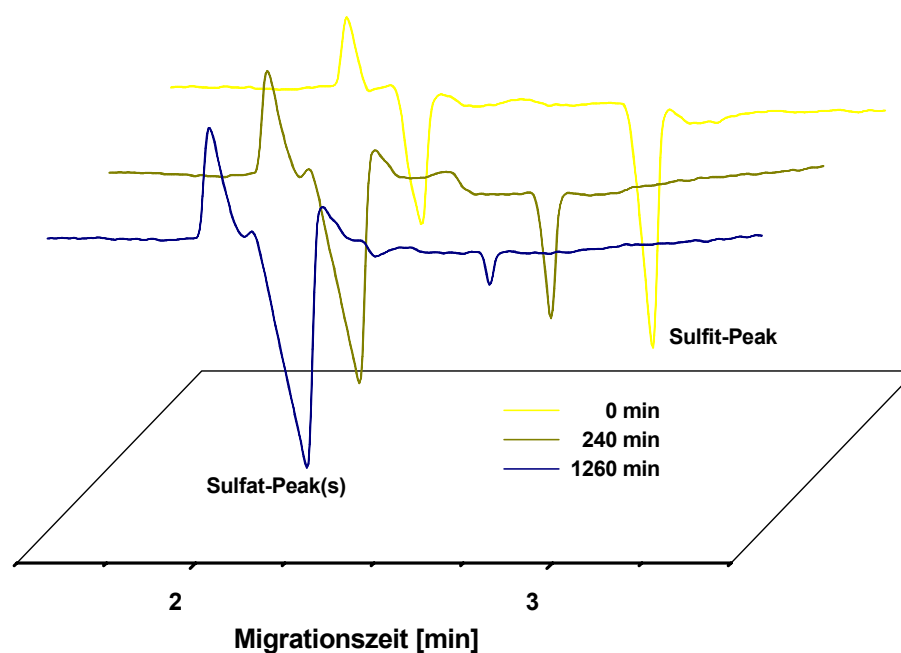
Die Ergebnisse zeigt Abbildung 7-8:



**Abbildung 7-8:** CE-Läufe mit Sulfitkonzentrationen von 0,5-5 mM in Phthalat-Puffer.

Es wird wiederum ein Teil des Sulfit(s) zum Sulfat oxidiert, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als in vergleichbaren Versuchen in Chromat- oder Molybdat-Puffer. Es wird außerdem deutlich, dass das Ausmaß der unerwünschten Sulfitoxidation mit steigender Sulfitausgangskonzentration ansteigt. Bevorzugt sollte im Konzentrationsbereich bis 2 mM gemessen werden. Konzentriertere Proben sollten entsprechend verdünnt werden. Eine weitere wichtige Einflussgröße ist die Zeit zwischen der Probenvorbereitung und der eigentlichen Messung. Den Einfluss der Zeitspanne zeigt Abbildung 7-9.

Die Messungen wurden mit einer Sulfit-Konzentration von 3 mM unter den oben genannten Bedingungen in 50 mM Phthalat-Puffer mit 1,1 mM CTAB als EOF-Umkehrer durchgeführt.



**Abbildung 7-9:** Verschiedene Zeiträume zwischen Probenvorbereitung und Messung. Dargestellt sind Messungen mit einer Sulfitkonzentration von 3 mM in Phthalat-Puffer.

Es wird deutlich, dass reproduzierbare Ergebnisse nur dann erhalten werden können, wenn die Messung unmittelbar auf die Probenahme folgt. Die Analysenzeiten, die auch die Zeiten zum Spülen der Kapillare einschließen, sollten weiterhin möglichst kurz gewählt werden.



### 7.6.1.3 Kalibration basierend auf der Phthalat-Methode

Basierend auf den im vorangegangenen Abschnitt ermittelten Parametern, wurde eine Kalibrationsgerade im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 2 mM Sulfit erstellt. Die lineare Regression ergibt die folgende Geradengleichung:

$$c_{\text{Sulfit}} = 1.42568 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Peakfläche} + 0.05128$$

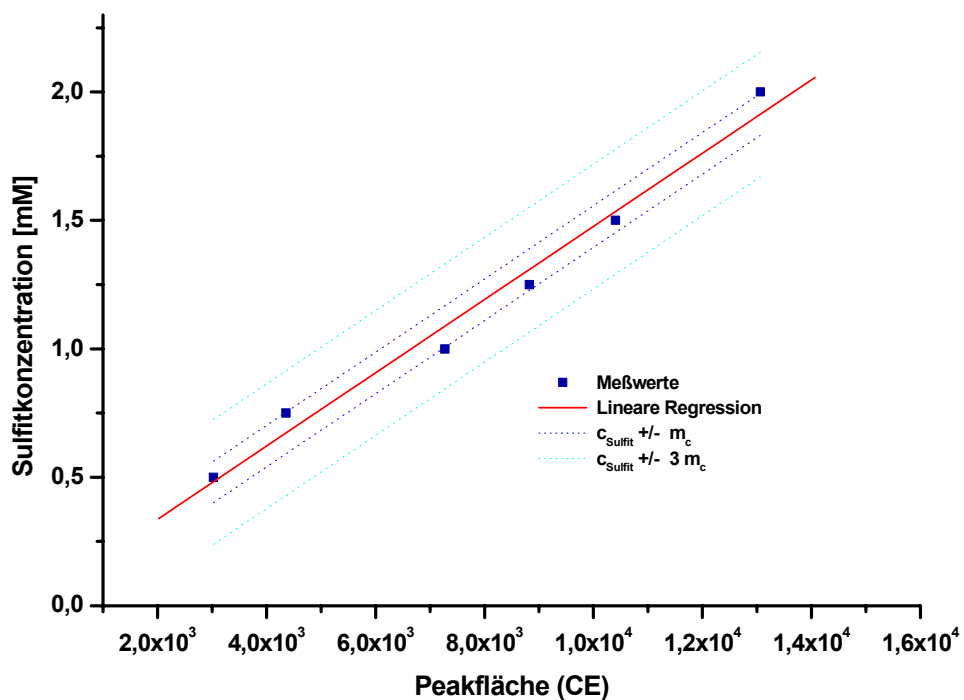


Abbildung 7-10: Kalibrationsgerade für die Sulfitbestimmung mit der Phthalat-Methode.

Eine Beurteilung der Qualität der Messergebnisse erfolgt durch Bestimmung des mittleren Fehlers der Einzelmessungen nach:

$$m_C = \sqrt{\frac{\sum_i (a + b \cdot x_i - y_i)^2}{n - 2}}$$

<i>a</i>	Achsenabschnitt	<i>y</i>	Sulfitkonzentration
<i>b</i>	Steigung	<i>n</i>	Anzahl der Messwerte
<i>x</i>	Peakfläche CE		

Aus sechs gemessenen Werten ergibt sich für den mittleren Fehler der Einzelmessungen  $m_C$  ein Wert von 0,081 mM. Der maximale Fehler  $3 m_C$  ergibt sich dann zu 0,243 mM.

## 7.7 Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
ΔE	Extinktionsänderung
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
A/D	Analog/Digital
CE	Kapillarelektrophorese
cm	Zentimeter
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
DIN	Deutsche Industrie-Norm
EOF	Elektroosmotischer Fluss
Fa.	Firma
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
hGH	Human Growth Hormone
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Entmineralisiertes Wasser
HPCE	High Performance Capillary Electrophoresis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IEC	Ion Exchange Chromatography
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere

---

mAU	Milli Absorption Units
MB	Marine Broth
min	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mS	Milli-Siemens
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Polycarbonat
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoffgehalt
ppm	Parts per million
psi	Pounds per Square Inch
Rohex.	Rohextrakt
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecylsulfate
Tab.	Tabelle
tPA	Tissue Plasminogen Activator
U	Units
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolet
V	Volt
vvm	Volumen Gaszufuhr pro Volumen Kulturlösung und Minute
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen

## 8 Literatur

- AMERSHAM PHARMACIA (2001). Protein Purification Handbook. Ratgeber zur Aufreinigung von Proteinen. Zu beziehen über Amersham BioSciences, Best.-Nr. 18-1132-29.
- ANDREWS, B.A. UND ASENJO, J.A. (1987). Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends in Biotechnology*, **5**, 273-277.
- AOAC, (1984). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, AOAC, Arlington, VA, 14<sup>th</sup> edn., 391-392.
- ARIGA, O., TAKAGI, H., NISHIZAWA, H. UND SANO, Y. (1987). Immobilization of microorganisms with PVA hardened by iterative freezing and thawing. *J. Ferment. Technol.*, **65**, 651-658.
- ARIGA, O., YAMAKAWA, T., FUJIMATSU, H. UND SANO, Y. (1989). Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase with Polyvinyl Alcohol. *J. Ferment. Bioengineering.*, **68**, 293-295.
- BARTOLOME, A. (2002). Laufende Dissertation. Institut für Technische Chemie, Universität Hannover.
- BEUTLER, H.-O. UND SCHÜTTE, I. (1983). Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, **79**, 323-330.
- BEUTLER, H.-O. (1984). A new enzymatic method for the determination of sulphite in food. *Food Chemistry*, **15**, 157-164.
- BEUTLER, H.-O. (1985). In *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3<sup>rd</sup> ed., vol. VII, VCH Weinheim, 585-591.
- BONGHIORNI, L. UND PIETRA, F. (1996). Marine natural products for industrial applications. *Chem. Ind.*, 54-58.
- BRANDENBERGER, H.R. (1999). Immobilisierung von Biokatalysatoren in monodispersen Alginatpartikeln mittels einer Eindüsen- und Mehrdüsenanlage. Dissertation, ETH Zürich.
- BRANDT, S., GOFFE, R.A., KESSLER, S.B., O'CONNOR, J.L. UND ZALE, S.E. (1988). Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications. *Bio/Technol.*, **6**, 779-782.
- BRAUN, V., GNIRKE, H., HENNING, U. UND REHN, K. (1973). Model for the structure of the shape-maintaining layer of *Escherichia coli* cell envelope. *J. Bacteriol.*, **114**, 1264-1270.
- BRIEFS, K.G. UND KULA, M.R. (1992). Fast protein chromatography on analytical and preparative scale using modified microporous membranes. *Chem. Eng. Sci.*, **47(1)**, 141-149.
- BRÜSER, T. (2000). Bakterielle APS:Phosphat Adenylyltransferasen. *BioSpektrum*, **6(4)**, 308.

- BUCHHOLZ, K. UND KASCHE, V. (1997). Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- CABRÉ, F., CASCANTE, M. UND CANELA, E.I. (1991). An improved purification procedure for Sulfite Oxidase from bovine liver. *Preparative Biochemistry*, **21(1)**, 53-61.
- CARTÉ, B.K. (1996). Biomedical potential of marine natural products. *BioScience*, **46(4)**, 271-286.
- CHAMPLUVIER, B. UND KULA, M.R. (1991). Microfiltration membranes as pseudo-affinity adsorbents: modification and comparison with gel beds. *J. Chromatogr.*, **539**, 315-325.
- CHAMPLUVIER, B. UND KULA, M.R. (1992). Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: a case study. *Biotech. Bioeng.*, **40**, 33-40.
- CHARCOSSET, C. (1998). Purification of Proteins by Membrane Chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **71**, 95-110.
- CHARCOSSET, C., SU, Z., KAROOR, S., DAUN, G. UND COLTON, C.K. (1995). Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin purification: experimental characterization. *Biotech. Bioeng.*, **48**, 415-427.
- COHEN, H.J. UND FRIDOVICH, I. (1971). Hepatic Sulfite Oxidase, Purification and Properties. *J. of Biol. Chem.*, **246(2)**, 359-366.
- COHEN, H.J. UND FRIDOVICH, I. (1971). Hepatic Sulfite Oxidase, The Natur and Function of the Heme Prosthetic Groups. *J. of Biol. Chem.*, **246(2)**, 367-373.
- COHEN, H.J. UND FRIDOVICH, I. (1971). Hepatic Sulfite Oxidase, A functional role for Molybdenum. *J. of Biol. Chem.*, **246(2)**, 374-382.
- COOPER, C.M., FERNSTROM, G.A. UND MILLER, S.A. (1944). Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 504-509.
- CRAPISI, A., LANTE, A., PASINI, G. UND SPETTOLI, P. (1993). Enhanced microbial cell lysis by the use of lysozyme immobilized on different carriers. *Process Biochem.*, **28**, 17-21.
- DAHL, C. (2000). Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren für die Photosynthese anoxygener phototropher Bakterien. *BioSpektrum*, **6(4)**, 263-266.
- DONALIES, U., LÖBCKE, K. UND STAHL, U. (2000). Sulfite formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Posterbeitrag*, Biotechnology 2000, Berlin.
- DORAN, P.M. (1995). Bioprocess engineering principles, Academic Press, San Diego
- DUFF, R.G. (1985). Microencapsulation technology – A novel method for monoclonal antibody production. *Trends Biotechnol.*, **3**, 167-170.

- EDWARDS, M.C., JOHNSON, J.L., MARRIAGE, B., GRAF, T.N., COYNE, K.C., RAJAGOPALAN, K.V. UND MACDONALD, I.M. (1999). Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. Review of two cases in one family. *Ophthalmology*, **106(10)**, 1957-1961.
- ENGELHARDT, H. (1994). Kapillarelektrophorese. Methoden und Möglichkeiten. Springer Verlag, Berlin.
- ENGLER, C.R. (1985). Disruption of Microbial Cells. In *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M., Ed.) Pergamon Press, Oxford.
- FDA (1985). *Points to consider in the production and testing of new drugs and biologics produced by recombinant DNA technology* (draft).
- FDA (1987). *Guidelines on General Principles of Process Validation*. Center for Drugs and Biologics, Center for Devices and Radiological Health, FDA, Rockville.
- FEENEY, R.E. UND YEH, Y. (1998). Antifreeze proteins: Current status and possible food uses. *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 102-106.
- FREYER, S., WEUSTER-BOTZ, D. UND WANDREY, C. (1992). Medienoptimierung mit Genetischen Algorithmen. *BioEngineering*, **5+6**, 16-25.
- FRIEDLÄNDER, P. (1909). Über antiken Purpur. *Z. Angewandte Chemie*, **48**, 2321-2324.
- GANAI, B.A., MASOOD, A. UND BAIG, M.A. (1997). Isolation, Purification and Partial Characterization of Sulphite Oxidase from *Malva Sylvestris*. *Phytochemistry*, **45(5)**, 879-880.
- GARRETT, R.M. UND RAJAGOPALAN, K.V. (1996). Site-directed mutagenesis of recombinant Sulfite Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **271(13)**, 7387-7391.
- GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J.P. UND CLAVERIE, P. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **18**, 103-107.
- GOOD, N.E., WINGET, G.D., WINTER, W., CONOLLY, T.N., IZAWA, S. AND SINGH, R.M.M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, **5**, 467-477.
- GOOD, N.E. AND IZAWA, S. (1968). Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol.*, **24 (Part B)**, 53-68.
- GOOSEN, M.F.A., O'SHEA, G.M., GHARPETIAN, H.M., CHOU, S. UND SUN, A.M. (1985). Optimization of microencapsulation parameters – Semipermeable Microcapsules as a bioartificial pancreas. *Biotechnology and Bioengineering*, **27(2)**, 146-150.
- GROCOTT, S.C., JEFFERIES, L.P., BOWSER, T., CARNEVALE, J. UND JACKSON, P.E. (1992). Applications of ion chromatography and capillary ion electrophoresis in the alumina and aluminum industry. *Journal of Chromatography*, **602(1-2)**, 257-264.
- GROSSMAN, P.D., COLBURN, J.C., LAUER, H.H., NIELSEN, R.G., RIGGIN, R.M., SITTAMPALAM, G.S. UND RICKARD, E.C. (1989). Application of free-solution capillary

electrophoresis to the analytical scale separation of proteins and peptides. *Analytical Chemistry*, **61(11)**, 1186-1194.

HAMANO, T., MITSUHASHI, Y., MATSUKI, Y. (1979). Application of gas-chromatography for the separate determination of free and combined sulfites in foods. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, **168**, 195-199.

HANKE, T. (1999). Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung von Enzymen aus marinen Mikroorganismen. Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, Universität Hannover.

HARTMEIER, W. (1986). Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer-Verlag, Berlin.

HASHIMOTO, S. UND FURUKAWA, K. (1987). Immobilization of activated sludge by PVA boric-acid method. *Biotechnology and Bioengineering*, **30(1)**, 52-59.

HAYGOOD, M.G. UND DISTEL, D.L. (1993). Bioluminescent symbionts of flashlight fishes and deep-sea anglerfishes form unique lineages related to the genus *Vibrio*. *Nature*, **363**, 154-156.

HINSON, D.L. UND WEBBER, R.J. (1988). Miniaturization of the BCA Protein Assay. *BioTechniques*, **6(1)**, 14-19.

HIRAI, T., ASADA, Y., SUZUKI, T. UND HAYASHI, S. (1989). Studies on elastic hydrogel membrane. I. Effect of preparation conditions on the membrane performance. *Journal of Applied Polymer Science*, **38**, 491-502.

HJERTEN, S., ELENBRING, K., KILAR, F., LIAO, J., CHEN, A.J.C. SIEBERT, C.J. UND ZHU, M. (1987). Carrier free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focussing in a high performance electrophoresis apparatus. *Journal of Chromatography*, **403**, 47-61.

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, VERKAUF KUNSTHARZE, FRANKFURT (1989). Broschüre "Profil eines Polymeren".

HOHAUS, K., ALTMANN, A., BURD, W., FISCHER, I., HAMMER, P.E., HILL, D.S., LIGON, J.M. UND VAN PÈE, K.-H. (1997). NADH-Dependent Halogenases Are More Likely To Be Involved in Halometabolite Biosynthesis Than Haloperoxidases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36(18)**, 2012-2013.

HOLZGRABE, U. UND BECHTHOLD, A. (1999). Paradigmenwechsel in der Entwicklung antiinfektiver Chemotherapeutika. *Chemotherapie Journal*, **8(2)**, 69-78.

HOPKINS, T.R. (1991). Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. In *Purification and Analysis of recombinant proteins*. (Seetharam, R. und Sharma, S.K., Eds.) Marcel Dekker, New York.



- ICN (1998). Datenblatt zur Sulfitoxidase aus Hühnerleber, Katalognummer: 156725. ICN Pharmaceuticals, Aurora, USA.
- IFU (1987). Bestimmung der gesamten schwefligen Säure. Internationale Fruchtsaftunion (IFU) Analyse Nr. 7a.
- IMAIZUMI, N., HAYAKAWA, K. OKUBO, N. MIYAZAKI, M. (1981). High performance liquid-chromatographic analysis of sulfite using malachite green. *Chem. Pharm. Bull.*, **29(12)**, 3755-3757.
- ISAAC, S. AND JENNINGS, D. (1996). Kultur von Mikroorganismen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- JACKSON, P.E. UND HADDAD, P.R. (1993). Capillary electrophoresis of inorganic ions and low-molecular-mass ionic solutes. *Trends in Analytical Chemistry*, **12**, 231-238.
- JANSON, J.-C. UND RYDÉN, L. (1998). Protein Purification. Principles, High-Resolution Methods, and Applications. 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley and Sons, Weinheim.
- JEKEL, M., BUHR, A., WILLKE, T. UND VORLOP, K.-D. (1998). Neuartige Geleinschlußimmobilisate (LentiKats<sup>®</sup>) in der Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik*, **70**, 438-441.
- JOHNSON, J.L. UND RAJAGOPALAN, K.V. (1976). Purification and properties of sulfite oxidase from human liver. *J. Clin. Invest.*, **58**, 543-550.
- JOHNSON, J.L. UND RAJAGOPALAN, K.V. (1995). An HPLC assay for detection of elevated urinary S-sulphocysteine, a metabolic marker of sulphite oxidase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.*, **18**, 40-47.
- JOLIVET, P., BERGERON, E. UND MEUNIER, J.-C. (1995). Evidence for sulfite oxidase activity in Spinach Leaves. *Phytochemistry*, **40(3)**, 667-672.
- JONES, W.R., JANDIK, P. UND PFEIFER, R. (1991). Capillary ion analysis – An innovative technology. *American Laboratory*, **23(8)**, 40.
- JONES, W.R. UND JANDIK, P. (1992). Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography*, **608**, 385-393.
- JONES, K., HIBBERT, F. UND KEENAN, M. (1999). Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends in Biotechnology*, **17**, 477-481.
- KAPPLER, U., BENNETT, B., RETHMEIER, J., SCHWARZ, G., DEUTZMANN, R., MCEWAN, A.G. UND DAHL, C. (2000). Sulfite:Cytochrome c Oxidoreductase form *Thiobacillus novellus*. *Journal of Biological Chemistry*, **275(18)**, 13202-13212.

- KARUTZ, M., JOKSCH, B., FREYER, S., WEUSTER-BOTZ, D. UND WANDREY, C. (1992). Optimierung der Spurenelementkonzentration bei der fermentativen L-Isoleucin-Produktion – Anwendung Genetischer Algorithmen. *BioEngineering*, **5+6**, 26-34.
- KATO, C. (1998). Activities of the DEEPSTAR program in Japan. Isolation and Characterization of the novel deep-sea barophilic bacteria. Vortrag anlässlich des Workshops „Marine Biotechnology. Applications-Commercialisation-Cooperations“, Wilhelmshaven.
- KELLY, D.P. (1989). Physiology and Biochemistry of Unicellular Sulfur Bacteria. In *Autotrophic Bacteria* (Schlegel, H.G. und Bowien, B., editors) Springer Verlag (Berlin), 193-217.
- KELLY, D.P. (1988). Oxidation of sulphur compounds. *Society for general microbiology symposium* **42**, 65-98.
- KIPKE, C.A., ENEMARK, J.H. UND SUNDE, R.A. (1989). Purification of prosthetically intact sulfite oxidase from chicken liver. *Ach. Biochem. Biophys.*, **270**, 383-390.
- KLEIN, J. UND VORLOP, K.-D. (1983). New Developments in the Field of Cell Immobilisation: Formation of Biocatalysts by ionotropic gelation. In *Enzyme Technology* (Lafferty, R.M., Ed.), Springer Verlag, Berlin.
- KRAUSE, S., KRONER, K.H. UND DECKWER, W.D. (1991). Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regard to protein purification. *Biotechnol. Tech.*, **5(3)**, 199-204.
- KUBOTA, N., KOUNOSU, M., SAITO, K., SUGITA, K., WATANABE, K. UND SUGO, T. (1995). Preparation of a hydrophobic porous membrane containing phenyl groups and its protein adsorption performance. *J. Chromatogr. A*, **718**, 27-34.
- LAW, B.A. UND GOODENOUGH, P.W. (1995). Enzymes in milk and cheese production. In *Enzymes in Food Processing*, 2<sup>nd</sup> edition (Tucker, G.A., Woods, L.F.J., eds.), 114-143. Bishopbriggs: Blackie Academic & Professionals.
- LEA, A.G.H. (1995). Enzymes in production of beverages and fruit juices. In *Enzymes in Food Processing*, 2<sup>nd</sup> edition (Tucker, G.A., Woods, L.F.J., eds.), 223-249. Bishopbriggs: Blackie Academic & Professionals.
- LEDUC, M., FREHEL, C., SIEGEL, E., UND VAN HEIJENOORT, J. (1989). Multilayered distribution of peptidoglycan in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1243-1254.
- LEE, C.-K. UND KU, M.-C. (1994). Lysis of *Micrococcus lysodeikticus* cells by lysozyme covalently immobilized on the lumen of hollow fibers. *Biotechnol Tech.*, **8**, 193-198.
- LMBG (1986/1999). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung

von Sulfit (schwefliger Säure) in Frischobst, 29.00-2 (November 1986); Bestimmung von Sulfit (schwefliger Säure) in Obstprodukten, 30.00-1 (November 1986); Bestimmung von Sulfit in Bier, 36.00-8 (November 1986); Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln, Teil 2: Enzymatische Verfahren, 00.00-46/2 (November 1999).

LOEWEN, M.C., LIU, X., DAVIES, P.L. UND DAUGULIS, A.J. (1997). Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 480-486.

LU, W.-P. (1986). A periplasmic location for the thiosulphate-oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus versutus*. *FEMS Microbiology Letters*, **34**, 313-317.

LU, W.-P., SWOBODA, B.E.P. UND KELLY, D.P. (1985). Properties of the thiosulphate-oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus versutus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **828**, 116-122.

LUKSA, J., MENART, V., MILICIC, S., KUS, B., GABERC-POREKAR, V. UND JOSIC, D. (1994). Purification of human tumour necrosis factor by membrane chromatography. *J. Chromatogr. A*, **661**, 161-168.

LÜTKEMEYER, D., BRETSCHNEIDER, M., BÜNTMEYER, H. UND LEHMANN, J. (1993). Membrane chromatography for rapid purification of recombinant antithrombin III and monoclonal antibodies from cell culture supernatant. *J. Chromatogr. A*, **639**, 57-66.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. UND PARKER, J. (1997). Brock Biology of Microorganisms, 8<sup>th</sup> edition, Prentice Hall (London).

MASSELTHER, S.M., ZEMANN, A.J. UND BONN, G.K. (1996). Determination of inorganic anions in kraft pulping liquors by Capillary Electrophoresis. *Journal of High Resolution Chromatography*, **19**, 131-136.

MCGREGOR, W.C., SZESKO, D.P., MANDARO, R.M. UND RAI, V.R. (1986). High performance isolation of a recombinant protein on composite ion exchange media. *Bio/Tech.*, **4**, 526-527.

MELZER, R.R., BRANDHUBER, P., ZIMMERMANN, T. UND SMOLA, U. (2001). Der Purpur – Farben aus dem Meer. *Biologie in unserer Zeit*, **31(1)**, 30-39.

MIDDELBERG, A.P.J. (1995). Process Scale Disruption of Microorganisms. *Biotechn. Advances*, **13(3)**, 491-551.

MONOD, J. (1942). La croissance des cultures bactériennes. Dissertation.

NACHMAN, M., AZAD, A.R.M. UND BAILON, P. (1992). Efficient recovery of recombinant proteins using membrane-based immunoaffinity chromatography (MIC). *Biotech. Bioeng.*, **40**, 564-571.

- NACHMAN, M., (1992). Kinetic aspects of membrane-based immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.*, **597**, 167-172.
- NG, L.-T., GUTHRIE, J.T. UND YUAN, Y.J. (2000). UV cured biocompatible membrane for biosensor application. *Polym. Int.*, **49**, 1017-1020.
- NG, L.-T., GUTHRIE, J.T., YUAN, Y.J. UND ZHAO, H. (2001). UV cured natural polymer-based membrane for biosensor application. *J. Appl. Polymer Science*, **79**, 466-472.
- NICOLAOU, K.C. UND SORENSEN, E.J. (1996). Classics in Total Synthesis. Darin Kapitel 37: Brevetoxin B. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- NOVELLA, I.S., FARGUES, C. UND GRÉVILLOT, G. (1994). Improvement of the extraction of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* cells by a combined use of chemical methods. *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 379-382.
- NYBORG, M., OUTTRUP, H. UND DREYER, T. (1999). Investigations of the protective mechanism of sulfite against beer staling and formation of adducts with *trans*-2-Nonenal. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57(1)**, 24-28.
- OH, J.K. UND SUZUKI, I. (1977). Isolation and characterization of a membrane-associated thiosulphate-oxidizing system of *Thiobacillus novellus*. *Journal of General Microbiology*, **99**, 397-412.
- PALL (2002). Produktinformationen zur Mustang-Produktreihe.
- PAPAZIAN, R. (1996). Sulfites: Safe for most, Dangerous for some. U.S. Food and Drug Administration. FDA Consumer, December 1996.
- PARINI, R., BRISCIOLI, V., CARUSO, U., DORCHE, C., FORTUNA, R., MINNITI, G., SELICORNI, A., VISMARA, E. UND MANCINI, G. (1997). Spherophakia associated with molybdenum cofactor deficiency. *American Journal of medical Genetics*, **73**, 272-275.
- PATZ, C.-D., GALENSA, R. UND DIETRICH, H. (1997). Beitrag zur Bestimmung von Sulfit in Fruchtsäften durch HPLC-Biosensor-Kopplung. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, **93(11)**, 347-351.
- PETSCH, D., BEESKOW, T.C., ANSPACH, F.B. UND DECKWER, W.-D. (1997). Membrane adsorbents for selective removal of bacterial endotoxin. *Journal of Chromatography B*, **693**, 79-91.
- PFLEIDERER, G., WIELAND, T. UND JECKEL, D. (1956). Über die Einwirkung von Sulfit auf einige DPN hydrierende Enzyme. *Biochemische Zeitschrift*, **328**, 187-194.
- PISABARRO, A.G., DE PEDRO, M.A., VAZQUEZ, D. (1985). Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *J. Bacteriol.*, **161**, 238-242.

PLATE, K., WEIB, T., STEUBER, D., BUCHHOLZ, H., DEMMER, W., ULBER, R. UND SCHEPER, T. (2000). Profitable processing of cheese whey – Isolation of Bovine Lactoferrin via Membrane Adsorber. *Vortrag anlässlich der Tagung „Biotechnology 2000 – The World Congress on Biotechnology“*. Berlin, 2000.

POULSON, P.B. (1984). Current Applications of Immobilized Enzymes for Manufacturing purposes. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, **1**, 121-140.

PRPIC, V., UHING, R.J. UND GETTYS, T.W. (1993). Separation and assay of six DEAE chromatography and [<sup>32</sup>P]cAMP. *Anal. Biochem.*, **208**, 155-160.

PUKALL, R. (1999). Mündliche Mitteilung.

RAJAGOPALAN, K.V. UND JOHNSON, J.L. (1977). Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase. Isolation and characterization of molybdenum and heme domains. *Journal of Biological Chemistry*, **252**, 2017-2025.

RAJAGOPALAN, K.V. (1980). Sulfite Oxidase. In *Molybdenum and molybdenum containing enzymes*. (Coughlan, M., ed.), Pergamon Press Oxford, 242-272.

RATNAM, K., BRODY, M.S. UND HILLE, R. (1996). Purification of xanthine dehydrogenase and sulfite oxidase from chicken liver. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **26(2)**, 143-154.

RECHKEMMER, G. (2001). Beitrag auf der Homepage des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Rechkemmer ist Direktor der Bundesforschungsanstalt für Ernährung.

<http://www.verbraucherministerium.de/forschungsreport/rep-so-01/food.htm>

REES, D.C., HU, Y., KISKER, C. UND SCHINDELIN, H. (1996). A crystallographic view of the molybdenum cofactor. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3909-3914.

REMMERS, P. (1992). Herstellung, Charakterisierung und Einsatz neuer Polymergelperlen als Biokatalysatoren zur kontinuierlichen Denitrifikation von Trinkwasser in einer dazu entwickelten Reaktorkaskade. Dissertation TU Braunschweig.

RODIN, I.V. UND MARGULIS, E.V. (1983). Solubility of Magnesium, Calcium and Manganese Sulphites in Water. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, **28(1)**, 144.

ROMANO, J., JANDIK, P., JONES, W.R. UND JACKSON, P.E. (1991). Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples. *Journal of Chromatography*, **546(1-2)**, 411-421.

ROPER, D.K. UND LIGHTFOOT, E.N. (1995). Separation of Biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography*, **702**, 3-26.

- RUPAR, C.A., GILLETT, J., GORDON, B.A., RAMSAY, D.A., JOHNSON, J.L., GARRETT, R.M., RAJAGOPALAN, K.V., JUNG, J.H., BACHEYIE, G.S. UND SELLERS, A.R. (1996). Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. *Neuropediatrics*, **27**, 299-304.
- SALOMON, D.R. UND ROMANO, J. (1992). Rapid Ion Monitoring of Kraft Process Liquors by Capillary Electrophoresis. *Process Control and Quality*, **3**, 219-227.
- SALUSBURY, T. (1989). Clarification and Extraction: Disruption. In *Protein purification methods: A practical approach* (Harris, E.L.V. und Angal, S., Eds.) IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- SARFERT, F.T. UND ETZEL, M.R. (1997). Mass transfer limitations in protein separations using ion-exchange membranes. *Journal of Chromatography A*, **764**, 3-20.
- SARTORIUS (1998). Produktinformationen der Firma Sartorius zur Produktreihe Sartobind®.
- SASAKI, S., ARIKAWA, Y., SHIMOMURA, M., IKEBUKURO, K. AND KARUBE, I. (1997). Measurement of sulfite using sulfite oxidase and luminol chemiluminescence. *Anal. Commun.*, **34**, 299-301.
- SCHIWECK, H., MUNIR, M., RAPP, K.M., SCHNEIDER, B. UND VOGEL, M. (1991). New Developments in the Use of Sucrose as an Industrial Bulk Chemical. In *Carbohydrates as Organic Raw Materials* (Lichtenthaler, F.W., Ed.) VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- SCHWEDT, G. UND BÄURLE, A. (1985). Methodenvergleiche (Photometrie, HPLC, Enzymatische Analyse) zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **322**, 350-353.
- SHINOSAKI, A. UND ABE, K. (1988). European Patent, 0303 122 A2.
- SIGMA-ALDRICH (1993). Sigma Quality Control Test Procedure. Enzymatic assay of Sulfite Oxidase (EC 1.8.3.1). Produktinformation der Firma Sigma-Aldrich.
- SIGMA-ALDRICH (2002). Produktinformation der Firma Sigma-Aldrich zum Kultivierungsmedium 5467.
- SIMON, R.A. (1984). Adverse reactions to drug additives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **74**, 623-630.
- SIMMONDS, S. UND TOYE, N.O. (1966). Peptidases in Spheroplasts of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, **241(16)**, 3852-3860.
- SITUMORANG, M., HIBBERT, D.B., GOODING, J.J. AND BARNETT, D. (1999). A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis. *Analyst*, **124**, 1775-1779.
- SKŁODOWSKA, A. (1990). Partial purification of sulfite oxidase from *Thiobacillus neapolitanus*. *FEMS Microbiology Letters*, **87**, 59-62.

- SMIDSRØD, O. UND SKJÅK-BRÆK, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, **8**, 71-78.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.K., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150(1)**, 76-85.
- SMITH, V.J. (1987). Determination of sulfite using a sulfite oxidase enzyme electrode. *Anal. Chem.*, **59**, 2256-2259.
- SOFER, G. UND HAGEL, L. (1997). Handbook of Process Chromatography. A Guide to Optimization, Scale-Up and Validation. Academic Press, New York.
- SORENSEN, K. UND BRODBECK, U. (1986). A sensitive protein assay using microtiter® plates. *J. Immunol. Meth.*, **95**, 291-293.
- SOROKIN, D.Y. (1995). *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. – A new Heterotrophic Bacterium from the Black Sea, Specialized of Sulfite Oxidation. *Microbiology*, **64(3)**, 295-305.
- SOROKIN, D.Y., VEDENINA, I.Y. AND GRABOVICH, M.Y. (1999). Influence of sulfite on acetate metabolism in *Sulfitobacter pontiacus* growing in continuous culture. *Microbiology*, **68(1)**, 14-20.
- SOUTHERLAND, W.M. UND RAJAGOPALAN, K.V. (1978). Domain interactions in oxidised and reduced forms of rat liver sulfite oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **253**, 8753-8758.
- SPLITT, H., MACKENSTEDT, I. UND FREITAG, R. (1996). Preparative membrane adsorber chromatography for the isolation of cow milk components. *Journal of Chromatography A*, **729**, 87-97.
- STANFORD, E.E.C. (1883). New substances obtained from some of the commoner species of marine algae. *J. of Chem. Soc.*, **44**, 943-944.
- STEVENSON, D.D. UND SIMON, R.A. (1981). Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **68**, 26-32.
- STIEFEL, E.I. (1997). Chemical keys to molybdenum enzymes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3915-3923.
- STRÄHLE, J. UND SCHWEDA, E. (1990). Jander · Blasius Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum, 13. neu bearbeitete Auflage, S. Hirzel Verlag (Stuttgart).
- STRYER, L. (1999). Biochemie. 1. korrigierter Nachdruck der 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- SU, Y.-C. UND TAYLOR, S.L. (1995). Sulphite analysis of food ingredients: false positive results with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method. *Food Additives and Contaminants*, **12(2)**, 153-160.
- SUGIO, T., KATAGIRI, T., MORIYAMA, M., ZHEN, Y.L., INAGAKI, K. UND TANO, T. (1988). Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology*, **54(1)**, 153-157.
- SWAN, J.M. (1957). Thiols, disulphides and thiosulfates: Some new reactions and possibilities in peptide and protein chemistry. *Nature*, **180**, 643-645.
- TANAKA, H., MATSUMURA, M. UND VELIKY, I.A. (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 53-58.
- THÖMMES, J. UND KULA, M.R. (1995). Membrane Chromatography – An integrative concept in the Downstream Processing of Proteins. *Biotechnol. Prog.*, **11**, 357-367.
- TSUCHIDO, T., KATSUI, N., TAKEUCHI, A., TAKANO, M. UND SHIBASAKI, I. (1985). Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 298-303.
- VAN DER LINDEN, T. (1916). *Deutsche Zuckerindustrie*, **41**, 815.
- VAN PÈE, K.-H. (1996). Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, **50**, 375-399.
- VAN PÈE, K.-H. (2001). Microbial biosynthesis of halometabolites. *Archives of Microbiology*, **175(4)**, 250-258.
- VAN'T RIET, K. (1979). Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind Eng Chem Process Des Dev*, **18**, 357-364.
- VORLOP, K.D. UND JEKEL, M. (2000). Verfahren zur Herstellung eines Gels aus Polyvinylalkohol und nach dem Verfahren hergestelltes mechanisch hochstabiles Gel. *Patentschrift DE 19827552 C1*.
- WARNER, T. UND KOSTEL, P. (2000). Mustang Q Disposable Capsules and Cartridges. Chromatography Units for process scale DNA removal. *Genetic Engineering News*, **20(19)**.
- WATSON, J.S., CUMMING, R.H., STREET, G. UND TUFFNELL, J.M. (1987). Release of intracellular proteins by thermolysis. In *Separations for Biotechnology* (Verrall, M.S. und Hudson, M.J., editors) Ellis Horwood (London), 105-109.
- WEUSTER-BOTZ, D., PRAMATAROVA, V., SPASSOV, G. UND WANDREY, C. (1995). Use of a Genetic Algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high Hydrocortisone  $\Delta^1$ -Dehydrogenase Activity. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **64**, 386-392.



- WHITE, M.D. UND MARCUS, D. (1988). Disintegration of Microorganisms. *Adv. Biotechnol. Process*, **8**, 51-96.
- WHO (1987). *Acceptability of all substrates for production of biologicals. Report of a WHO study group. Technical Report Series 747*. World Health Organisation, Genf.
- WITHOLT, B., BOEKHOUT, M., BROCK, M., KINGMA, J., VAN HEERIKHUIZEN, H. UND DE LEIJ, L. (1976). An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, **74(1)**, 161-170.
- WOOD, A.P. AND KELLY, D.P. (1987). Chemolithotrophic metabolism of the newly-isolated moderately thermophilic, obligately autotrophic *Thiobacillus tepidarius*. *Archives of Microbiology*, **113**, 265-274.
- YANG, W.H. UND PURCHASE, E.C.R. (1985). Adverse reactions to sulfite: A current review. *Canadian Medical Association Journal*, **133**, 865.
- ZIETLOW, M.F. UND ETZEL, M.R. (1995). Evaluation of sulfopropyl ion-exchange membrane cartridges for isolation of proteins from bovine whey. *Journal of Liquid Chromatography*, **18(5)**, 1001-1018.
- ZOBELL, C.E. (1941). Studies on marine bacteria. I. The Cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research*, **4(1)**, 42-75.
- ŽUŽEK, M., FRIEDRICH, J., CESTNIK, A., KARALIČ, A. UND CIMERMAN, A. (1996). Optimization of fermentation medium by a modified method of Genetic Algorithm. *Biotechnology Techniques*, **10(12)**, 991-996.
- ZHU, Z., SUN, D. UND DAVIDSON, V.L. (1999). Localization of periplasmic redox proteins by a modified general method for fractionating gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, **181(20)**, 6540-6542.

## Lebenslauf

Name: Matthias Arndt  
Geburtsdatum: 10.03.1972  
Geburtsort: Hannover

### Schulbildung

1978-1982 Grundschule in Hannover  
1982-1984 Orientierungsstufe in Hannover  
1984-1991 Gymnasium Humboldtschule in Hannover, Abitur

### Wehrdienst

1991-1992 Grundwehrdienst in Hannover

### Hochschulbildung

Oktober 1992 Beginn des Chemiestudiums an der Universität Hannover  
Oktober 1994 Vordiplom  
06/1997 – 01/1998 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover  
Januar 1998 Abschluß des Studiums als Diplom-Chemiker

### Auslandspraktikum

10/1994 – 04/1995 Imperial College of Science, Technology and Medicine, London

### Promotion

02/1998 – 01/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover  
November 2002 Promotionsprüfung