

**Bioprozeßoptimierung und Scale-up der
Tropodithiolsäure-Produktion durch das marine
Bakterium *Ruegeria* sp. Stamm T5**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Biotechnol. Thorsten Heidorn

geb. am 14.8.1970 in Ebingen

2002

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Marinus Meiners

Tag der Promotion: 22.11.2002

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Produktion der antibiotisch wirksamen Tropodithiätsäure durch das marine Bakterium *Ruegeria* sp. Stamm T5 optimiert und eine Maßstabsvergrößerung ermöglicht. Dazu wurden die optimale Temperatur, der optimale pH-Wert und die optimale Salinität in Bezug auf Wachstum und Produktbildung bestimmt und ein definiertes Produktionsmedium entwickelt. Desweiteren wurde die kontinuierliche Kultivierung, die Kultivierung immobilisierter Zellen und die integrierte Produktabtrennung untersucht. Für die Gewinnung der Tropodithiätsäure ohne wesentliche Nebenprodukte wird ein definiertes Produktionsmedium mit Mineralsalzen und den Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Histidin vorgeschlagen. In einer 100 l-Fermentation wurden 2,6 g Tropodithiätsäure produziert.

Schlagerworte: Bioprozeßoptimierung, marines Bakterium, Antibiotikum

Abstract

In this thesis the production of the antibiotic tropodithietic acid by the marine bacterium *Ruegeria* sp. Stamm T5 was optimized and a scale-up could be performed. For this aim the optimal temperature, the optimal pH and the optimal salinity referring to growth and production were determined and a defined production medium has been developed. Furthermore the continuous cultivation, the cultivation with immobilized cells and the integrated product separation was examined. To gain tropodithietic acid without significant by products it is recommended to use a defined production medium with mineralsalts and the amino acids L-phenylalanine and L-histidine. 2.6 g tropodithietic acid was produced in a 100 l-fermentation.

key-words: bioprocess optimization, marine bacterium, antibiotic

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Mikroorganismus	7
2.2 Chemikalien und Nährmedien.....	8
2.2.1 Chemikalien	8
2.2.2 Nährmedien.....	8
2.3 Stammkulturhaltung.....	9
2.4 Kultivierungsmethoden	11
2.4.1 Kultivierungen in der Mikrotiterplatte.....	11
2.4.2 Kultivierungen im Kulturröhrchen	11
2.4.3 Kultivierungen im Schüttelkolben	11
2.4.4 Kultivierungen im Bioreaktor.....	12
2.4.4.1 Kultivierung im 1,5 l-Bioreaktor	12
2.4.4.2 Kultivierung im 10 l-Bioreaktor	14
2.4.4.3 Kultivierung im 100 l-Bioreaktor	14
2.5 Aufarbeitung	15
2.5.1 Solventextraktion	15
2.5.2 Adsorptionschromatographie.....	15
2.6 Analytik.....	16
2.6.1 Quantifizierung der Zellkonzentration.....	16
2.6.1.1 Bestimmung der optischen Dichte.....	16
2.6.1.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	17
2.6.2 Bestimmung der Glucosekonzentration.....	17
2.6.3 Bestimmung der L-Phenylalanin- und der Produktkonzentration mittels HPLC	18

2.6.4	Plattendiffusionstest.....	20
2.6.5	Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen.....	20
2.7	Berechnung einzelner Zielgrößen.....	21
2.7.1	Spezifische Wachstumsrate μ	21
2.7.2	Produktbildungsrate p	21
2.7.3	Produktausbeute $Y_{P/S}$	21
2.7.4	Produktertrag $Y_{P/X}$	22
2.7.5	Spezifische Produktbildungsrate q_p	22
2.8	Genetischer Algorithmus	22
2.9	Immobilisierung	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Ergebnisse der Projektpartner als Grundlage dieser Arbeit	27
3.1.1	Isolierung und Eigenschaften des Stammes T5	27
3.1.2	Identifizierung des Stammes T5	28
3.1.3	Screening	29
3.1.4	Aufklärung des Produktes.....	29
3.2	Optimierung physikalischer und chemischer Bedingungen bezüglich des Wachstums und der Produktbildung	30
3.2.1	Temperatur.....	30
3.2.2	pH-Wert	30
3.2.3	Salinität	31
3.3	Entwicklung eines Minimalmediums als Grundlage für ein definiertes Produktionsmedium	33
3.3.1	Untersuchung des Wachstums auf essentielle Vitamine	34
3.3.2	Untersuchung des Wachstums auf essentielle Aminosäuren.....	35

3.3.3	Verbrauch von Aminosäuren	36
3.3.4	Nutzung von verschiedenen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle	37
3.4	Entwicklung eines definierten Produktionsmediums	38
3.4.1	Einfluß von Aminosäuren auf die Produktbildung	38
3.4.2	Einfluß von Kohlenstoffquellen auf die Produktbildung	44
3.4.3	Einfluß von Stickstoffquellen auf die Produktbildung	47
3.4.4	Einfluß von Phosphat, Spurenelementen und Vitaminen auf die Produktbildung.....	49
3.4.5	Einfluß der Mineralsalze auf die Produktbildung.....	50
3.4.6	Einfluß des Produktes (Produktinhibierung)	51
3.4.7	Zusammensetzung des definierten Produktionsmediums als Ergebnis der Medienoptimierung.....	51
3.5	Scale-up der Kultivierung im Bioreaktor	52
3.5.1	Kultivierung im 1,5 l-Bioreaktor	52
3.5.1.1	Fermentation mit Marine Broth	52
3.5.1.2	Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium	54
3.5.2	Kultivierung im 10 l-Bioreaktor	57
3.5.3	Kultivierung im 100 l-Bioreaktor	59
3.6	Optimierung der Produktaufarbeitung	62
3.6.1	Vergleich der Solventextraktion mit der Adsorptionschromatographie	62
3.6.2	Vergleich verschiedener Adsorberharze	63
3.6.3	Scale-up der Extraktionssäule.....	64
3.7	Aufbau eines kontinuierlichen Produktionsprozesses.....	67
3.7.1	Kontinuierliche Produktion im Chemostaten	67
3.7.2	Einsatz immobilisierter Zellen.....	72
3.7.3	Integrierte Produktabtrennung	76

4 Diskussion	79
4.1 Optimierung physikalischer und chemischer Bedingungen bezüglich des Wachstums und der Produktbildung	79
4.2 Entwicklung eines Minimalmediums als Grundlage für ein definiertes Produktionsmedium	80
4.3 Entwicklung eines definierten Produktionsmediums.....	82
4.4 Scale-up der Kultivierung im Bioreaktor.....	86
4.5 Optimierung der Produktaufarbeitung	90
4.6 Aufbau eines kontinuierlichen Produktionsprozesses.....	93
4.7 Fazit und Ausblick	97
5 Zusammenfassung	99
6 Literatur	101
7 Anhang	107
7.1 Korrelation Biotrockenmasse - Optische Dichte.....	107
7.2 Kalibriergeraden für die HPLC	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Schema der integrierten Produktabtrennung	13
Abb. 2.2:	DAD-Contourplot.....	19
Abb. 2.3:	Spektrum der Tropodithiätsäure	19
Abb. 2.4:	Fluoreszenzdetektor-Chromatogramm	19
Abb. 3.1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom Stamm T5	27
Abb. 3.2:	Stammbaum der genetischen Verwandtschaft des Stammes T5	28
Abb. 3.3:	Plattendiffusionstest gegen <i>B. subtilis</i>	29
Abb. 3.4:	Tropodithiätsäure.....	29
Abb. 3.5:	Temperatur- und pH-Optima bei pH 7,0 bzw. 30 °C bezüglich Wachstumsrate (μ_{\max}) und Produktbildungsrate (p_{\max})	31
Abb. 3.6:	Salinitätsoptima bezüglich Wachstumsrate (μ_{\max}) und Produktkonzentration (TDTA-Konz.)	32
Abb. 3.7:	Untersuchung des Wachstums auf essentielle Vitamine	34
Abb. 3.8:	Untersuchung des Wachstums auf essentielle Aminosäuren	35
Abb. 3.9:	Verbrauch von Aminosäuren.....	36
Abb. 3.10:	Nutzung von Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle	37
Abb. 3.11:	Die Produktkonzentration in der Entwicklung des definierten Mediums.....	39
Abb. 3.12:	Im genetischen Algorithmus eingesetzte Aminosäurevolumina und erhaltene TDTA- u. Nebenproduktkonzentrationen.....	41
Abb. 3.13:	Produktkonzentration bei verschiedenen AS-Kombinationen	42
Abb. 3.14:	Vergleich zweier definierter Medien, die sich nur in den Aminosäuren L-Phenylalanin (oben) bzw. L-Tryptophan (unten) unterscheiden.....	43
Abb. 3.15:	Produktbildung in Abhängigkeit von der Phe-Konzentration	43
Abb. 3.16:	Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Produktbildung	45

Abb. 3.17: Einfluß von Glucose und Phe in MB auf Wachstum und Produktbildung	46
Abb. 3.18: Einfluß von versch. C-Quellen in MB auf Wachstum und Produktbildung	47
Abb. 3.19: Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Produktbildung	48
Abb. 3.20: Einfluß von HE auf Wachstum und Produktbildung.....	48
Abb. 3.21: Einfluß von PO ₄ , SE und Vitaminen auf Wachstum und Produktbildung.....	49
Abb. 3.22: Einfluß der Mineralsalze auf Wachstum und Produktbildung	50
Abb. 3.23: 1,5 l-Fermentation mit Marine Broth	53
Abb. 3.24: 1,5 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium	55
Abb. 3.25: 8 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium	58
Abb. 3.26: 100 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium	61
Abb. 3.27: Vergleich von Solventextraktion und Adsorptionschromatographie	63
Abb. 3.28: Vergleich verschiedener Adsorberharze.....	64
Abb. 3.29: Test auf ausreichende Kapazität (Breakthrough)	65
Abb. 3.30: Chemostat-Fermentation	68
Abb. 3.31: Vergleich von Verdünnungsrate und Auswaschrage	70
Abb. 3.32: Veränderung der Zellmorphologie	71
Abb. 3.33: Immobilisierte Zellen im Schüttelkolben	73
Abb. 3.34: Fermentation mit immobilisierten Zellen	75
Abb. 3.35: Integrierte Produktabtrennung.....	77
Abb. 4.1: Vergleich der Bioreaktor-Kultivierungen.....	88
Abb. 4.2: Vergleich der Produkterträge und spez. Produktbildungsraten.....	89
Abb. 7.1a: Korrelation Biomasse - Optische Dichte mit Marine Broth	107
Abb. 7.1b: Korrelation Biomasse - Optische Dichte mit Medium „Vorkultur“ ...	107
Abb. 7.2a: Kalibriergerade für die Produktkonzentrationsbestimmung.....	108
Abb. 7.2b: Kalibriergerade zur Bestimmung der L-Phenylalanin-Konzentration..	108

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete Medienkomponenten.....	8
Tab. 2.2:	Medienliste	10
Tab. 2.3:	HPLC-Analyse.....	18
Tab. 2.4:	Einstellungen im Programm GALOP.....	24
Tab. 3.1:	Gruppeneinteilung der Aminosäuren.....	39
Tab. 3.2:	Hemmung von T5 durch Tropodithiolsäure	51
Tab. 3.3:	1,5 l-Fermentation mit MB.....	54
Tab. 3.4:	1,5 l-Fermentation mit def. Medium	56
Tab. 3.5:	8 l-Fermentation mit def. Medium	59
Tab. 3.6:	100 l-Fermentation mit def. Medium	60
Tab. 3.7:	Vergleich der Eigenschaften der Harze	63
Tab. 3.8:	Chemostat-Kultivierung mit Marine Broth	69
Tab. 3.9:	Fermentation mit immobilisierten Zellen.....	76
Tab. 4.1:	Übersicht über die Fermentationen.....	86
Tab. 4.2:	Fermentation ohne/mit Immobilisierung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ala	L-Alanin
Arg	L-Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
BTM	Biotrockenmasse
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Cys	L-Cystein
DAD	Diodenarraydetector
DC	Dünnschichtchromatogramm
EtAc	Ethylacetat
FMT	FairMenTec
GA	Genetischer Algorithmus
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
Gly	Glycin
HE	Hefeextrakt
His	L-Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ile	L-Isoleucin
Konz.	Konzentration
Leu	L-Leucin
Lys	L-Lysin
m.R.	mit (pH-)Regelung

MB	Marine Broth
Met	L-Methionin
MM	Minimalmedium
MS	Mineralsalze
N-Quelle	Stickstoffquelle
o.R.	ohne (pH-)Regelung
OD	Optische Dichte
p	Produktbildungsrate (in h^{-1})
P	Produktkonzentration (in M)
Phe	L-Phenylalanin
Pro	L-Prolin
PVA	Polyvinylalkohol
q_p	spezifische Produktbildungsrate (in $\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
RP-Säule	reversed phase-Säule
S	Substratkonzentration (in M)
SE	Spurenelemente
Ser	L-Serin
t	Zeit (in h)
Tab.	Tabelle
TDTA	Tropodithiolsäure (tropodithietic acid)
Thr	L-Threonin
Trp	L-Tryptophan
Tyr	L-Tyrosin
Val	L-Valin
X	Biomassekonzentration (in g l^{-1})

$Y_{P/S}$ Produktausbeute (in mol mol^{-1})

$Y_{P/X}$ Produktertrag (in mol g^{-1})

μ relative Wachstumsrate (in h^{-1})

1 Einleitung

Auf der Suche nach Wirkstoffen zur Bekämpfung von bisher nur schwer oder gar nicht heilbaren Krankheiten (Krebs, AIDS) und Infektionen nimmt sich die medizinische Forschung die Natur als Vorbild und versucht, die von Makro- und Mikroorganismen gebildeten Naturstoffe, für die eigenen Zwecke zu nutzen [Demain 1999].

Schon in der frühen Menschheitsgeschichte haben Menschen bemerkt, daß z.B. Extrakte aus bestimmten Pflanzen eine Linderung oder gar Heilung von Krankheiten bewirkten, ohne zu wissen, warum. Die traditionelle chinesische Medizin ist das beste Beispiel für den Erfolg dieser in Jahrtausenden empirisch gefundenen Substanzen aus der Natur, für deren Wirkung teilweise sogar die moderne Schulmedizin noch keine Erklärung hat. Chinesische Wissenschaftler wollen jetzt das althergebrachte Wissen mit der modernen Genomforschung verbinden [Mietzsch et al. 2002].

Im Laufe der Zeit haben die Wissenschaftler gelernt, die für eine beobachtete Wirkung verantwortliche Substanz zu isolieren und, nach Entwicklung von leistungsfähigen Analysemethoden, in der Struktur aufzuklären. Seitdem wird gezielt nach solchen pharmazeutisch wirksamen Naturstoffen gesucht, zunächst hauptsächlich bei Pflanzen, später auch bei Mikroorganismen. Die Herstellung dieser Substanzen erfolgte vorwiegend durch chemische Synthese.

Einen entscheidenden Durchbruch sowohl in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten als auch bei der Entwicklung und Produktion von Arzneimitteln hat die Entdeckung des Penicillins aus einem Schimmelpilz gebracht

(1928 durch A. Fleming). Einerseits ist das weite Gebiet der Antibiotika erschlossen worden, andererseits begann man, Mikroorganismen zur technischen Produktion von Naturstoffen zu nutzen [Demain 2000].

Seitdem sind zahlreiche Naturstoffe entdeckt worden, die teils chemisch synthetisiert, teils durch Mikroorganismen in Bioreaktoren produziert werden. Möglich sind auch Mischformen, d.h. mikrobielle Vorstufen werden synthetisch weiterverarbeitet (halbsynthetische Produkte), oder umgekehrt, synthetische Vorstufen werden durch Mikroorganismen umgewandelt (Biokonversion).

Während man lange Zeit fast ausschließlich terrestrische Quellen für die Entdeckung neuer Naturstoffe durchforschte (vor allem die im Boden lebenden Streptomyceten haben sich als sehr gehaltvoller Naturstoffpool herausgestellt [Watve et al. 2001]), begann man später, auch das Meer nach Wirkstoffproduzenten zu durchsuchen. Vergleicht man Fläche, Volumen und Lebensbedingungen des terrestrischen mit dem marinen Lebensraum, so dürfte die Wahrscheinlichkeit, neue Wirkstoffe zu finden, im marinen Bereich um ein Vielfaches höher sein. Auch die Erkenntnis, daß sehr oft extreme Bedingungen (Streß) die Produktion von Sekundärmetaboliten fördern, spricht eher für einen Sucherfolg im Meer, da es dort ein sehr großes Spektrum an verschiedenen Lebensräumen mit unterschiedlichen Temperatur-, Druck-, Salinitäts- und Nährstoffbedingungen gibt [Fenical 1993, Fenical u. Jensen 1993, Jensen u. Fenical 1994, Munro et al. 1998, Riguera 1997, Sponga et al. 1998].

Obwohl das alles sehr erfolgversprechende Voraussetzungen für die Wirkstoffsuche im Meer sind, lassen die großen Erfolge der marinen Biotechnologie noch auf sich warten. Ein großes Problem ist die unzureichende Kultivierbarkeit der marinen Mikroorganismen unter Laborbedingungen. Durch moderne molekularbiologische Methoden konnte man feststellen, daß nicht einmal 1 % der als Klon detektierten Organismen kultivierbar sind. Gründe dafür könnten das Fehlen bisher nicht bekannter Nährstoffe, die Notwendigkeit von komplexen Wechselbeziehungen

zwischen Organismen, die im Labor nur schwer nachvollzogen werden können, oder die im Labor üblichen hohen Nährstoffkonzentrationen sein, die das Wachstum von an geringe Konzentrationen angepaßten Organismen unterdrücken.

Es gibt vielversprechende Wirkstoffe marinen Ursprungs, die sich schon in der klinischen Prüfung befinden. Das bekannteste Beispiel ist wohl das Bryostatin 1, das zuerst aus dem Moostierchen *Bugula neritina* isoliert wurde und Antitumorwirkung besitzt. Mittlerweile gibt es deutliche Hinweise darauf, daß der Wirkstoff von einem bakteriellen Symbionten des Moostierchens gebildet wird und nicht vom Moostierchen selber [Davidson et al. 2001]. Würde man diese Bakterien im großen Maßstab kultivieren und dabei den Wirkstoff produzieren können, wäre das bisherige Problem der Substanzbeschaffung (aus einer Tonne Moostierchen-Biomasse werden nur wenige mg Produkt gewonnen) gelöst. Außerdem hätte man dann eventuell die Möglichkeit einer Produktion durch rekombinante Bakterien.

Wenn ein mariner bakterieller Wirkstoffproduzent durch ein chemisches oder biologisches Screening gefunden ist, sollte dieser so kultiviert werden, daß das Produkt in einer für Strukturaufklärung und weitere Tests ausreichenden Menge aufgereinigt werden kann. Da die unter Standardbedingungen im Schüttelkolben erhaltenen Produktmengen für diese Zwecke oft nicht ausreichen, muß der Produktionsprozeß bezüglich der Produktivität optimiert und in einen größeren Maßstab übertragen werden.

Die Optimierung eines Produktionsprozesses beinhaltet zum einen die Optimierung der physikalischen und chemischen Bedingungen und zum anderen die Wahl einer geeigneten Prozeßführung [Marwick et al. 1999, Parekh et al. 2000]. In Produktionsprozessen werden meist komplexe Nährmedien verwendet, die alle zum Wachsen notwendigen Substanzen beinhalten und preiswert sind. Nachteile von komplexen Medien sind eine nicht immer gewährleistete Reproduzierbarkeit und die Erschwerung der Aufarbeitung durch nicht verwertbare Mediumsbestandteile oder gebildete Nebenprodukte. Durch die Verwendung eines definierten Mediums kann

man den Stoffwechsel der Organismen besser beeinflussen und eventuell die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten unterdrücken. Die höheren Ausgaben für ein definiertes Medium können durch Einsparungen bei der Aufarbeitung wieder ausgeglichen werden [Greasham 1993, Zhang u. Greasham 1999]. Bei der Prozeßführung unterscheidet man die absatzweise und die kontinuierliche Betriebsweise. Anzustreben wäre sicherlich die kontinuierliche Betriebsweise, da hier Ausfallzeiten für Reinigung, Sterilisation und Ansatz wegfallen und man von einer gleichbleibenden Produktqualität ausgehen kann. In der Praxis ist die kontinuierliche Produktion jedoch selten, da ein stabiler Prozeß meist nicht über längere Zeit aufrecht erhalten werden kann [Demain u. Solomon 1986].

Im Rahmen des niedersächsischen Forschungsschwerpunktes „Meeresbiotechnologie“ konnte durch interdisziplinäre Zusammenarbeit von Mikrobiologen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Simon, Universität Oldenburg), Chemikern (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zeeck, Universität Göttingen) und Biotechnologen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Meiners, Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven) der bisher nicht bekannte Bakterienstamm T5 der Gattung *Ruegeria* aus dem ostfriesischen Wattenmeer isoliert und die Struktur eines von diesem produzierten antibiotisch wirksamen Naturstoffes aufgeklärt werden. Bei dem Naturstoff handelt es sich um die Tropodithiätsäure, die bisher ebenfalls noch nicht bekannt war und eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Bakterien, Algen, Nematoden, Salinenkrebse und Tumorzellen zeigte.

Der Stamm T5 ist phylogenetisch in das *Roseobacter*-Cluster innerhalb der Alpha-Untergruppe der Proteobakterien einzuordnen [Shiba 1992]. Die Alpha-Untergruppe der Proteobakterien beinhaltet die größte Gruppe der in marinen Lebensräumen isolierten DNA-Klone, innerhalb der bisher nur im *Roseobacter*-Cluster kultivierbare Stämme gefunden worden sind. Durch die Verbreitung in den verschiedensten marinen Habitaten weltweit und der offensichtlichen Anpassung an marine

Lebensbedingungen durch z.B. absolute NaCl-Abhängigkeit scheinen die Organismen des *Roseobacter*-Clusters eine interessante Rolle in der marinen Ökologie zu spielen [Lang et al. 2002]. Weitere Vertreter der Gattung *Ruegeria*, die zunächst der Gattung *Roseobacter* zugeordnet waren [Uchino et al. 1998, Brinkhoff et al. in Vorb.], wurden in Kulturen von höheren Organismen, wie dem Toxinproduzierenden Dinoflagellaten *Prorocentrum lima* (*R. algicola*) [Lafay et al. 1995] oder den Larven der Kammuschel *Pecten maximus* (*R. gallaeciensis*) [Ruiz-Ponte et al. 1998], isoliert. Bei dem nächsten Verwandten des Stammes T5, *R. gallaeciensis*, wurde eine antibiotische Wirkung gegen zahlreiche Bakterien (besonders *vibrio spp.*) beobachtet. Außerdem haben aus diesem Organismus gewonnenen Extrakte eine probiotische Wirkung auf die Larven der Kammuschel ausgeübt [Ruiz-Ponte et al. 1998]. Eigene Untersuchungen des Extraktes von *R. gallaeciensis* haben gezeigt, daß dieser Organismus eine Substanz mit dem der Tropodithiolsäure entsprechenden UV-Spektrum produziert, es sich also höchstwahrscheinlich um die gleiche Verbindung handelt.

Die Tropodithiolsäure ist ein Schwefel enthaltendes Tropolonderivat. Eine ähnliche Verbindung, das Thiotropocin [Kintaka et al. 1984, Tsubotani et al. 1984], wird u.a. von einem marinen Bakterium, das von Mikroalgen isoliert worden ist, produziert [Kawano et al. 1997]. Dem Thiotropocin wurde ebenfalls eine vielfältige antibiotische und auch eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von HUVEC und Tumorzellen nachgewiesen [Kawano et al. 1998].

Ziel dieser Arbeit war es, die Produktion der Tropodithiolsäure durch den Stamm T5 zu optimieren und eine Maßstabsvergrößerung zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismus

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismus wurde von Dr. Thorsten Brinkhoff (Arbeitsgruppe Prof. Simon, Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM), Universität Oldenburg) aus einer Wasserprobe isoliert, die aus einer Wasserlache im Watt vor der Ostfriesischen Nordseeküste auf der Höhe von Neuharlingersiel genommen wurde. Die Wassertemperatur betrug 9,6 °C, der pH-Wert 7,9, die Sauerstoffsättigung 94 % und die Salinität 34 ‰.

Mit dieser Probe wurden Verdünnungsreihen mit Marine Broth angefertigt, die bei 4, 15, 20 und 28 °C im Dunkeln auf einem Schüttler für vier Wochen inkubiert worden sind. Die jeweils niedrigste und höchste bewachsene Verdünnungsstufe wurde auf Platten mit Marine Agar ausplattiert und erneut bei 4, 15, 20 und 28 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reinheit der erhaltenen Kolonien wurde durch mindestens dreimaliges Überimpfen gewährleistet.

Zur Identifizierung, die ebenfalls von Dr. Thorsten Brinkhoff durchgeführt worden ist, wurde die 16S rDNA sequenziert und mit schon bekannten Sequenzen der Datenbank BLAST verglichen. Mit dem Programm ARB wurde ein phylogenetischer Stammbaum nach der Methode des „maximum-likelihood tree“ erstellt (Brinkhoff et al. in Vorb.).

2.2 Chemikalien und Nährmedien

2.2.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Standardchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Grüssing, Filsum
- Merck, Darmstadt
- Fluka, Neu-Ulm
- Riedel de Haën, Seelze
- Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Für die Herstellung der Nährmedien wurden außerdem folgende Komponenten benutzt:

Tab. 2.1: verwendete Medienkomponenten

Komponente	Bezugsquelle
Marine Broth	
Bacto Hefeextrakt	alle
Bacto Pepton	Becton Dickinson / Difco,
Bacto Trypton	USA
Bacto Agar	

Die eingesetzten Amberlite[®] XAD-Adsorberharze wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen, das Harz Toyopearl[™] Butyl-650M von TosoHaas, USA.

2.2.2 Nährmedien

Bis auf die Medien für Agarplatten und die 8 l- und 100 l-Fermentation wurden alle Medien mittels eines Sterilfilters (0,2 µm, Sartorius, Göttingen) sterilisiert, um beim Autoklavieren mögliche Fällungen oder Reaktionen zwischen den Mediumskomponenten zu vermeiden. Beim Vorhandensein komplexer

Medienbestandteile wurde vorher durch einen Glasfaserfilter (Sartorius, Göttingen) vorfiltriert. Der pH-Wert wurde vor dem Sterilfiltrieren mit 1 M NaOH- bzw. 1 M H₂SO₄-Lösung eingestellt.

Die Nährmedien für Agarplatten (15 g l⁻¹ Bacto Agar) wurden für ca. 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Medien der 8 l- und 100 l-Fermentation wurden im Bioreaktor für ca. 30 min bei 121 °C sterilisiert.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Bei „Marine Broth“ (MB) sind die Komponenten mit „aus MB“ gekennzeichnet, die schon im fertigen Medium enthalten sind. Anhand der laufenden Nummer kann jedem Versuch ein Medium zugeordnet werden. Mit Ausnahme der komplexen Medienkomponenten wurden von allen anderen Komponenten Stammlösungen hergestellt, die eine einfache Konzentrationsvariation der Medienkomponenten in verschiedenen Medien zuließen.

2.3 Stammkulturhaltung

Von der Originalkultur sind zunächst Glycerinkulturen (je 1 ml) hergestellt worden, die als Stammkultur dienten. Aus diesen Stammkulturen wurden je nach Bedarf weitere „Arbeits-Stammkulturen“ hergestellt, die dann direkt zum Animpfen der jeweiligen Versuchsansätze benutzt wurden. Durch diese Vorgehensweise konnte ein häufiges Überimpfen und damit eine Veränderung des Organismus durch Mutationen oder den Verlust von Plasmiden vermieden werden.

Zur Herstellung der Glycerinkulturen wurde eine auf Marine Broth über Nacht gewachsene Schüttelkultur mit dem gleichen Volumen einer sterilen, 20 %igen Glycerinlösung versetzt und zu 1 ml-Portionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren.

Tab. 2.2: Medienliste

Nr.	komplex	Aminosäuren (AS)	C-Quelle	N-Quelle	Phosphat	Fe-Citrat	Mineralsalze (MS)	Spurenelemente (SE)	Vitamine	
Marine Broth (MB)	Pepton: 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt: 1 g l ⁻¹ (aus MB)				PO ₄ ³⁻ : 0,046 mM (aus MB)	0,4 mM (aus MB)	MS(MB) (aus MB)	SE (aus MB)		
1	Trypton: 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt: 2,5 g l ⁻¹				PO ₄ ³⁻ : 0,287 mM		0-63 g l ⁻¹	SE		
2			Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE		
3			Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	je Ansatz 1 Vitamin a 0,05 mg l ⁻¹	
4		je Ansatz 1 AS a 2 g l ⁻¹	Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE		
5		alle AS a 0,1 g l ⁻¹	Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
6				je Ansatz 1 C-Quelle a 1 g l ⁻¹	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹
7			Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
8	Hefeextrakt: 2 g l ⁻¹		Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
9		alle AS a 0,1 g l ⁻¹	Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
10		je Ansatz 3-6 AS a 0,3-0,6 g l ⁻¹	Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
11		His, Phe, Trp, Tyr je 0-0,17 g l ⁻¹	Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
12		Phe: 1-5 mM His: 0,05 mM	Glucose: 28 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
13		Phe: 5 mM His: 0,05 mM		je Ansatz 1 C-Quelle a 25 mM	NH ₄ Cl: 6 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹
14	Pepton: 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt: 1 g l ⁻¹ (aus MB)		Glucose: 50 mM		PO ₄ ³⁻ : 0,046 mM (aus MB)	0,4 mM (aus MB)	MS(MB) (aus MB)	SE (aus MB)		
15	Pepton: 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt: 1 g l ⁻¹ (aus MB)	Phe: 1 mM			PO ₄ ³⁻ : 0,046 mM (aus MB)	0,4 mM (aus MB)	MS(MB) (aus MB)	SE (aus MB)		
16	Pepton: 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt: 1 g l ⁻¹ (aus MB)			je Ansatz 1 C-Quelle a 10 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,046 mM (aus MB)	0,4 mM (aus MB)	MS(MB) (aus MB)	SE (aus MB)		
17		Phe: 5 mM His: 0,05 mM	Glucose: 25 mM	NH ₄ Cl: 28 mM Harnstoff: 25 mM NaNO ₃ : 18 mM	PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
18	Hefeextrakt: 1 g l ⁻¹	Phe: 5 mM His: 0,05 mM	Glucose: 25 mM		PO ₄ ³⁻ : 0,263 mM		MS	SE	alle Vitamine a 0,05 mg l ⁻¹	
19		Phe: 5 mM His: 0,05 mM			PO ₄ ³⁻ : 0,10,20 mM		MS	mit/ohne SE	mit/ohne allen Vitaminen a 0,05 mg l ⁻¹	
20		Phe: 5 mM His: 0,05 mM					MS ohne jeweils 1 Salz			
Fermentation:										
Vorkultur	Pepton: 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt: 1 g l ⁻¹						MS			
Hauptkultur		Phe: 5 mM His: 0,05 mM					MS			
Mineralsalze	mM MS(MB) MS	NaCl 332,5 372,0	KCl 7,4 8,5	MgCl ₂ 62,0 49,1	CaCl ₂ 12,2 9,3	Na ₂ SO ₄ 22,8 25,5	NaHCO ₃ 1,9 3,2	Salinität (g l ⁻¹) 30,8 32		
Spurenelemente	µM SE	KBr 672,3	H ₃ BO ₃ 360,7	SnCl ₂ 213,5	NaF 57,1	Na ₂ SiO ₃ 32,5	NH ₄ NO ₃ 20,0			
Vitamine	Nicotinsäure (Vitamin B)	Thiamin (Vitamin B ₁)	Pantothensäure (Vitamin B ₂)	Pyridoxal (Vitamin B ₆)	Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	Riboflavin (Vitamin G)	D(+)-Biotin (Vitamin H)			

2.4 Kultivierungsmethoden

2.4.1 Kultivierungen in der Mikrotiterplatte

Für Versuche, bei denen nur das Wachstum beobachtet wurde und gleichzeitig viele Versuchsansätze notwendig waren, wurden sterile Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen („96-well“) benutzt. Für jede Mediumzusammensetzung wurden 500 µl des Mediums mit 15 µl einer mit der Mineralsalzlösung (MS) gewaschenen Glycerinkultur angeimpft und zu je 150 µl auf drei Vertiefungen (Parallelen) verteilt. Die Platten wurden auf einem Mikrotiterplattenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen) bei einer Drehzahl von 1000 min⁻¹ bei 25 °C (Klimaraum) bzw. 30 °C (Kulturschrank) inkubiert. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 450 nm erfolgte in einem Mikrotiterplattenphotometer (Biolog Microsystem, Molecular Devices, USA).

2.4.2 Kultivierungen im Kulturröhrchen

Für Versuche, bei denen ein ausreichendes Volumen für die Produktbestimmung vorhanden sein mußte, wurden in der trockenen Hitze (180 °C, 2 h) sterilisierte Kulturröhrchen (20 mm Durchmesser) mit 6 ml Medium befüllt und das Medium mit 100 µl einer Glycerinkultur angeimpft. Bei 25 °C (Klimaraum) wurden die Kulturen auf einem Schüttler (GFL, Burgwedel) bei einer Drehzahl von 180 min⁻¹ in einem Winkel von ca. 45° zur Schüttlerplatte inkubiert.

2.4.3 Kultivierungen im Schüttelkolben

Für Versuche, bei denen ein ausreichendes Volumen für die Messung von optischer Dichte und Produktkonzentration im zeitlichen Verlauf (mehrere Proben) vorhanden sein mußte, und für die Vorkultur der Bioreaktorkultivierungen wurden in der trockenen Hitze (180 °C, 2 h) sterilisierte Kulturkolben mit vier Schikanen benutzt. 250 ml-Kolben wurden mit 50 ml Medium befüllt, dieses mit 1 ml einer

Glycerinkultur angeimpft und bei 25 °C (Klimaraum) auf einem Schüttler (Infors AG, Schweiz) bei einer Drehzahl von 180 min⁻¹ inkubiert. 1 l-Kolben wurden mit 200 ml Medium befüllt, dieses mit 20 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 25 °C (Klimaraum) auf einem Schüttler (Infors AG, Schweiz) bei einer Drehzahl von 120 min⁻¹ inkubiert.

2.4.4 Kultivierungen im Bioreaktor

2.4.4.1 Kultivierung im 1,5 l-Bioreaktor

Die 1,5 l-Fermentationen wurden in einem 1,5 l-Bioreaktor (FairMenTec GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die Besonderheit dieses Bioreaktors mit einem Kulturgefäß aus Glas (2,3 l-Totalvolumen) ist die metallfreie Bauweise, d.h. alle Bauteile im Inneren des Bioreaktors sind aus dem Kunststoff PEEK gefertigt, wodurch keine Korrosion durch extreme pH-Werte oder hohe Salzkonzentrationen auftreten kann. Die Temperierung erfolgt über einen Doppelmantel und der Volumenstrom der Belüftung wird an einer Gasversorgungsstation mit Schwebekörperdurchflußmesser eingestellt. Der Bioreaktor ist mit einer Sauerstoffelektrode, einer pH-Elektrode, in die ein Temperatursensor integriert ist, und einem Wärmeleitfähigkeitssensor zur Schaum- oder Flüssigkeitsstands-Kontrolle ausgestattet. Über einen Fermentationscontroller können drei Peristaltikpumpen für Säure (1 M H₂SO₄), Base (1 M NaOH) und Antischaummittel (1%, Fluka, Neu-Ulm), zwei Peristaltikpumpen für Zulauf und Ablauf, ein Umwälzthermostat und der Rührermotor angesteuert werden. Zur Datenaufzeichnung können die Meßdaten über eine Schnittstelle (RS232) an einen Computer übermittelt werden.

Zur online-Messung der optischen Dichte wird die Kulturflüssigkeit mit einer Peristaltikpumpe durch eine in einem Photometer befindliche Meßzelle und wieder in den Bioreaktor zurück gefördert. Die OD-Meßwerte werden mit einem Flachbettschreiber aufgezeichnet.

Der Bioreaktor wird leer für ca. 20 min bei 121 °C autoklaviert und über einen Sterilfilter (0,2 µm, Sartorius, Göttingen) mit dem Medium befüllt. Die Vorkultur (3x 50 ml in 250 ml-Schüttelkolben) wird aus einer Animpfflasche mittels einer Peristaltikpumpe in den Bioreaktor überführt.

Im Chemostatbetrieb wird Medium mit einer kalibrierten Peristaltikpumpe in den Bioreaktor gefördert. Durch ein Tauchrohr, dessen Öffnung sich auf der gewünschten Höhe befindet, wird die überschüssige Kulturflüssigkeit mittels einer weiteren Peristaltikpumpe mit einer höheren Pumpleistung in eine Auffangflasche abgeführt.

Für die Fermentation mit integrierter Produktabtrennung wurde die Kulturflüssigkeit mit einer Peristaltikpumpe durch eine Flasche mit pH-Meß- und Regeleinrichtung, durch eine mit Amberlite® XAD-16 gefüllte Adsorbersäule (30 cm x 2 cm) und wieder in den Bioreaktor zurück gefördert (Abb. 2.1).

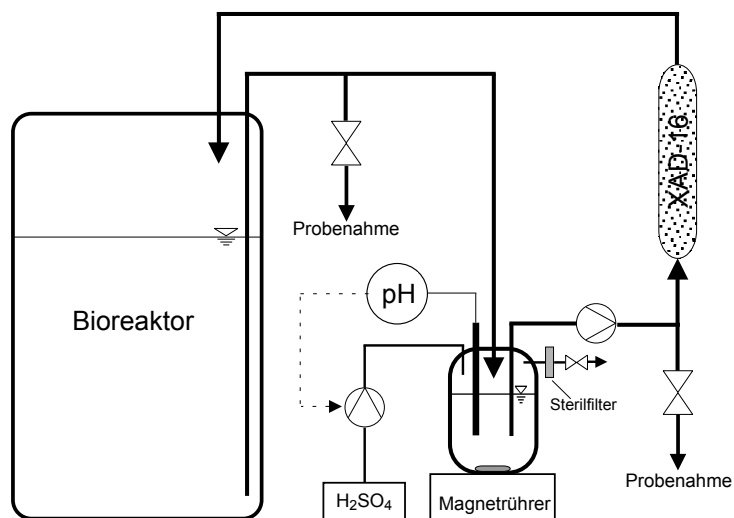


Abb. 2.1: Schema der integrierten Produktabtrennung.

2.4.4.2 Kultivierung im 10 l-Bioreaktor

Die 8 l-Fermentation wurde in einem 10 l-Bioreaktor (Biostat C, B. Braun Biotech, Melsungen) durchgeführt. Die Temperierung erfolgt über einen Doppelmantel und der Volumenstrom der Belüftung wird über einen Massendurchflußregler kontrolliert. Der Bioreaktor ist mit einer Sauerstoffelektrode, einer pH-Elektrode und einem Temperatursensor ausgestattet. Zur Datenaufzeichnung können die Meßdaten an einen Zentralcomputer übermittelt werden.

Der Bioreaktor wird inklusive Medium durch Dampf für ca. 30 min bei 121 °C sterilisiert. Die Vorkultur (4x 200 ml in 1 l-Schüttelkolben) wird aus einer Animpfflasche mittels einer Peristaltikpumpe in den Bioreaktor überführt.

2.4.4.3 Kultivierung im 100 l-Bioreaktor

Die 100 l-Fermentation wurde in einem 100 l-Bioreaktor (Biostat D, B. Braun Biotech, Melsungen) durchgeführt. Die Temperierung erfolgt über einen Doppelmantel und der Volumenstrom der Belüftung wird an einer Gasversorgungsstation mit Schwebekörperdurchflußmesser eingestellt. Der Bioreaktor ist mit einer Sauerstoffelektrode, einer pH-Elektrode, einem Temperatursensor und einem Leitfähigkeitssensor zur Schaum- oder Flüssigkeitsstands-Kontrolle ausgestattet. Die Meßdaten werden mit einem Flachbettschreiber aufgezeichnet.

Der Bioreaktor wird inklusive Medium durch Dampf für ca. 30 min bei 121 °C sterilisiert. Die Vorkultur wird aus einem 10 l-Bioreaktor mittels einer Peristaltikpumpe in den Bioreaktor überführt.

2.5 Aufarbeitung

2.5.1 Solventextraktion

Für das Abtrennen des Produktes aus der Kulturlösung wurde anfangs die Solventextraktion mit Ethylacetat („Ausschütteln“) benutzt.

Bei der Probenaufarbeitung wurde zuerst der pH-Wert auf pH 3 eingestellt, die Zellmasse durch Zentrifugation (5 min, RZB=6240 g) abgetrennt und 5 ml des Überstandes mit dem gleichen Volumen Ethylacetat versetzt. Nach kräftigem Durchmischen in einem Schütteltrichter wurde die Ethylacetat-Phase abgetrennt und die wäßrige Phase ein zweites Mal extrahiert. Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden dann mit einem Rotationsverdampfer bei ca. 37 °C getrocknet und mit 1 ml Methanol aufgenommen.

Auch ganze Bioreaktorfüllungen bis 10 l wurden anfangs auf diese Weise aufgearbeitet (bei entsprechend größeren Lösemittelvolumina).

2.5.2 Adsorptionschromatographie

Später wurde die Produktabtrennung auf Adsorptionssäulen umgestellt, da so rationelleres Arbeiten und eine Einsparung von Lösemittel möglich wurde. Bei großen Kulturvolumina (>10 l) war eine Produktaufarbeitung nur auf diese Weise sinnvoll durchführbar.

Bei der Probenaufarbeitung wurde zuerst der pH-Wert auf pH 3 eingestellt, die Zellmasse durch Zentrifugation (5 min, RZB=6240 g) abgetrennt und 5 ml des Überstandes über eine selbstgemachte 1 ml-Amberlite® XAD-16-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 10 ml dest. Wasser gewaschen und dann mit 3 ml Methanol eluiert. Nach Trocknen des Eluates im Rotationsverdampfer bei ca. 37 °C wurde der Extrakt erneut in 1 ml Methanol aufgenommen.

Für größere Kulturvolumina wurden für die Produktabtrennung verschieden große, mit Amberlite[®] XAD-16 gefüllte Säulen als „expanded-bed“ eingesetzt, das heißt, die Säulen wurden gegen die Schwerkraft mit der Kulturflüssigkeit befüllt, so daß sich das Harzbett ausdehnen und dadurch nicht verblocken konnte. Durch diese Verfahrensweise konnte auf ein Abzentrifugieren der Zellen verzichtet werden.

Als Vorbereitung wurde das Harzbett in der Säule zuerst mit Methanol gewaschen (von oben nach unten) und dann von unten mit dest. Wasser gespült, so daß sich ein Fließbett einstellen konnte. Nach Stabilisierung des Fließbettes wurde die Säule mit der Kulturflüssigkeit beladen. Nach Durchlauf der Kulturflüssigkeit wurde die Säule erneut mit dest. Wasser gespült. Nach ausreichender Spülung (ca. 2-3 Bettvolumina) wurde das Wasser bis zur Oberkante des Harzbettes abgelassen und von oben mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen, wenn es eine kräftige bräunliche Farbe bekam, und dann im Rotationsverdampfer bei ca. 37 °C getrocknet.

Es standen 2 Säulen zur Verfügung. Für Kulturvolumina bis 10 l wurde eine Säule (ca. 100 cm x 3 cm) mit 300 ml Adsorberharz benutzt, für Kulturvolumina bis 100 l eine Säule (ca. 100 cm x 9 cm) mit 3 l Adsorberharz.

2.6 Analytik

2.6.1 Quantifizierung der Zellkonzentration

2.6.1.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde mit einem Photometer bei 650 nm (Pharmacia LKB, Ultrospec II) gegen dest. Wasser als Referenz in Kunststoffküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen.

2.6.1.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Da die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentrationen zeit- und arbeitstechnisch aufwendiger ist, als die Bestimmung der optischen Dichte, wurden Kalibriergeraden erstellt und die optischen Dichten in Biotrockenmassekonzentrationen umgerechnet.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde aus einer gut gewachsenen Schüttelkultur eine Verdünnungsreihe im Bereich einer Optischen Dichte von 0,2 bis 0,8 erstellt und verschiedene Volumina dieser Verdünnungen (5 ml bei OD 0,8 bis 25 ml bei OD 0,2) mit einer Spritze durch Glasfaserfilter in einem 25 mm Polycarbonat-Filterhalter gedrückt. Als OD 0 wurden 25 ml dest. Wasser benutzt. Nach Waschen mit 50 ml dest. Wasser und Durchblasen mit Luft wurden die Filter bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt. Aus der Massendifferenz der Glasfaserfilter vor und nach dem Beladen mit der Biomasse ergibt sich die Biotrockenmassekonzentration.

Die Kalibriergerade wurde für mit Marine Broth gewachsenen Kulturen und für mit einem Pepton/Hefeextrakt-Medium (Medium „Vorkultur“) gewachsenen Kulturen ermittelt, da sich die Bildung des braunen Farbstoffes in Marine Broth auf die optische Dichte auswirkt. Die Kalibriergeraden mit den zugehörigen Regressionsfunktionen sind in Anhang 7.1 zu finden.

2.6.2 Bestimmung der Glucosekonzentration

Zur Bestimmung der D-Glucosekonzentration wurde ein Enzym-Testkit (Boehringer Mannheim) gemäß der Bedienungsanleitung benutzt. Allerdings wurden alle Volumina auf 1/3 reduziert, um mit 1,5 ml-Reaktionsgefäßen und Küvetten im Halbmikromaßstab arbeiten zu können. Außerdem konnte mit einem Kit die dreifache Probenzahl gemessen werden.

2.6.3 Bestimmung der L-Phenylalanin- und der Produktkonzentration mittels HPLC

Die L-Phenylalanin- und die Produktkonzentration wurden beide gemeinsam mittels HPLC gemessen. Die Proben wurden mittels 0,1 % H₃PO₄/Acetonitril isokratisch über eine RP-Säule aufgetrennt. Das Produkt wurde mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) bei 303 nm und L-Phenylalanin mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Excitationswellenlänge von 258 nm und einer Emissionswellenlänge von 286 nm erfaßt. Beide Detektoren waren hintereinander angeordnet, so daß in einem Analysendurchgang beide Konzentrationen gemessen werden konnten. In Tab. 2.3 sind alle Informationen zu der HPLC-Anlage und den eingestellten Bedingungen aufgeführt.

Tab. 2.3: HPLC-Analyse

Membran-Degasser	Thermo Separation Products		
Gradientenpumpe	Constametric 4100, LDC Analytical		
Autosampler	AS 100, Thermo Separation Products		
Säule	Knauer 250 x 3 mm, Nucleosil C18 5 µm mit integr. Vorsäule		
Dioden-Array-Detektor	La Chrom L-7450, Merck-Hitachi		
Fluoreszenz-Detektor	FL 2000, Thermo Separation Products		
Injektionsvolumen	20 µl		
Fließrate	0,5 ml min ⁻¹		
Pumpenprogramm	Zeit	0,1 % H ₃ PO ₄	100 % Acetonitril
	min	%	%
	0	60	40
	10	60	40
	12	0	100
	18	0	100
	20	60	40
	30	60	40
Retentionszeit der TDTA (DAD)	8,4 min (vgl. Abb. 2.2)		
UV-Spektrum der TDTA	Maxima bei 210, 240, 303 und 354 nm (vgl. Abb. 2.3)		
Retentionszeit des Phe (Fluoreszenzdetektor)	3,4 min (vgl. Abb. 2.4)		
Excitationswellenlänge	258 nm		
Emissionswellenlänge	286 nm		

In Abb. 2.2 wird ein DAD-Contourplot mit dem Signal der Tropodithiätsäure bei 8,4 min und in Abb. 2.3 das UV-Spektrum der Tropodithiätsäure gezeigt. Im Chromatogramm des Fluoreszenzdetektors ist das Signal des L-Phenylalanins bei 3,4 min zu sehen (Abb. 2.4).

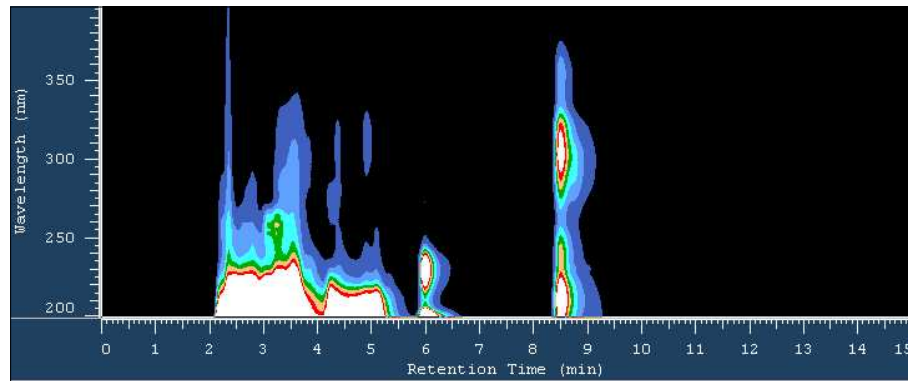


Abb. 2.2: DAD-Contourplot. - TDTA-Peak bei 8,4 min.

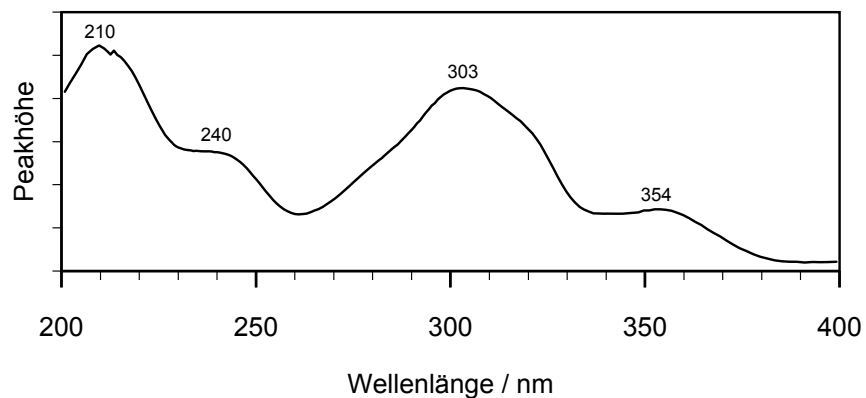


Abb. 2.3: Spektrum der Tropodithiätsäure.

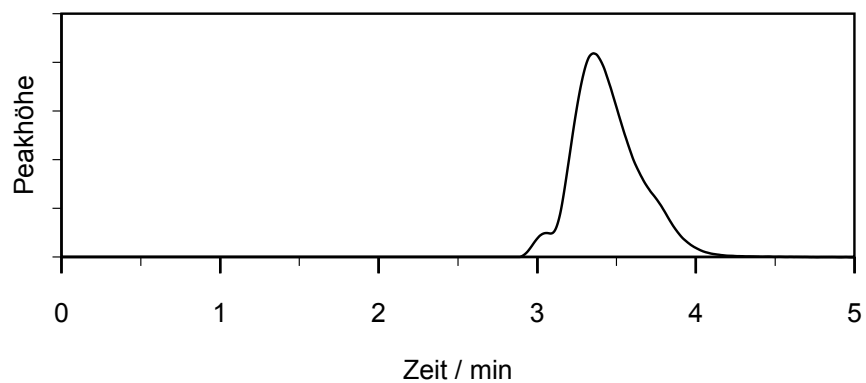


Abb. 2.4: Fluoreszenzdetektor-Chromatogramm. - Phe bei 3,4 min

Nach Aufnahme von Kalibrierkurven konnten die Konzentrationen aus den Peak-Höhen berechnet werden (Anhang 7.2).

2.6.4 Plattendiffusionstest

Da zu Beginn der Untersuchungen die HPLC-Analytik zur Produktkonzentrationsbestimmung noch nicht etabliert war, wurde die Produktkonzentration über die Hemmhofdurchmesser von Plattendiffusionstests abgeschätzt. Für die Herstellung der Platten wurde der Stamm *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM Nr.7, ehemals *B. subtilis*) für 6 d in HPG-Medium (5 g l⁻¹ Pepton, 3 g l⁻¹ Hefeextrakt, 1 g l⁻¹ Glucose) kultiviert (Schüttelkolben, 25 °C, 180 min⁻¹), 2 ml dieser Kultur zu 300 ml HPG-Agar (HPG + 15 g l⁻¹ Agar, autoklavieren und auf ca. 40 °C abkühlen lassen) gegeben und zu dünnen Agarplatten (5 ml pro Platte) ausgegossen. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

Zur Abschätzung der Produktkonzentration wurden vier 6 mm-Filterplättchen auf eine Agarplatte gelegt, auf drei dieser jeweils 10 µl Probe und als Standard 5 µl einer Penicillin G-Lösung (0,1 g l⁻¹) auf das vierte pipettiert. Inkubiert wurden die Platten über Nacht bei 30 °C. Der relative Hemmhofdurchmesser als Maß für die Produktkonzentration ist der Quotient aus dem mittleren Hemmhofdurchmesser der Proben (3 Parallelen) und dem Hemmhofdurchmesser des Standards.

2.6.5 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen

In dem Versuch zur Nutzung der Aminosäuren wurden die Aminosäurekonzentrationen im Medium vor und nach der Kultivierung mittels HPLC nach einer Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) bestimmt. Die Aminosäuren L-Cystein, L-Lysin und L-Prolin wurden nicht detektiert. Diese Analyse wurde von Dr. Hans-Peter Grossart (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Simon, ICBM, Universität Oldenburg) durchgeführt.

2.7 Berechnung einzelner Zielfunktionen

2.7.1 Spezifische Wachstumsrate μ

Für exponentielles Wachstum gilt:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Dabei ist X die Biomassekonzentration (in g l^{-1}), t die Zeit (in h) und μ die relative Wachstumsrate (in h^{-1}).

Durch Integrieren zwischen zwei Zeitpunkten t_i und t_{i+1} erhält man:

$$\ln \frac{X_{i+1}}{X_i} = \mu (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

Hier sind X_{i+1} und X_i die Biomassekonzentrationen zu den Zeitpunkten t_{i+1} und t_i . Trägt man die logarithmierte Biomassekonzentration gegen die Zeit auf, erhält man während der exponentiellen Wachstumsphase der Gleichung (2) entsprechend eine Gerade mit der Steigung μ_{\max} , die durch eine lineare Regressionsanalyse berechnet werden kann.

2.7.2 Produktbildungsrate p

Entsprechend Abs. 2.7.1 wird die Produktbildungsrate (in h^{-1}) nach Auftragen der logarithmierten Produktkonzentration gegen die Zeit aus der Steigung der zugehörigen Regressionsgeraden bestimmt.

2.7.3 Produktausbeute $Y_{P/S}$

Für den Produktausbeute $Y_{P/S}$ (in mol mol^{-1}) gilt:

$$Y_{P/S} = \frac{P_{i+1} - P_i}{S_i - S_{i+1}} \quad (3)$$

Dabei sind P_i und P_{i+1} die Produktkonzentrationen (in M) (zu den Zeitpunkten t_i und t_{i+1} (in h) und S_i und S_{i+1} die entsprechenden Substratkonzentrationen (in M).

2.7.4 Produktertrag $Y_{P/X}$

Für den Produktertrag $Y_{P/X}$ (in mol g⁻¹) gilt:

$$Y_{P/X} = \frac{P_{i+1} - P_i}{X_{i+1} - X_i} \quad (4)$$

Dabei sind P_i und P_{i+1} die Produktkonzentrationen (in M) zu den Zeitpunkten t_i und t_{i+1} (in h) und X_i und X_{i+1} die entsprechenden Biomassekonzentrationen (in g l⁻¹).

2.7.5 Spezifische Produktbildungsrate q_P

Die spezifische Produktbildungsrate q_P (in mol g⁻¹ h⁻¹) läßt sich durch folgende Gleichung annähern:

$$q_P = \frac{P_{i+1} - P_i}{\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i)} \quad (5)$$

Dabei sind P_i und P_{i+1} die Produktkonzentrationen (in M) zu den Zeitpunkten t_i und t_{i+1} (in h) und X_i und X_{i+1} die entsprechenden Biomassekonzentrationen (in g l⁻¹).

2.8 Genetischer Algorithmus

Die Optimierung der Zusammensetzung der vier Aminosäuren L-Histidin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin sollte mit Hilfe eines genetischen Algorithmus (GA) unter Verwendung des Programmes GALOP [Möllney et al.] durchgeführt werden. Der einzelne Ansatz (Kulturröhrchen) wird dabei als Individuum und die Gesamtheit der Ansätze einer Versuchsreihe als Population bzw.

Generation bezeichnet. Jedes Individuum wird unter Berücksichtigung der vorgegeben Grenzen und Schrittweiten durch das Programm in einem Bit-String kodiert („Genotyp“). In diesem Fall wurden die Konzentrationen in 21 Stufen variiert, wozu eine Bit-String-Länge von 5 bit ($2^5=32$ mögliche Stufen) notwendig ist. Da die Konzentrationen von vier Aminosäuren kodiert werden mußten, ergab sich eine Gesamtlänge des „Genoms“ eines Individuums von 20 Bit (4 x 5 Bit). Die Größe der Population einer Generation wurde auf 8 Individuen festgelegt. Die erste Generation wird durch das Programm per Zufallsgenerator erzeugt. Nach Eingabe der Versuchsergebnisse (Produkt-/Nebenproduktkonzentrationen) der ersten Generation in das Programm, werden die Güten dieser nach vorher festgelegten Funktionen berechnet und die Individuen der nächsten Generation durch Anwendung der genetischen Operatoren **Selektion**, **Crossover** und **Mutation** bestimmt.

Bei der **Selektion** wird festgelegt, welche Individuen der vorherigen Generation in die nächste übernommen werden, wobei die Wahrscheinlichkeit der Auswahl eines Individuums der Güte direkt proportional ist. Individuen mit einem guten Ergebnis (viel Produkt, wenig Nebenprodukt) haben also eine größere Chance, auch in der nächsten Generation wieder zu erscheinen, als Individuen mit einem schlechten Ergebnis. Nach der Selektion können Individuen mit einer hohen Güte mehrfach in die nächste Generation übernommen worden sein.

Im nächsten Schritt werden die Genotypen der selektierten Individuen durch **Crossover** rekombiniert. Dazu werden die Bit-Strings zweier Individuen zufällig ausgewählt, an einer ebenfalls zufällig ausgewählten Stelle geschnitten und vertauscht wieder zusammengesetzt. Dadurch werden neue Individuen erzeugt, die sich aus den Eigenschaften der bisherigen zusammensetzen.

Im letzten Schritt werden durch **Mutation** einzelne Bits von 0 auf 1 bzw. von 1 auf 0 gesetzt, wodurch eine weitere Variation der Genotypen erreicht wird.

Die „Genotypen“ der Individuen dieser neuen Generation werden in „Phänotypen“ (Medien mit unterschiedlichen Aminosäurekonzentrationen) übersetzt, und die nächste Versuchsreihe wird gestartet. Nach mehreren Generationen sollte sich dann ein optimales Individuum entwickelt haben.

Die im GA gewählten Einstellungen sind in Tab. 2.4 zusammengefasst. Die Ansätze wurden in Kulturröhrchen mit 6 ml Medium durchgeführt. Die entsprechend dem GA ausgegebenen Volumina der einzelnen Aminosäurestammlösungen (1 g l^{-1} in Medium Nr. 7) wurden zusammenpipettiert und mit Medium Nr. 7 auf 6 ml aufgefüllt.

Tab. 2.4: Einstellungen im Programm GALOP

Variationsparameter:	L-Histidin-Konz. L-Phenylalanin-Konz. L-Tryptophan-Konz. L-Tyrosin-Konz.
Grenzen:	0 - 167 mg l^{-1} (0 - 1000 μl einer 1 g l^{-1} Stammlösung)
Schrittweite:	8 mg l^{-1} (50 μl)
Anzahl bits:	5
Zielfunktionen:	1. Peakhöhe TDTA (Max-Funkt.) 2. Summe Peakhöhen Nebenprod. (Min-Funkt.)
„Scaling Window of Generation“:	0
„Percentage of 'best' in subp“:	1,1
„Jury Decision Kind“:	„Keep Best, Ball Bearing Rest“
Individuenzahl:	8
Crossover-Rate:	0,95
Mutationsrate:	0,01

2.9 Immobilisierung

Für die Immobilisierung der Zellen wurden LentiKats[®] (geniaLab[®], Braunschweig) auf der Basis einer Polyvinylalkohol (PVA)-Matrix benutzt.

Zur Herstellung der Immobilisate wurde zuerst das sterile und gebrauchsfertige LentiKat[®]Liquid (PVA-Lösung mit Additiven) im Wasserbad bei 95 °C geschmolzen und wieder auf ca. 35 °C abgekühlt. Die Vorkultur (Schüttelkultur in Medium „Vorkultur“, ca. 15 h kultiviert) wurde zweimal mit einer Mineralsalzlösung (MS) gewaschen, als Konzentrat in die PVA-Lösung gegeben (20 ml Konzentrat auf 80 ml PVA-Lösung) und gut durchmischt (Magnetrührer). Diese Suspension wurde dann mit einem LentiKat[®]Printer auf Petrischalen getropft. Die Petrischalen wurden vor und nach der Beladung mit den PVA-Tropfen gewägt und zur Gelierung der Tropfen unter der Sterilarbeitsbank mit offenem Deckel aufgestellt. Der Gelierungsvorgang war beendet, wenn ca. 72 % der ursprünglichen Tropfenmasse verdunstet waren, was durch erneutes Wägen festgestellt wurde (ca. 1-1,5 h). Zur Ablösung und Rückquellung wurde dann steriler LentiKat[®]Stabilizer auf die Immobilisate gegeben. Nach Überführen in eine LentiKat[®]Stabilizer enthaltende Flasche wurden die Immobilisate für ca. 3 h zur Stabilisierung gerührt (Magnetrührer).

Zum Schluß wurde die Stabilisierungslösung abdekantiert, die Immobilisate zweimal mit steriler Mineralsalzlösung gewaschen und im Medium „Hauptkultur“ suspendiert. Unter der Sterilarbeitsbank wurde diese Suspension dann in den Schüttelkolben bzw. Bioreaktor überführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Projektpartner als Grundlage dieser Arbeit

3.1.1 Isolierung und Eigenschaften des Stammes T5

Der Stamm T5 wurde von Dr. Thorsten Brinkhoff (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Simon, ICBM, Universität Oldenburg) aus einer aus dem ostfriesischen Wattenmeer stammenden Wasserprobe isoliert. Dafür wurden zuerst Verdünnungsreihen der Wasserprobe bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, die niedrigste und höchste bewachsene Verdünnungsstufe auf Agar ausplattiert und diese erneut bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Der Stamm T5 wurde aus der niedrigsten Verdünnungsstufe (10^{-1}) der bei 28 °C inkubierten Verdünnungsreihe isoliert.

Es handelt sich bei dem Stamm T5 um Gram-negative, sehr bewegliche, coccoide Stäbchen (ca. 1,3-2 μm x 0,6-0,9 μm), die im Laufe der Kultur Ketten und Aggregate bilden und ihre Gestalt zu eher länglichen Stäbchen verändern. Auf Abb. 3.1 ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellaggregates zu sehen.

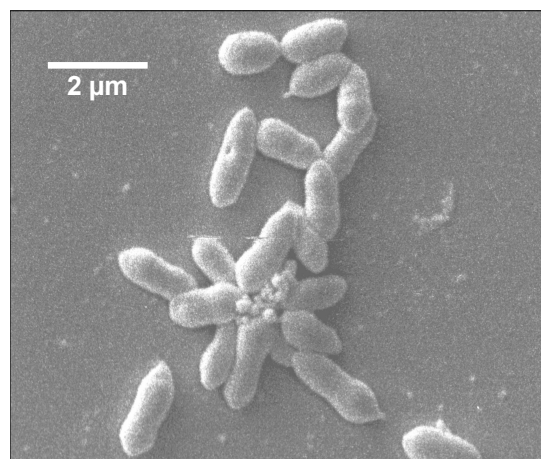


Abb. 3.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vom Stamm T5.
Quelle: T. Brinkhoff

3.1.2 Identifizierung des Stammes T5

Die Identifizierung des Stammes T5 wurde ebenfalls von Dr. Thorsten Brinkhoff vorgenommen. Dazu wurde die 16S rDNA sequenziert und mit den schon bekannten Sequenzen der Datenbank BLAST verglichen. Mit einer Übereinstimmung von 98 % wurde als nächster Verwandter *Roseobacter gallaeciensis* ausgegeben, es handelt sich also um einen Organismus der Alpha-Untergruppe der Proteobakterien. Mit dem Programm ARB wurde außerdem ein Stammbaum nach der Methode des „maximum-likelihood tree“ erstellt (Abb. 3.2).

Aufgrund der genetischen Einordnung wurde der Stamm T5 der Gattung *Ruegeria* zugewiesen. Eine Reklassifizierung der Art *Roseobacter gallaeciensis* zu *Ruegeria gallaeciensis* ist in Vorbereitung [Brinkhoff et al. in Vorb.].

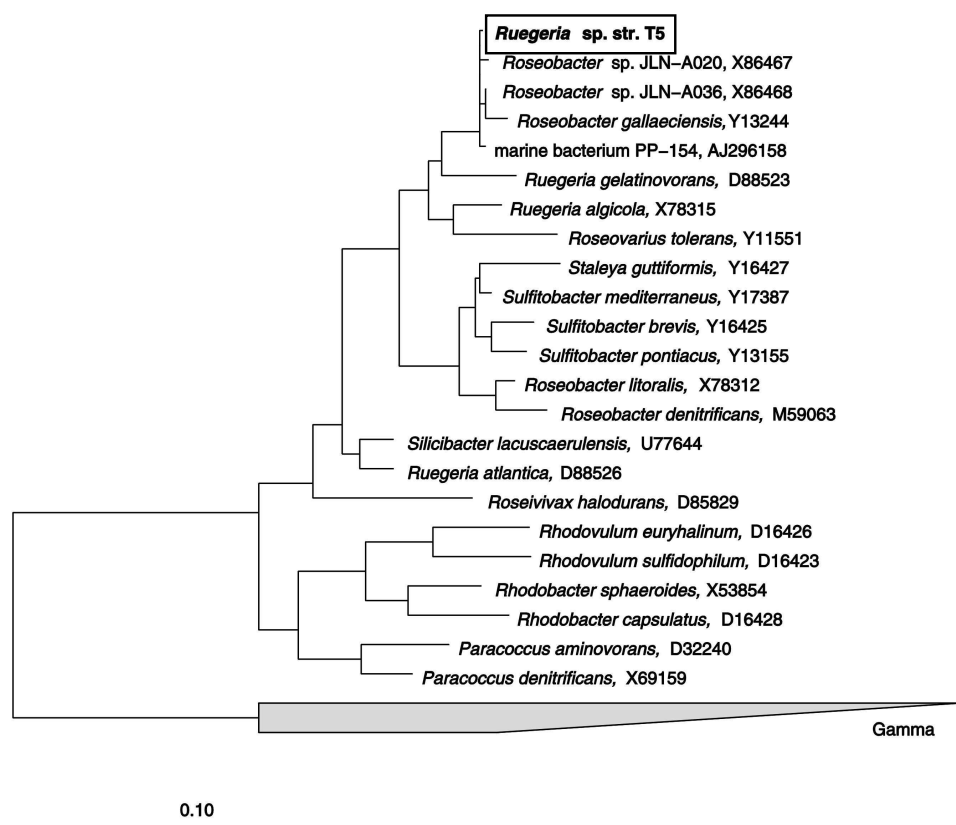


Abb. 3.2: Stammbaum der genetischen Verwandtschaft des Stammes T5.
Quelle: T. Brinkhoff

3.1.3 Screening

Das chemische und biologische Screening des Stammes T5 wurde von Dr. Gabriela Bach und Lanfang Liang (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zeeck, Institut für organische Chemie, Universität Göttingen) durchgeführt. Dabei wurde eine Hemmwirkung gegen *Bacillus subtilis* (Abb. 3.3), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus subspicatus*, *Caenorhabditis elegans*, *Artemia salina* und gegen die Tumorzelllinien HM02, MCF 7 und HEP G2 festgestellt [Liang et al. in Vorb.].

3.1.4 Aufklärung des Produktes

Durch DC-Overlaytests wurde die für die Hemmung verantwortliche Substanz lokalisiert und isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe von Massenspektrometrie, ein- und mehrdimensionaler ^1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie sowie einer Röntgenstrukturanalyse. Bei der Substanz handelt es sich um die **Tropodithiätsäure** (Abb. 3.4). Die Tropodithiätsäure ist eine neue Verbindung. Sie enthält als erster bekannter Naturstoff einen 1,2-Dithietring als Strukturelement [Liang et al. in Vorb.].



Abb. 3.3: Plattendiffusionstest gegen *B. subtilis*.

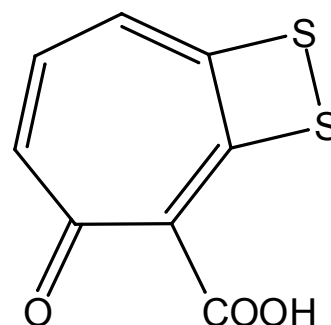


Abb. 3.4: Tropodithiätsäure.
M=212 g mol⁻¹

3.2 Optimierung physikalischer und chemischer Bedingungen bezüglich des Wachstums und der Produktbildung

3.2.1 Temperatur

Zur Bestimmung der optimalen Temperatur bezüglich maximaler Wachstumsrate und maximaler Produktbildungsrate wurde der Stamm T5 in Marine Broth (vgl. Tab. 2.2) bei einem geregelten pH von 7,0 und verschiedenen Temperaturen (25 °C, 30 °C, 35 °C) fermentiert. Die maximale Wachstumsrate entspricht der Steigung der optischen Dichte (OD_{650}) während der exponentiellen Wachstumsphase und die maximale Produktbildungsrate der maximalen Steigung der Produktkonzentration, die über die Hemmhofdurchmesser von Plattendiffusionstests bestimmt wurde.

Aus Abb. 3.5 ist ersichtlich, daß sich die optimalen Temperaturen der maximalen Wachstums- und der maximalen Produktbildungsraten einander entsprechen. Sie liegen beide bei ca. 30 °C.

3.2.2 pH-Wert

Entsprechend Absatz 3.2.1 wurden zur Bestimmung der optimalen pH-Werte verschiedene pH-Werte (6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5) bei einer konstanten Temperatur von 30 °C eingestellt.

Der Abb. 3.5 ist zu entnehmen, daß sich auch die optimalen pH-Werte der maximalen Wachstums- und der maximalen Produktbildungsraten einander entsprechen. Sie liegen bei pH 7,5.

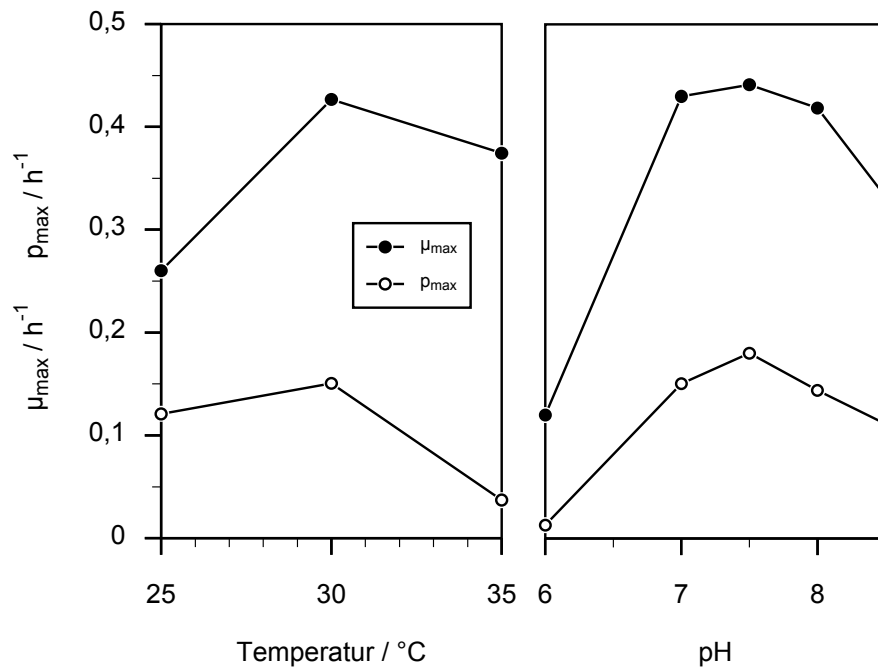


Abb. 3.5: Temperatur- und pH-Optima bei pH 7,0 bzw. 30 °C bezüglich Wachstumsrate (μ_{\max}) und Produktbildungsrate (ρ_{\max}).
Kultivierungsbedingungen: 1,5 l-Bioreaktorkultur mit MB, 0,5 v/vm, 300 min⁻¹

3.2.3 Salinität

Zur Bestimmung der optimalen Salinität bezüglich maximaler Wachstumsgeschwindigkeit und Produktkonzentration wurde der Stamm T5 in 50 ml-Schüttelkulturen (Doppelansätze) über die Dauer von 6 h mit einem Vollmedium (Tab. 2.2, Medium Nr. 1) bei verschiedenen Salinitäten (0-63 g l⁻¹, eingestellt durch Zusatz verschiedener Volumina der Mineralsalz (MS)-Stammlösung, vgl. Tab. 2.2) kultiviert. Der Wachstumsverlauf wurde durch Messen der optischen Dichte (OD₄₅₀) in einer Mikrotiterplatte, in die zu Beginn des Versuches Proben aus jedem Kolben überführt worden waren (3 Parallelen), verfolgt und die maximale Wachstumsrate über die Steigung während der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die Produktkonzentration wurde zum Ende der Kultivierung mittels HPLC gemessen.

In Abb. 3.6 sind die maximalen Wachstumsraten und die erzielten Produktkonzentrationen in Abhängigkeit von der Salinität dargestellt. Bei einer Salinität von nahezu Null ist nur geringes Wachstum und eine Produktkonzentration von nur wenigen μM zu messen. Bis zu einer Salinität von 25 g l^{-1} steigen μ_{max} und die Produktkonzentration schnell bis ca. $0,35 \text{ h}^{-1}$ bzw. $70 \mu\text{M}$ an. Die maximale Wachstumsrate fällt dann ab 40 g l^{-1} wieder leicht ab. Durch Interpolation wurde ein Maximum bei 32 g l^{-1} ermittelt. Demgegenüber nimmt die Produktkonzentration bei 40 g l^{-1} schnell auf fast $1/4$ des Maximalwertes bei 25 g l^{-1} ab und beträgt bei 63 g l^{-1} nur noch $1/10$.

Für weitere Versuche wurde eine Salinität von 32 g l^{-1} gewählt.

Untersuchungen, bei denen die Mineralsalze durch natürliches Meerwasser ersetzt wurden (hier nicht gezeigt), haben ein etwas geringeres Wachstum und eine geringere Produktbildung mit natürlichem Meerwasser ergeben.

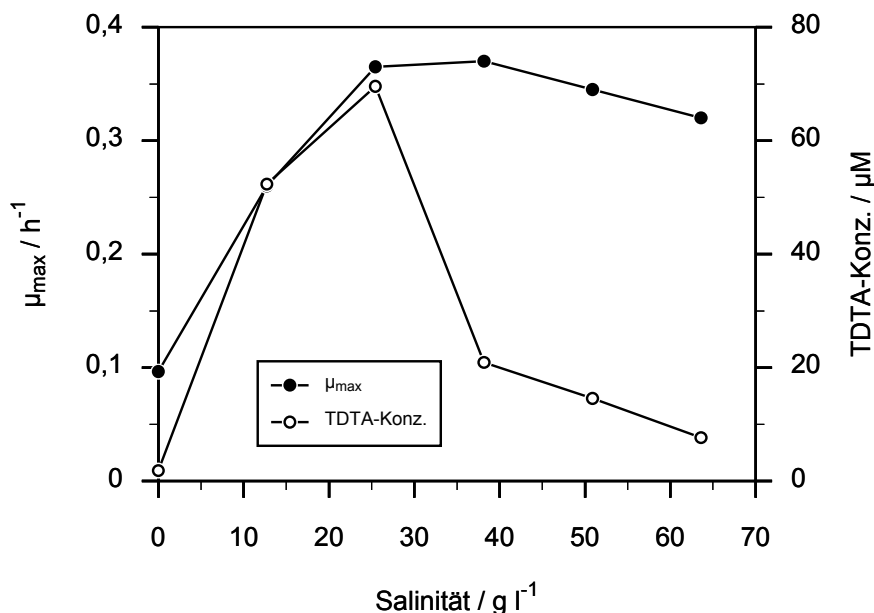


Abb. 3.6: Salinitätsoptima bezüglich Wachstumsrate (μ_{max}) und Produktkonzentration (TDTA-Konz.).

Kultivierungsbedingungen: Wachstum: $150 \mu\text{l}$ -Kultur in einer Mikrotiterplatte, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1} ; Produktbildung: 50 ml -Schüttelkultur, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 min^{-1} , 6 h; beide Ansätze mit Medium Nr. 1

3.3 Entwicklung eines Minimalmediums als Grundlage für ein definiertes Produktionsmedium

Für den Produktionsprozeß sollte ein definiertes Medium entwickelt werden, da bei der Kultivierung mit Vollmedien zwar schnelles Wachstum und auch Produktbildung in kurzer Zeit zu beobachten, die Aufarbeitung des Kulturüberstandes durch störende Nebenprodukte jedoch sehr schwierig war.

Als Grundlage sollte ein Minimalmedium dienen, das den minimalen Anforderungen für Wachstum gerecht wird. Dafür wurde zuerst die Abhängigkeit des Zellwachstums von Vitaminen, Aminosäuren und Kohlenstoffquellen untersucht.

3.3.1 Untersuchung des Wachstums auf essentielle Vitamine

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Zellwachstums von einzelnen Vitaminen wurde der Stamm T5 in einem Meerwasserminimalmedium mit Glucose als alleinige Kohlenstoff- und NH_4Cl als alleinige Stickstoffquelle unter Zusatz einzelner Vitamine (Tab. 2.2, Medium Nr. 3) in einer Mikrotiterplatte kultiviert ($25\text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1}).

In Abb. 3.7 ist die Änderung der optischen Dichte (OD_{450}) in Abhängigkeit von der Vitaminzugabe nach 23 h Kultivierung dargestellt. Mit Ausnahme von Vitamin B_2 ist das Wachstum bei allen anderen Vitaminen gegenüber der Kontrolle ohne Vitamine leicht erhöht.

Da jedoch auch ohne Vitamine deutliches Wachstum zu erkennen ist, kann man nicht von einer Vitaminabhängigkeit sprechen. In den folgenden Versuchen wird, wenn nicht anders angegeben, dem Medium trotzdem stets eine Vitaminlösung zugegeben, die alle Vitamine enthält.

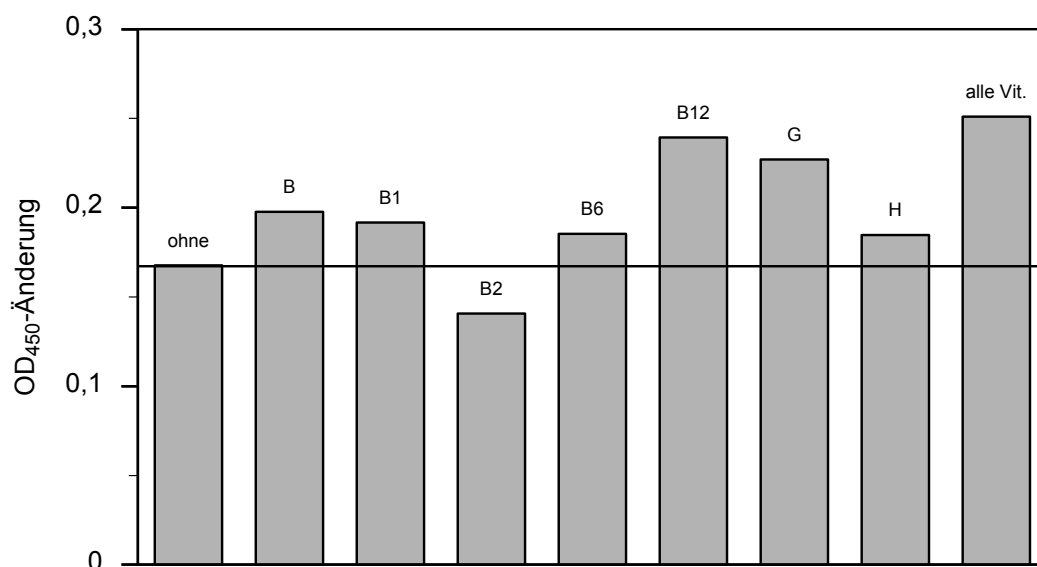


Abb. 3.7: Untersuchung des Wachstums auf essentielle Vitamine.

Die Linie entspricht der OD-Änderung der Kontrolle („ohne“).

Kultivierungsbedingungen: $150\text{ }\mu\text{l}$ -Kulturen in der Mikrotiterplatte, $25\text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1} , ca. 23 h

3.3.2 Untersuchung des Wachstums auf essentielle Aminosäuren

Zur Überprüfung der Abhängigkeit des Zellwachstums von einzelnen Aminosäuren wurde der Stamm T5 in einem Meerwasserminimalmedium mit Glucose als einzige Kohlenstoffquelle und NH_4Cl als einzige Stickstoffquelle (abgesehen von der zu untersuchenden Aminosäure) unter Zusatz einzelner Aminosäuren (Tab. 2.2, Medium Nr. 4) in einer Mikrotiterplatte kultiviert ($25\text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1}).

In Abb. 3.8 ist die Änderung der optischen Dichte (OD_{450}) in Abhängigkeit von der Aminosäurezugabe nach 23 h Kultivierung dargestellt. Mit den Aminosäuren L-Arginin, L-Glutamin, L-Leucin, L-Serin und L-Phenylalanin läßt sich ein deutlich erhöhtes Wachstum gegenüber der Kontrolle feststellen. Bei den übrigen Aminosäuren ist eher ein geringeres Wachstum zu beobachten und mit L-Lysin wurde sogar eine Abnahme der optischen Dichte gemessen (Zellyse).

Obwohl manche Aminosäuren das Zellwachstum fördern, scheint jedoch keine für das Wachstum essentiell zu sein.

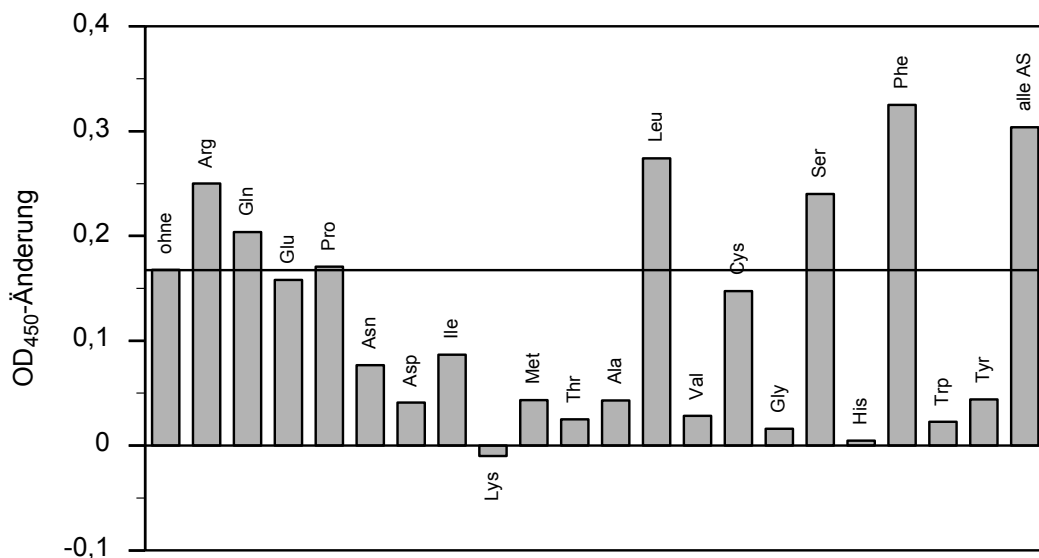


Abb. 3.8: Untersuchung des Wachstums auf essentielle Aminosäuren.

Die Linie entspricht der OD-Änderung der Kontrolle („ohne“).

Kultivierungsbedingungen: $150\text{ }\mu\text{l}$ -Kulturen in der Mikrotiterplatte, $25\text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1} , ca. 23 h

3.3.3 Verbrauch von Aminosäuren

Es wurde außerdem untersucht, wieviel jeder Aminosäure bei Wachstum in einem definierten, alle Aminosäuren enthaltenden Meerwassermedium umgesetzt wird, indem die Konzentrationen von 17 Aminosäuren (Cys, Lys und Pro wurden nicht detektiert) vor und nach der Kultivierung (Tab. 2.2, Medium Nr. 5, ca. 15 h bei 25 °C und 180 min⁻¹) bestimmt wurden. Der Abb. 3.9 ist der Verbrauch der gemessenen Aminosäuren zu entnehmen.

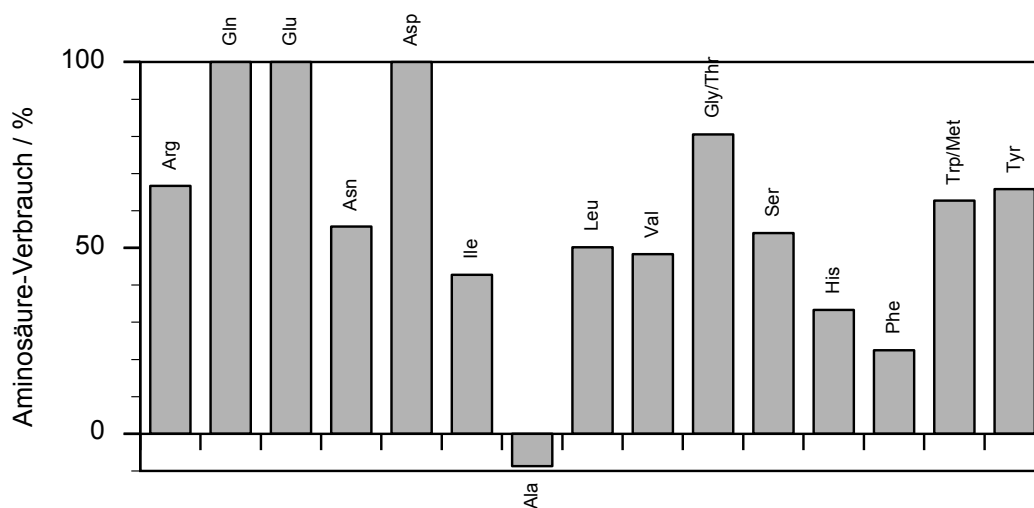


Abb. 3.9: Verbrauch von Aminosäuren.

Cys, Lys und Pro wurden nicht detektiert, Gly/Thr und Trp/Met konnten nicht getrennt werden.
Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkultur, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Von den untersuchten Aminosäuren wurden L-Glutamin, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure zu 100 % verbraucht, während bei L-Alanin eine Konzentrationszunahme beobachtet wurde. Bei allen anderen Aminosäuren wurde ein Verbrauch zwischen 20 und 80 % festgestellt.

3.3.4 Nutzung von verschiedenen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle

Zur Überprüfung der Verwendbarkeit von einzelnen Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle wurde der Stamm T5 in einem Meerwasserminimalmedium mit NH_4Cl als einzige Stickstoffquelle unter Zusatz einzelner Kohlenstoffquellen (Medium Nr. 6) in einer Mikrotiterplatte kultiviert ($25\text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1}).

Abb. 3.10 zeigt die Erhöhung (Zellwachstum) bzw. Erniedrigung (Zellyse) der optischen Dichte (OD_{450}) nach 24 h Kultivierung. Bei den Sacchariden werden D(+)-Xylose, D(+)-Glucose, D(+)-Mannose, D(+)-Galactose, D(-)-Fructose, Saccharose, Maltose, Cellobiose und Trehalose verwertet, nicht jedoch L(+)-Arabinose, D(-)-Ribose, L(+)-Rhamnose, L(-)-Fucose, Lactose, Stärke, Inulin und Xylan. Von den Salzen organischer Säuren werden Acetat, Pyruvat, Malat, Citrat, Succinat, Lactat und Propionat (jeweils als Natriumsalz) verwertet, nicht jedoch Formiat. Außerdem können D(-)-Mannit und Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet werden, während mit D(-)-Sorbit, D-Glucosamin und Tween 80 kein Wachstum festzustellen war. Die höchsten OD -Zunahmen wurde mit D(+)-Glucose, D(+)-Galactose, D(-)-Mannit, Saccharose, Maltose und Glycerin gemessen.

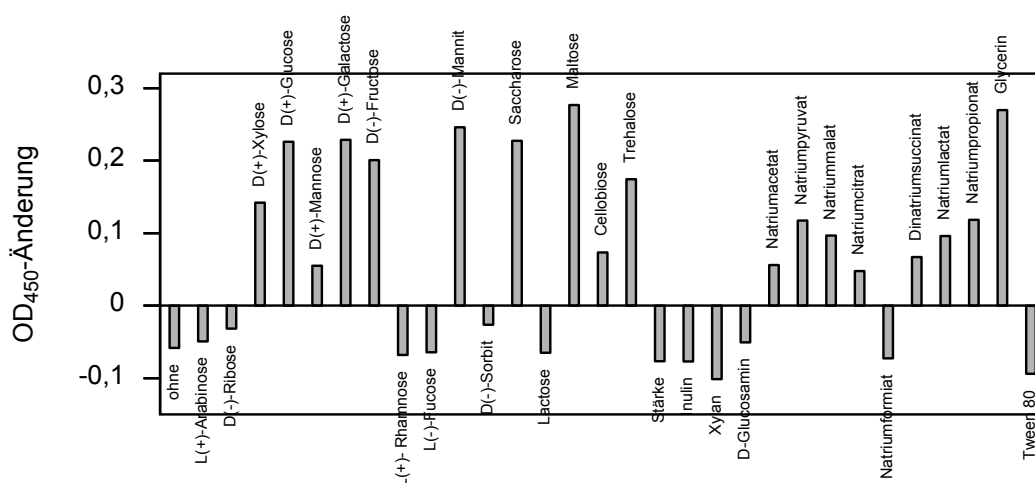


Abb. 3.10: Nutzung von Substraten als alleinige Kohlenstoffquelle.

Kultivierungsbedingungen: $150\text{ }\mu\text{l}$ -Kulturen in der Mikrotiterplatte, $25\text{ }^\circ\text{C}$, 1000 min^{-1} , ca. 24 h

3.4 Entwicklung eines definierten Produktionsmediums

Alle Versuche zur Entwicklung eines definierten Produktionsmediums wurden in Kulturröhrchen mit 6 ml Medium bei 25 °C, 180 min⁻¹ und ca. 15 h Kulturdauer durchgeführt.

3.4.1 Einfluß von Aminosäuren auf die Produktbildung

In dem Meerwasserminimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle, NH₄Cl als Stickstoffquelle, Phosphat und allen Vitaminen (Tab. 2.2, Medium Nr. 7) war zwar deutliches Wachstum zu beobachten, die Produktkonzentration war jedoch kaum meßbar (Abb. 3.11, „MM“).

Bei Zugabe von Hefeextrakt (Tab. 2.2, Medium Nr. 8) erhöhte sich die Produktkonzentration signifikant (Abb. 3.11, „MM+HE“), was die Vermutung zuläßt, daß eine oder mehrere Aminosäuren für die Produktbildung notwendig sind.

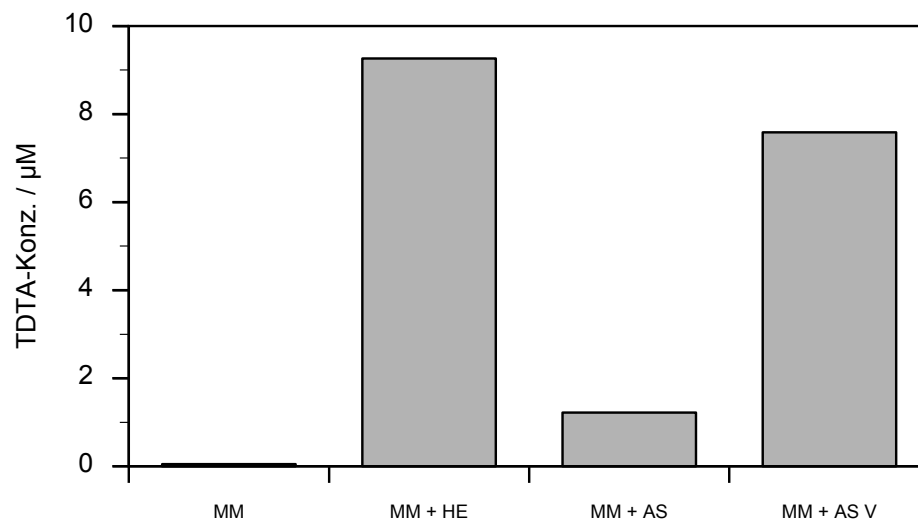
Als nächsten Schritt wurden dem Minimalmedium alle 20 proteinogenen Aminosäuren hinzugefügt (Tab. 2.2, Medium Nr. 9), und auch hier war eine meßbare Erhöhung der Produktkonzentration gegenüber dem Minimalmedium ohne Aminosäuren zu verzeichnen (Abb. 3.11, „MM+AS“), was die Vermutung bestätigt, daß bestimmte Aminosäuren die Produktbildung ermöglichen.

Für eine genauere Bestimmung der für die Produktbildung erforderlichen Aminosäuren wurden alle 20 Aminosäuren gemäß ihrer Biogenese in 5 Gruppen (Tab. 3.1) eingeteilt und dem Minimalmedium gruppenweise zugegeben (Tab. 2.2, Medium Nr. 10).

Tab. 3.1: Gruppeneinteilung der Aminosäuren

I	Arg, Gln, Glu, Pro
II	Asn, Asp, Ile, Lys, Met, Thr
III	Ala, Leu, Val
IV	Cys, Gly, Ser
V	His, Phe, Trp, Tyr

Während bei den Gruppen I, III und IV keine Produktbildung und bei der Gruppe II nur eine sehr geringe beobachtet wurde, war bei Gruppe V eine deutliche Produktkonzentration zu messen (Abb. 3.11, „MM+AS V“). Dieses deutet darauf hin, daß eine oder mehrere der Aminosäuren L-Histidin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin für die Bildung der Tropodithiätsäure erforderlich sind. Auffällig war außerdem, daß mit den Aminosäuren der Gruppe V neben der Tropodithiätsäure ein Nebenprodukt gebildet wurde, dessen Signal auf dem HPLC-Chromatogramm erheblich stärker als das der Tropodithiätsäure ist.

**Abb. 3.11:** Die Produktkonzentration in der Entwicklung des definierten Mediums.

MM: Minimalmedium, HE: Hefeextrakt, AS: 20 Aminosäuren,
AS V: Aminosäuren der Gruppe 5

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Zur Bestimmung der optimalen Aminosäurezusammensetzung aus den vier Aminosäuren der Gruppe V hinsichtlich maximaler Tropodithiolsäurekonzentration bei minimaler Nebenproduktkonzentration wurde der genetische Algorithmus (GA) eingesetzt. Es sollten die optimalen Konzentrationen der für die Produktbildung erforderlichen Aminosäuren ermittelt und nicht benötigte oder für die Bildung von Nebenprodukten verantwortliche Aminosäuren eliminiert werden.

Die Ansätze wurden in Kulturröhrchen durchgeführt (Tab. 2.2, Medium Nr. 11). Die erste Generation wurde durch einen Zufallsgenerator erzeugt, die nächsten durch die genetischen Operatoren Selektion, Cross-Over und Mutation unter Berücksichtigung der in der vorherigen Generation erzielten Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen. In Abb. 3.12 sind die vom GA ausgegebenen Volumina der eingesetzten Aminosäuren und die im jeweiligen Ansatz erzielten Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen dargestellt.

In der vierten Generation wurden bereits 3 identische Individuen erzeugt (1, 5, 6), was auf ein erreichtes Optimum hindeutet. In diesen Individuen wird eine hohe L-Phenylalanin-Konzentration eingesetzt, während die L-Histidin-Konzentration der Hälfte und die Konzentrationen von L-Tryptophan und L-Tyrosin einem Viertel der maximalen Konzentration entsprechen. Da bisher aber keine dieser Konzentrationen auf Null gesetzt wurde, ist noch unklar, ob die hier eingesetzten Aminosäuren wirklich notwendig sind, oder ob sie keinen Einfluß auf die Zielgrößen haben. Sicher scheint auf jeden Fall zu sein, daß L-Phenylalanin für die Produktbildung erforderlich ist. Ohne L-Phenylalanin (1. Gen.: 1, 6; 2. Gen.: 2, 4, 6; 3. Gen.: 7) ist keine oder nur geringe Produktbildung zu erkennen, während höhere Produktkonzentrationen meist nur bei höheren L-Phenylalanin-Konzentrationen erzielt wurden (1. Gen.: 4; 2. Gen.: 5; 3. Gen.: 1, 5).

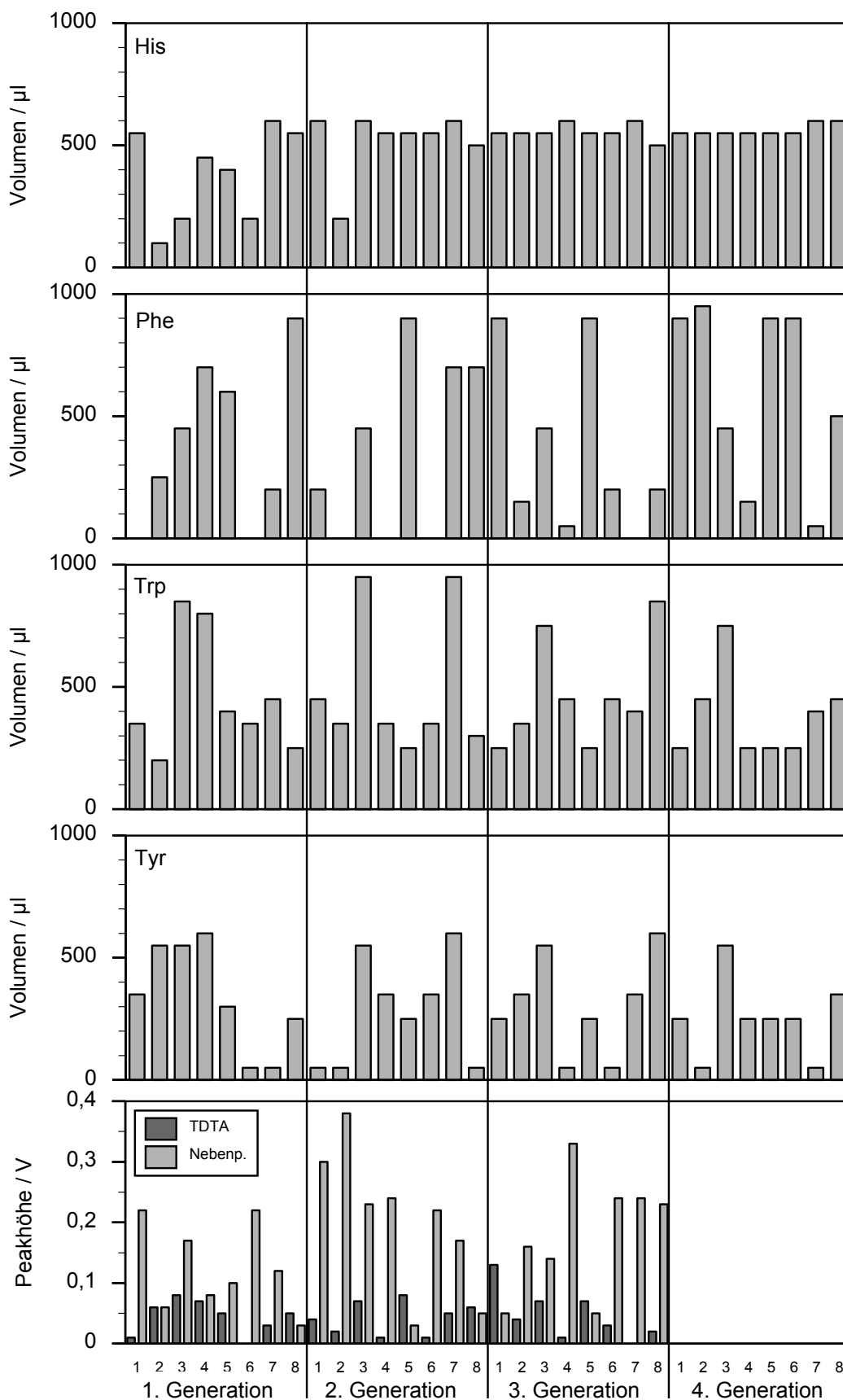


Abb. 3.12: Im genetischen Algorithmus eingesetzte Aminosäurevolumina und erhaltene TDTA- u. Nebenproduktkonzentrationen.

Aufgrund der im vorherigen Versuch gemachten Beobachtungen wurde L-Phenylalanin mit den drei anderen Aminosäuren in verschiedener Weise kombiniert (Tab. 2.2, Medium Nr. 11, Phe mit 170 mg l^{-1} , His/Trp/Tyr je 8 mg l^{-1}). Das Ergebnis ist in Abb. 3.13 dargestellt.

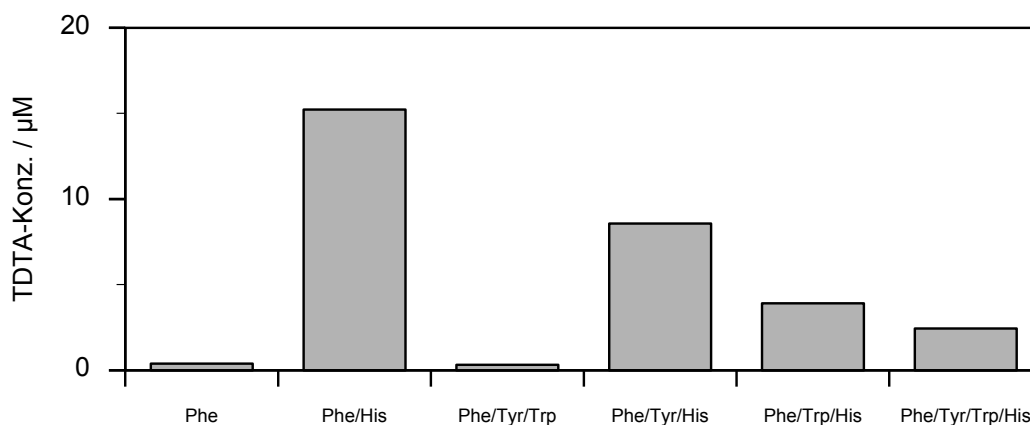


Abb. 3.13: Produktkonzentration bei verschiedenen AS-Kombinationen.
 Phe mit 170 mg l^{-1} , His/Trp/Tyr je 8 mg l^{-1}
 Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 min^{-1} , ca. 15 h

Man kann deutlich erkennen, daß für die Produktbildung neben L-Phenylalanin auch L-Histidin notwendig ist. L-Tryptophan und L-Tyrosin haben hingegen einen negativen Effekt auf die Produktbildung. L-Tryptophan ist für die Bildung eines Nebenproduktes verantwortlich. In Abb. 3.14 sind die DAD-Contour-Plots zweier Kulturen dargestellt, deren Medien sich nur in den Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tryptophan unterscheiden.

Der Peak der Tropodithiätsäure befindet sich im oberen Plot bei ca. 38 min. Die beiden kräftigen Peaks bei 13 und 23 min im unteren Plot wurden als Anthranilsäure und Anthranilsäure-Ethylester identifiziert.

Als nächstes wurde der Einfluß der L-Phenylalanin-Konzentration auf die Produktbildung genauer untersucht (Tab. 2.2, Medium Nr. 12). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 dargestellt.

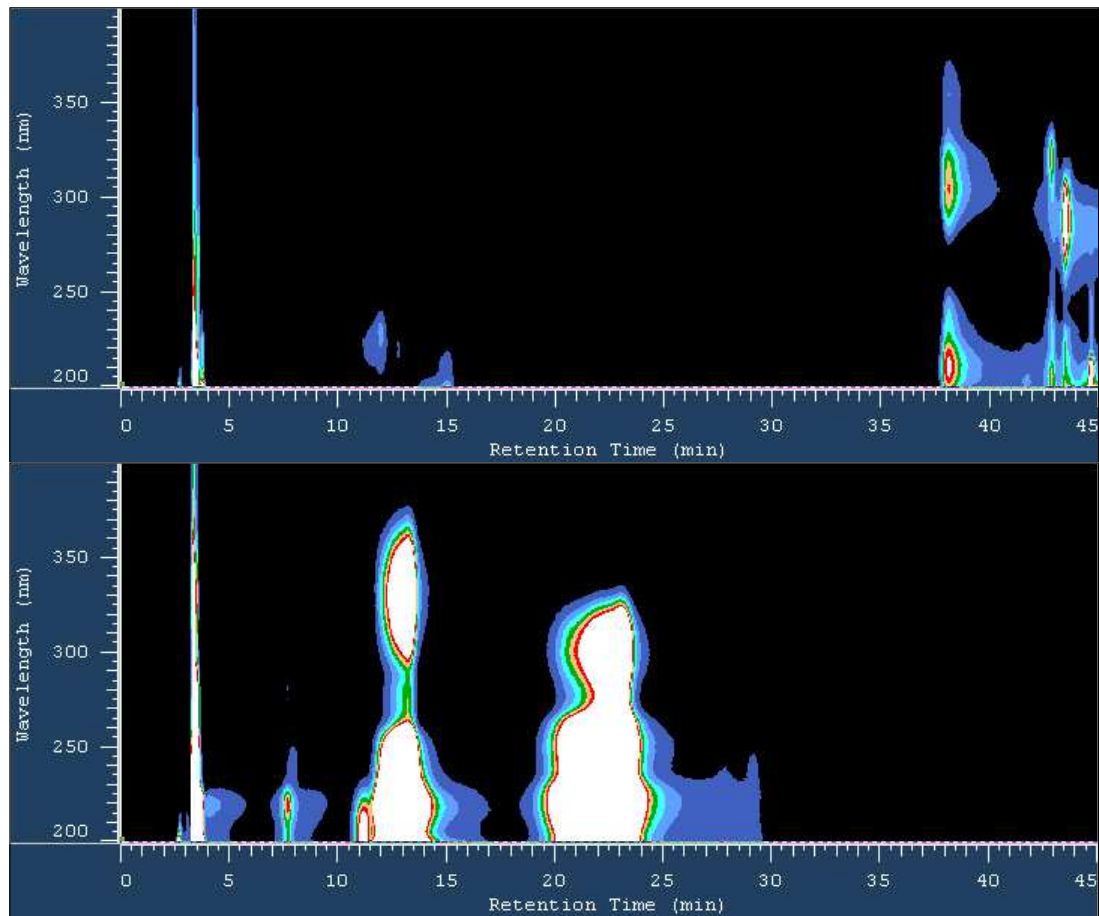


Abb. 3.14: Vergleich zweier definierter Medien, die sich nur in den Aminosäuren L-Phenylalanin (oben) bzw. L-Tryptophan (unten) unterscheiden. Der TDTA-Peak ist im oberen Plot bei 38 min zu erkennen, bei den beiden kräftigen Peaks im unteren Plot handelt es sich um Anthranilsäure und Anthranilsäure-Ethylester.

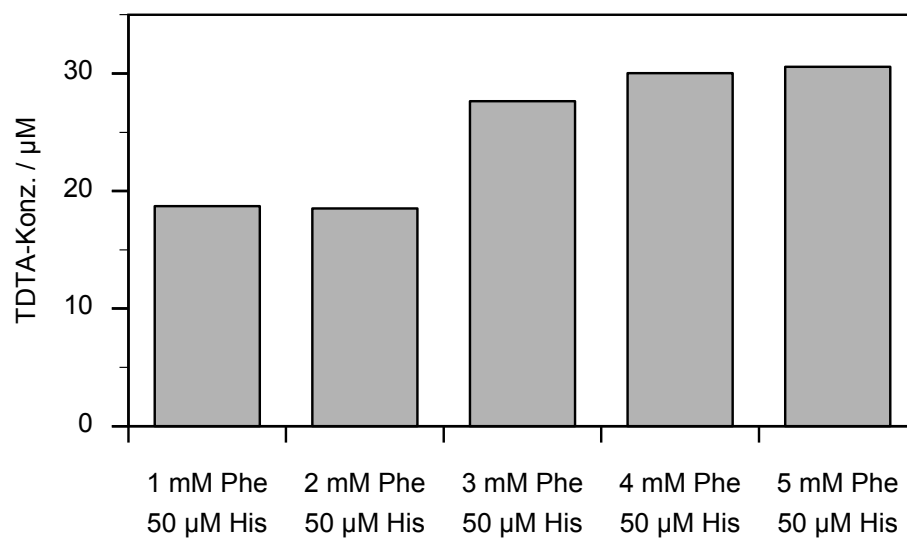


Abb. 3.15: Produktbildung in Abhängigkeit von der Phe-Konzentration.
Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Die Erhöhung der L-Phenylalanin-Konzentration bewirkte auch eine Erhöhung der Produktkonzentration, die jedoch nicht im gleichen Maße anstieg. Die Produktkonzentration scheint in Abhängigkeit von der L-Phenylalanin-Konzentration gegen einen Grenzwert zu streben. Dies läßt entweder auf eine Limitierung durch fehlende Mediumbestandteile (Kohlenstoff-/Stickstoffquelle, Phosphat, Spurenelemente, Vitamine, Komponenten des künstlichen Meerwassers) oder auf eine Sättigung des Enzymsystems schließen. Für letzteren Punkt würde die bei der Kultivierung im definierten Medium nur geringe Zellkonzentration ($OD_{660} < 0,3$) sprechen.

Eine Erhöhung der L-Histidin-Konzentration bewirkte keine Erhöhung der Produktkonzentration und auch das Verhältnis L-Phenylalanin/L-Histidin hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Produktkonzentration (Versuche hier nicht gezeigt).

3.4.2 Einfluß von Kohlenstoffquellen auf die Produktbildung

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Produktbildung wurde die Glucose im definierten Medium mit L-Phenylalanin und L-Histidin durch jeweils 25 mM Mannit, Saccharose, Maltose oder Glycerin ersetzt (Tab. 2.2, Medium Nr. 13). Diese Kohlenstoffquellen hatten bei der Untersuchung der Verwertung von Kohlenstoffquellen (siehe 3.3.4) das beste Wachstum erzielt.

In Abb. 3.16 ist das Ergebnis dargestellt.



Abb. 3.16: Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Produktbildung.

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Das Ergebnis zeigt keine gravierenden Unterschiede zwischen den eingesetzten Kohlenstoffquellen.

Bei Bestimmungen der Glucose-Konzentration im definierten Medium ist aufgefallen, daß nur ca. 0,6 mM Glucose während einer Kultivierungsdauer von ca. 20 h verbraucht wurden (Ausgangskonzentration: 25 mM). Da der geringe Umsatz der Glucose aufgrund einer Limitierung der Zellen durch andere Mediumsbestandteile hervorgerufen worden sein könnte, wurden dem Vollmedium Marine Broth, das alle für Wachstum erforderlichen Substanzen enthält und eine solche Limitierung ausschließen sollte, 50 mM Glucose zugesetzt (Tab. 2.2, Medium Nr. 14) und erneut der Glucoseverbrauch und außerdem Wachstum und Produktbildung gemessen (Abb. 3.17).

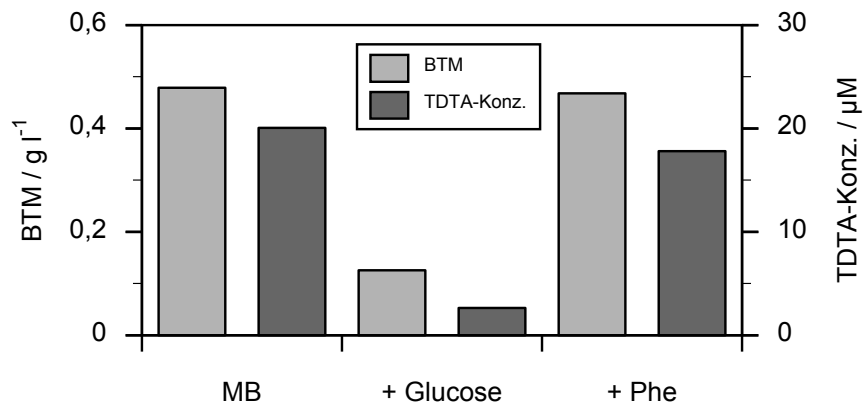


Abb. 3.17: Einfluß von Glucose und Phe in MB auf Wachstum und Produktbildung.

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

In dieser Kultur wurden ca. 7 mM Glucose abgebaut. Man kann eine starke Wachstums- und Produktbildungsinhibierung durch Glucose erkennen. Weitere Versuche haben gezeigt, daß schon durch 5 mM Glucose das Zellwachstum auf fast die Hälfte und die Produktkonzentration auf ein Viertel reduziert wird.

Die Zugabe von 1 mM L-Phenylalanin zu Marine Broth (Tab. 2.2, Medium Nr. 15) bringt ebenfalls keine Steigerung der Produktkonzentration mit sich, sie ist eher etwas geringer (Abb. 3.17).

Um zu überprüfen, ob eine Wachstums- und Produktbildungsinhibierung auch durch die anderen bisher eingesetzten Kohlenstoffquellen hervorgerufen wird, wurden dem Vollmedium Marine Broth jeweils 10 mM Mannit, Saccharose, Maltose und Glycerin zugesetzt (Tab. 2.2, Medium Nr. 16).

Das Ergebnis ist in Abb. 3.18 zu sehen.

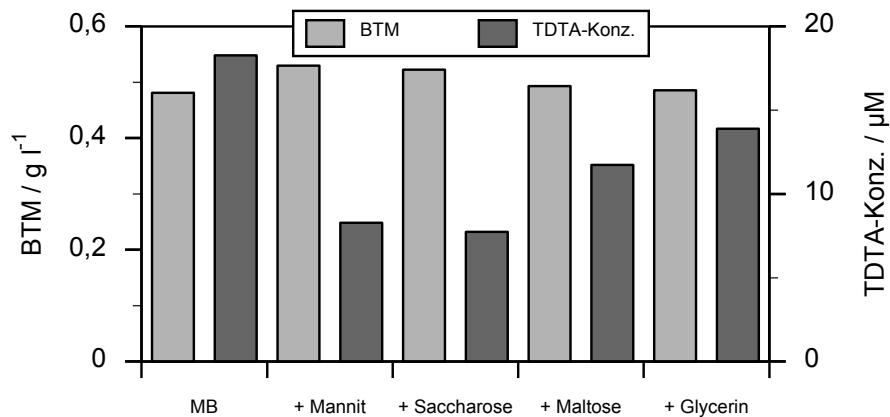


Abb. 3.18: Einfluß von versch. C-Quellen in MB auf Wachstum und Produktbildung.

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Die eingesetzten Kohlenstoffquellen bewirkten alle eine, wenn auch geringe, Biotrockenmasseerhöhung. Eine derart starke Wachstumsinhibierung, die mit Glucose festgestellt wurde, trat jedoch nicht ein. Die Produktkonzentration ist in allen Ansätzen gegenüber dem Vollmedium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle niedriger, wobei Glycerin die Produktbildung am geringsten inhibiert.

3.4.3 Einfluß von Stickstoffquellen auf die Produktbildung

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Stickstoffquellen auf die Produktbildung wurden einem definierten Medium mit Glucose (bei diesen Versuchen war der negative Einfluß der Glucose noch nicht bekannt), L-Phenylalanin und L-Histidin jeweils Ammoniumchlorid (30 mM), Harnstoff (25 mM) oder Natriumnitrat (18 mM) zugesetzt (Tab. 2.2, Medium Nr. 17).

Das Ergebnis ist in Abb. 3.19 zu sehen.

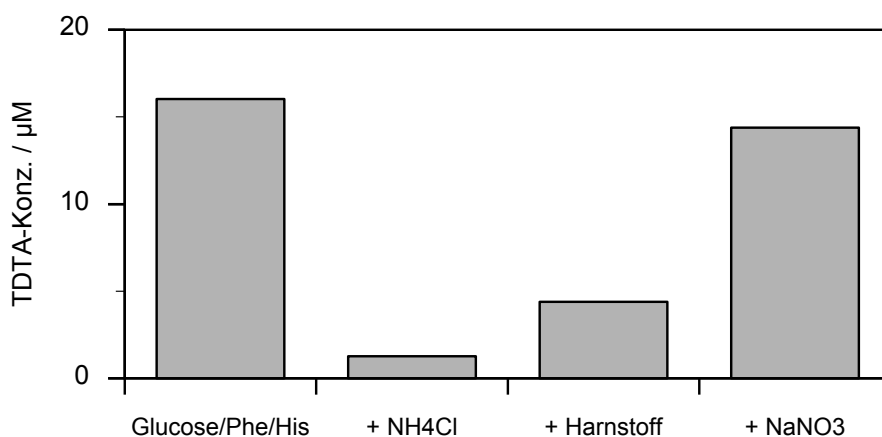


Abb. 3.19: Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Produktbildung.

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Die eingesetzten Stickstoffquellen Ammoniumchlorid und Harnstoff zeigten eine signifikante und Natriumnitrat eine geringe Inhibierung der Produktbildung.

Außerdem wurde Hefeextrakt (HE) als Stickstoffquelle (natürlich gleichzeitig auch Kohlenstoffquelle) getestet. Dem definierten Medium aus Glucose, L-Phenylalanin und L-Histidin wurden 1 g/l Hefeextrakt zugesetzt (Tab. 2.2, Medium Nr. 18, Abb. 3.20).

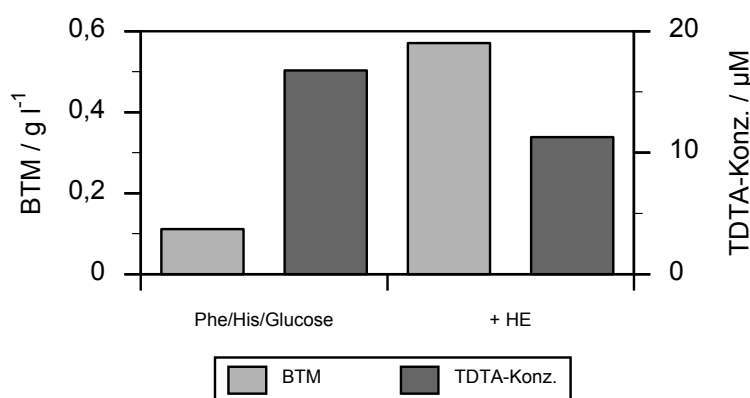


Abb. 3.20: Einfluß von HE auf Wachstum und Produktbildung.

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Durch die Zugabe von Hefeextrakt wurde das Wachstum erwartungsgemäß stark erhöht, nicht jedoch die Produktbildung, die sogar inhibiert wurde.

3.4.4 Einfluß von Phosphat, Spurenelementen und Vitaminen auf die Produktbildung

Zur Untersuchung des Einflusses von Phosphat, Spurenelementen (SE) und Vitaminen auf die Produktbildung wurden einem definierten Medium mit L-Phenylalanin und L-Histidin jeweils Phosphat (0, 10, 20 mM), Spurenelemente und/oder Vitamine in unterschiedlichen Kombinationen zugefügt (Tab. 2.2, Medium Nr. 19, Abb. 3.21).

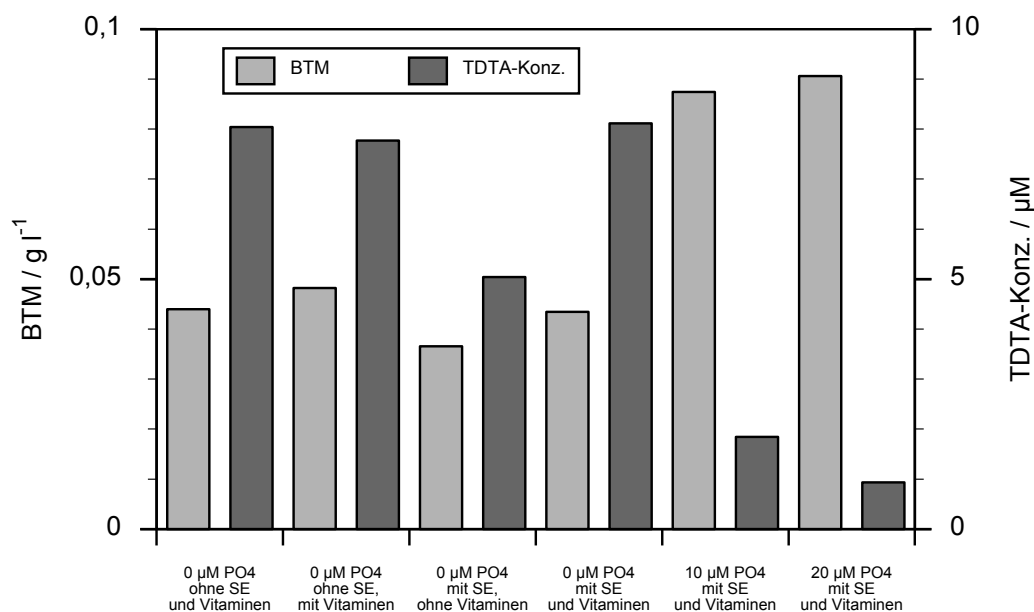


Abb. 3.21: Einfluß von PO₄, SE und Vitaminen auf Wachstum und Produktbildung.
Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Die Vitamine alleine haben keinen deutlichen Einfluß; das Wachstum wird minimal erhöht und die Produktbildung minimal erniedrigt. Die Spurenelemente-Lösung hat eine inhibierende Wirkung auf Wachstum und Produktbildung, die bei gleichzeitiger Anwesenheit der Vitamine wieder aufgehoben wird. Bei Vergleich der

phosphatfreien Ansätze mit und ohne Spurenelementen/Vitaminen kann man keinen entscheidenden Unterschied feststellen. Dem Hefeextrakt entsprechend fördert auch Phosphat das Wachstum, während es gleichzeitig die Produktbildung inhibiert. Bei einer Phosphat-Konzentration von 20 mM ist die Biotrockenmasse, verglichen mit dem Ansatz ohne Phosphat, mehr als doppelt so hoch, die Produktkonzentration wurde allerdings auf etwa 1/10 reduziert.

3.4.5 Einfluß der Mineralsalze auf die Produktbildung

Schließlich wurde der Einfluß der Mineralsalze KCl, MgCl₂, CaCl₂ und Na₂SO₄ auf Wachstum und Produktbildung untersucht. Dazu fehlte jeweils eines der Salze im definierten Meerwassermedium mit L-Phenylalanin und L-Histidin (Tab. 2.2, Medium Nr. 20, Abb. 3.22).

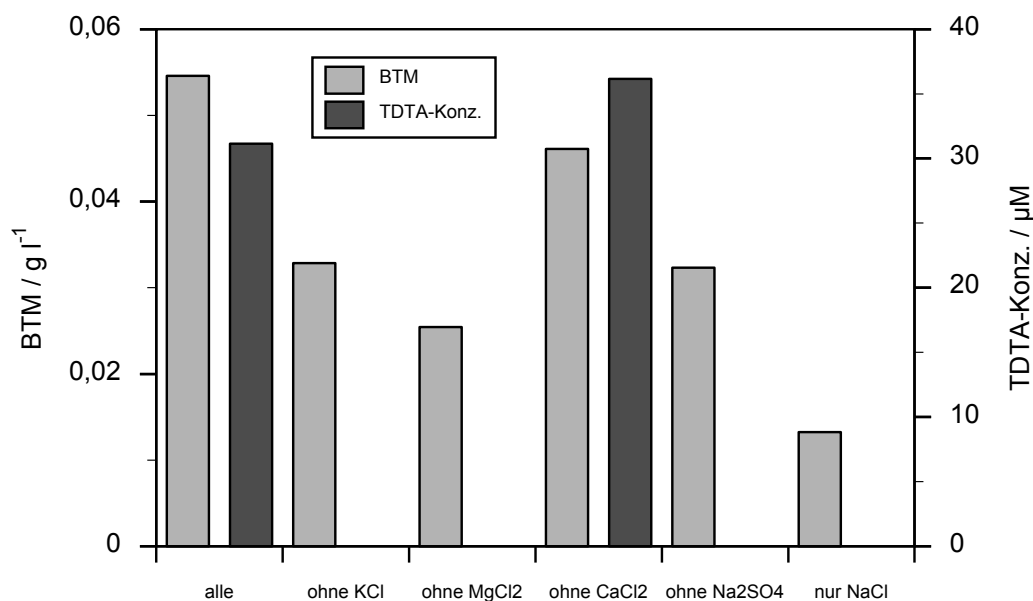


Abb. 3.22: Einfluß der Mineralsalze auf Wachstum und Produktbildung.

Kultivierungsbedingungen: 6 ml-Schüttelkulturen, 25 °C, 180 min⁻¹, ca. 15 h

Das Fehlen von KCl, MgCl₂ und Na₂SO₄ bewirkte eine völlige Unterdrückung der Produktbildung, während das Fehlen von CaCl₂ die Produktbildung leicht erhöhte. Ohne KCl und Na₂SO₄ blieb das Medium farblos, während ohne MgCl₂ eine gelbliche Färbung zu beobachten war, was darauf hinweist, daß ein anderes Produkt gebildet worden sein könnte.

3.4.6 Einfluß des Produktes (Produktinhibierung)

Bei Versuchen zur Hemmwirkung der Tropodithiätsäure gegen bestimmte Mikroorganismen wurden auch Plattendiffusionstests mit dem Stamm T5 als Zielorganismus durchgeführt (Brinkhoff et al. in Vorb.). Dabei wurde festgestellt, daß der Stamm T5 durch sein eigenes Produkt im Wachstum inhibiert wird (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Hemmung von T5 durch Tropodithiätsäure

TDTA-Konz	mM	0,1	1	2,5	5
Hemmhof	mm	0	1,5	2,5	2

Es liegt also eine Produktinhibierung vor, die eine Produktion des Antibiotikums in höherer Konzentration ohne den Einsatz von besonderen prozeßtechnischen Maßnahmen (Senkung der Produktkonzentration im Bioreaktor) verhindert.

3.4.7 Zusammensetzung des definierten Produktionsmediums als Ergebnis der Medienoptimierung

Als definiertes Produktionsmedium wurde aufgrund der aufgeführten Versuchsergebnisse ein Medium gewählt, daß neben den Mineralsalzen NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, Na₂SO₄ und NaHCO₃ mit einer Salinität von 32 g l⁻¹ nur die beiden Aminosäuren L-Phenylalanin (5 mM) und L-Histidin (0,05 mM) enthält.

3.5 Scale-up der Kultivierung im Bioreaktor

3.5.1 Kultivierung im 1,5 l-Bioreaktor

3.5.1.1 Fermentation mit Marine Broth

Als Referenz wurde zunächst eine 1,5 l-Fermentation mit dem Medium Marine Broth (Standardmedium bei der Kultivierung mariner Bakterien) bei 30 °C und pH 7,5 durchgeführt (Abb. 3.23).

Als Vorkultur wurden drei 250 ml-Schüttelkolben mit je 50 ml MB, die jeweils mit 1 ml Glycerin-Stammkultur angeimpft worden waren, über Nacht bei 25 °C und 180 min⁻¹ inkubiert. Nach dem Animpfen des Mediums im Bioreaktor ging die Kultur nach einer kurzen lag-Phase (1. h) in die exponentielle Phase (2./3. h, vgl. log-Darstellung in Abb. 4.1) über. Die maximale Wachstumsrate betrug 0,4 h⁻¹. Nach einer Übergangsphase (4.-6. h) trat die Kultur ab der 7. h in die stationäre Phase ein. Die maximale Biotrockenmassekonzentration betrug ca. 0,45 g l⁻¹. Der pO₂ durchlief in der 5. h ein Minimum von ca. 40 % und stieg dann nach der 6. h wieder an, bis auf einen Wert von ca. 80 %. Der pH-Wert sank zunächst ab (nach 3 h wurde dieser per Hand auf pH 7,5 hochgesetzt) und stieg dann ab der 4. h wieder an. Kurz vor Ende der 6. h wurde die pH-Regelung eingeschaltet, und man kann zum Ende der Kultivierung eine ständige Dosage von Säure beobachten.

Die Produktkonzentration stieg ab der 4. h stark an, erreichte schon in der 5. h das Maximum von ca. 70 µM und fiel danach wieder ab bis auf 35 µM. Die Phenylalaninkonzentration (in Pepton und Hefextrakt enthalten, vgl. Tab. 2.2) nahm bis zur 6. h von 0,7 auf 0,2 mM ab und blieb dann bis zum Ende der Kultivierung konstant, was mit der auch zu diesem Zeitpunkt beendeten Produktbildung korreliert.

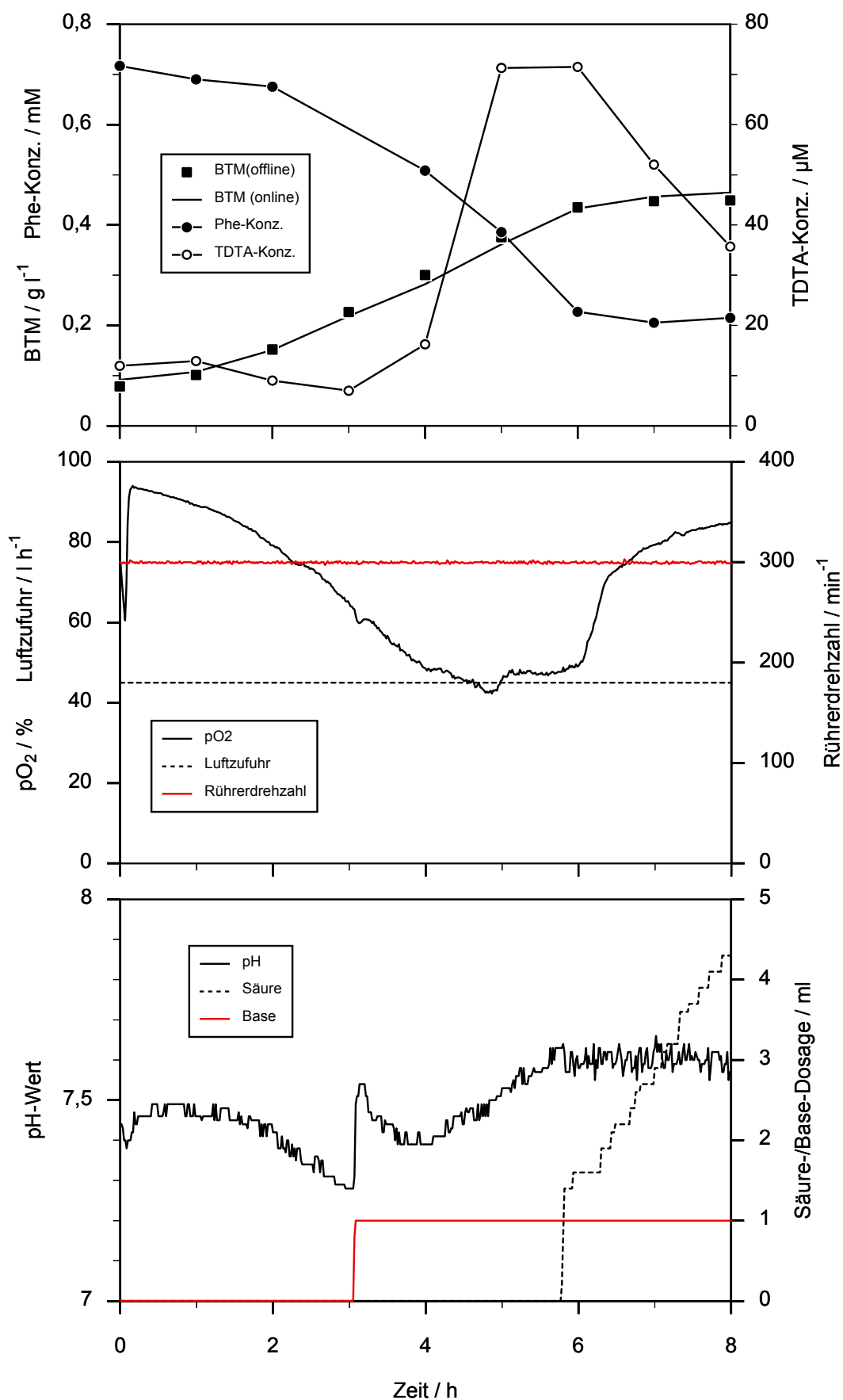


Abb. 3.23: 1,5 l-Fermentation mit Marine Broth.

Bezogen auf die ersten 5 h ergibt sich eine Produktausbeute $Y_{P/S}$ von $0,20 \text{ mol mol}^{-1}$, ein Produktertrag $Y_{P/X}$ von $260 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ und eine spez. Produktbildungsrate q_P von $52 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

In Tab. 3.3 sind die vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen dieser Fermentation aufgelistet.

Tab. 3.3: 1,5 l-Fermentation mit MB

Bioreaktor		1,5 l-FairMenTec
Arbeitsvolumen	l	1,5
Medium Vorkultur		MB
Medium Hauptkultur		MB
Betriebsweise		Batch
Temperatur	°C	30
pH		7,5 (o./m.R.)
Belüftungsrate	v/vm	0,5
Rührerdrehzahl	min^{-1}	300
Kultivierungsdauer	h	8
μ_{max}	h^{-1}	0,4
max. BTM	g l^{-1}	0,45
max. Produktkonz.	μM	72
Verbrauch Phe	mM	0,5
$Y_{P/S}$	mol mol^{-1}	0,20
$Y_{P/X}$	$\mu\text{mol g}^{-1}$	260
q_P	$\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	52

3.5.1.2 Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium

Als nächstes wurde eine 1,5 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium bei $30 \text{ } ^\circ\text{C}$ und pH 7,5 durchgeführt (Abb. 3.24).

Als Vorkultur wurde der Stamm T5 in fünf 1 l-Schüttelkolben mit je 200 ml Pepton/Hefeextrakt-Medium über Nacht bei $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ und 120 min^{-1} kultiviert. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem definierten Medium aufgenommen und in den Bioreaktor überführt. Die Biotrockenmasse zu Beginn der Fermentation lag bei ca.

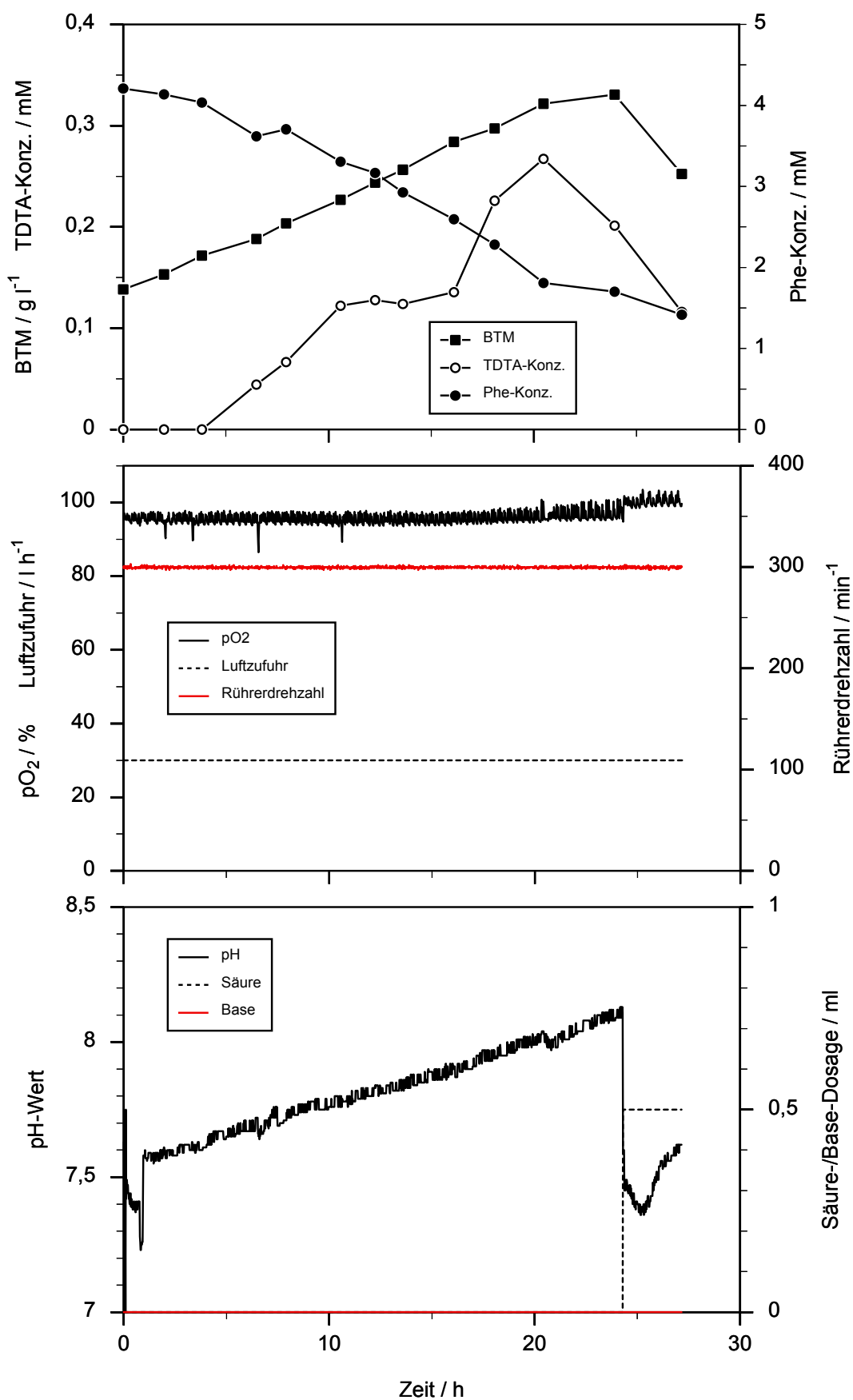


Abb. 3.24: 1,5 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium.

0,14 g l⁻¹. Bis zur 20. h war exponentielles Wachstum (vgl. log-Darstellung in Abb. 4.1) meßbar, die maximale Wachstumsrate betrug jedoch nur 0,04 h⁻¹. Nach einer kurzen Übergangsphase nahm die Biotrockenmassekonzentration wieder bis auf 0,25 g l⁻¹ ab. Der pO₂ lag während der gesamten Kultivierung konstant bei ca. 95 %. Der pH-Wert stieg während der gesamten Fermentation linear an. In der 24. h wurde dieser per Hand von pH 8,1 auf pH 7,5 zurückgesetzt.

Die Produktkonzentration stieg nach der 4. h stark an und erreichte in der 20. h das Maximum von 267 µM, fiel danach jedoch wieder bis auf 116 µM ab. Die Phenylalaninkonzentration nahm während der gesamten Fermentation stetig von 4,2 auf 1,4 mM ab. Bezogen auf die ersten 20 h ergibt sich eine Produktausbeute Y_{P/S} von 0,10 mol mol⁻¹, ein Produktertrag Y_{P/X} von 1161 µmol g⁻¹ und eine spez. Produktbildungsrate q_P von 58 µmol g⁻¹ h⁻¹.

In Tab. 3.4 sind die vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen dieser Fermentation aufgelistet.

Tab. 3.4: 1,5 l-Fermentation mit def. Medium

Bioreaktor		1,5 l-FairMenTec
Arbeitsvolumen	l	1,5
Medium Vorkultur		Pepton/HE
Medium Hauptkultur		Phe/His
Betriebsweise		Batch
Temperatur	°C	30
pH		7,5 (o.R.)
Belüftungsrate	v/vm	0,3
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	300
Kultivierungsdauer	h	27
µ _{max}	h ⁻¹	0,04
max. BTM	g l ⁻¹	0,33
max. Produktkonz.	µM	267
Verbrauch Phe	mM	2,8
Y _{P/S}	mol mol ⁻¹	0,11
Y _{P/X}	µmol g ⁻¹	1.161
q _P	µmol g ⁻¹ h ⁻¹	58

3.5.2 Kultivierung im 10 l-Bioreaktor

Für das Scale-up wurde als erster Schritt eine 8 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium bei 30 °C und pH 7,5 durchgeführt (Abb. 3.25).

Als Vorkultur wurde der Stamm T5 in fünf 1 l-Schüttelkolben mit je 200 ml Pepton/Hefeextrakt-Medium über Nacht bei 25 °C und 120 min⁻¹ kultiviert. Die Vorkultur wurde auf 50 ml aufkonzentriert und ca. 12 h später (solange wurden die Zellen auf Eis gelagert, da die Fermentation wegen einer 2D-fluoreszenzspektroskopischen On-Line-Analyse in Hannover statt fand; das Produkt fluoresziert jedoch nicht) in den Bioreaktor überführt. Die Biotrockenmasse zu Beginn der Fermentation lag bei ca. 0,1 g l⁻¹. Bis zur 25. h war exponentielles Wachstum bei einer Wachstumsrate von 0,04 h⁻¹ (vgl. log-Darstellung in Abb. 4.1) meßbar. Ab diesem Zeitpunkt stagnierte das Wachstum etwas und die Biotrockenmassekonzentration stieg bis auf einen Endwert von 0,35 g l⁻¹. Die pO₂-Messung konnte aufgrund einer unzureichend kalibrierten Sauerstoffelektrode nicht sinnvoll ausgewertet werden. Der pH-Wert stieg während der gesamten Fermentation von 7,2 auf 8 an.

Die Produktkonzentration stieg während der gesamten Fermentation an und erreichte zum Ende 96 µM. Die Phenylalaninkonzentration nahm während der gesamten Fermentation von 4,1 auf 1,4 mM ab. Bezogen auf die gesamten 38 h ergibt sich eine Produktausbeute $Y_{P/S}$ von 0,04 mol mol⁻¹, ein Produktertrag $Y_{P/X}$ von 417 µmol g⁻¹ und eine spez. Produktbildungsrate q_P von 11 µmol g⁻¹ h⁻¹.

In Tab. 3.5 sind die vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen dieser Fermentation aufgelistet.

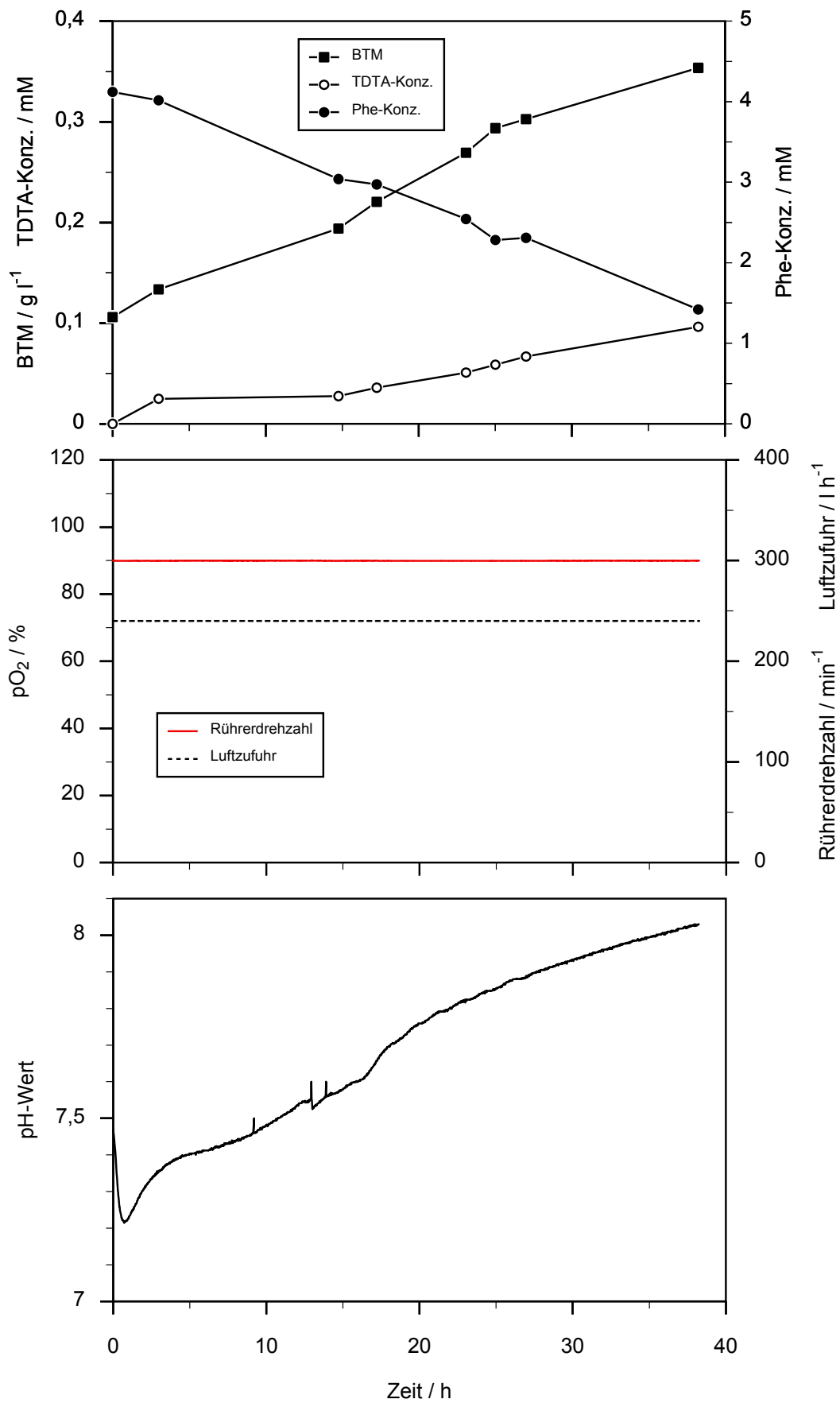


Abb. 3.25: 8 I-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium.

Tab. 3.5: 8 l-Fermentation mit def. Medium

Bioreaktor		Biostat C
Arbeitsvolumen	l	8
Medium Vorkultur		Pepton/HE
Medium Hauptkultur		Phe/His
Betriebsweise		Batch
Temperatur	°C	30
pH		7,5 (o.R.)
Belüftungsrate	v/vm	0,5
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	300
Kultivierungsdauer	h	38,3
μ_{\max}	h ⁻¹	0,04
max. BTM	g l ⁻¹	0,35
max. Produktkonz.	μM	96
Verbrauch Phe	mM	2,7
$Y_{P/S}$	mol mol ⁻¹	0,04
$Y_{P/X}$	μmol g ⁻¹	417
q_P	μmol g ⁻¹ h ⁻¹	11

3.5.3 Kultivierung im 100 l-Bioreaktor

Als nächster Schritt des Scale-up wurde eine 100 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium bei 30 °C und pH 7,5 durchgeführt (Abb. 3.26).

Als Vorkultur wurde der Stamm T5 über Schüttelkolben, 1,5 l- und 10 l-Bioreaktor in Pepton/Hefeextrakt-Medium kultiviert. Nach Überführen der 10 l-Vorkultur in den 100 l-Reaktor betrug die Biotrockenmassekonzentration ca. 0,13 g l⁻¹. Bis zur 20. h war exponentielles Wachstum (vgl. Abb. 4.1) bei einer Wachstumsrate von 0,02 h⁻¹ meßbar. Ab diesem Zeitpunkt stagnierte das Wachstum und ab der 28. h blieb die Biotrockenmassekonzentration konstant auf ca. 0,19 g l⁻¹. Der pO₂- und der pH-Verlauf unterschieden sich kaum von den vorhergehenden Fermentationen mit diesem Medium, d.h. der pO₂ blieb konstant auf relativ hohem Niveau von ca. 90-95 % und der pH hatte leicht steigende Tendenz von pH 7,6 zu Beginn auf pH 8 zum Ende der Fermentation.

Die Produktkonzentration stieg während der gesamten Fermentation an und erreichte zum Ende 122 μM . Die Phenylalaninkonzentration nahm während der gesamten Fermentation von 3,7 auf 1,7 mM ab. Bezogen auf die gesamten 44 h ergibt sich eine Produktausbeute $Y_{P/S}$ von 0,06 mol mol⁻¹, ein Produktertrag $Y_{P/X}$ von 763 $\mu\text{mol g}^{-1}$ und eine spez. Produktbildungsrate q_P von 17 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

In Tab. 3.6 sind die vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen dieser Fermentation aufgelistet.

Tab. 3.6: 100 l-Fermentation mit def. Medium

Bioreaktor		Biostat D
Arbeitsvolumen	l	100
Medium Vorkultur		Pepton/HE
Medium Hauptkultur		Phe/His
Betriebsweise		Batch
Temperatur	°C	30
pH		7,5 (o.R.)
Belüftungsrate	v/vm	0,25
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	200
Kultivierungsdauer	h	44
μ_{max}	h ⁻¹	0,02
max. BTM	g l ⁻¹	0,19
max. Produktkonz.	μM	122
Verbrauch Phe	mM	2,0
$Y_{P/S}$	mol mol ⁻¹	0,06
$Y_{P/X}$	$\mu\text{mol g}^{-1}$	763
q_P	$\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	17

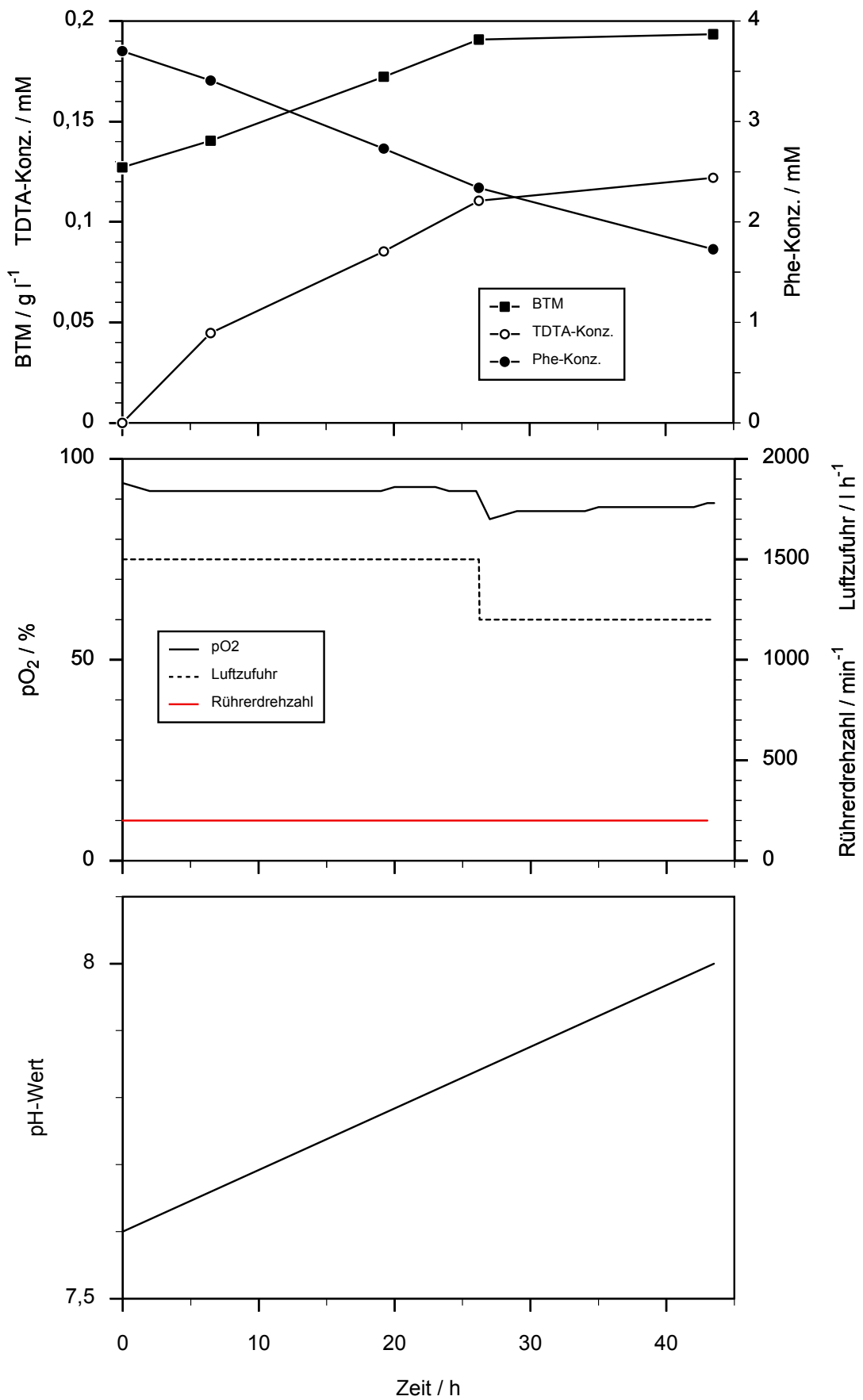


Abb. 3.26: 100 l-Fermentation mit dem definierten Produktionsmedium.

3.6 Optimierung der Produktaufarbeitung

3.6.1 Vergleich der Solventextraktion mit der Adsorptionschromatographie

Während die Solventextraktion mit Ethylacetat im kleinen Maßstab (bis 1 l) sicherlich eine gute Methode darstellt, um die Syntheseprodukte der Mikroorganismen fast vollständig aus der Fermentationsflüssigkeit herauszulösen, sind im größeren Maßstab (100 l) teure Geräte (Extraktor/Kolonnen, Dünnschichtverdampfer) notwendig, und die Lösemittelmenge nimmt erhebliche Dimensionen an (bei zweimaliger Extraktion von 100 l sind das schon 200 l Lösemittel). Während die Extraktion selber auch mit relativ einfachen Mitteln machbar wäre, ist das Einengen solcher Lösemittelmengen in einem laborüblichen Rotationsverdampfer (max. 2 l-Kolben) jedoch nicht mehr durchführbar.

Daher wurde für die Aufarbeitung der Fermentationsflüssigkeit eine mit einem Adsorberharz gefüllte Chromatographiesäule eingesetzt und im Maßstab vergrößert. Bei diesem Verfahren beträgt die Lösemittelmenge nur ca. 1/10 des aufzuarbeitenden Flüssigkeitsvolumens.

Ein Vergleich zwischen der Solventextraktion mit Ethylacetat (EtAc) und der Chromatographie mit dem Adsorberharz Amberlite[®] XAD-16 bezüglich der Effektivität zeigt, daß die Solventextraktion der Adsorptionschromatographie etwas überlegen ist, die Leistung des Adsorberharzes aber durchaus ausreicht (Abb. 3.27). Aufgearbeitet wurde der Kulturüberstand einer Kultivierung mit dem Vollmedium Marine Broth.

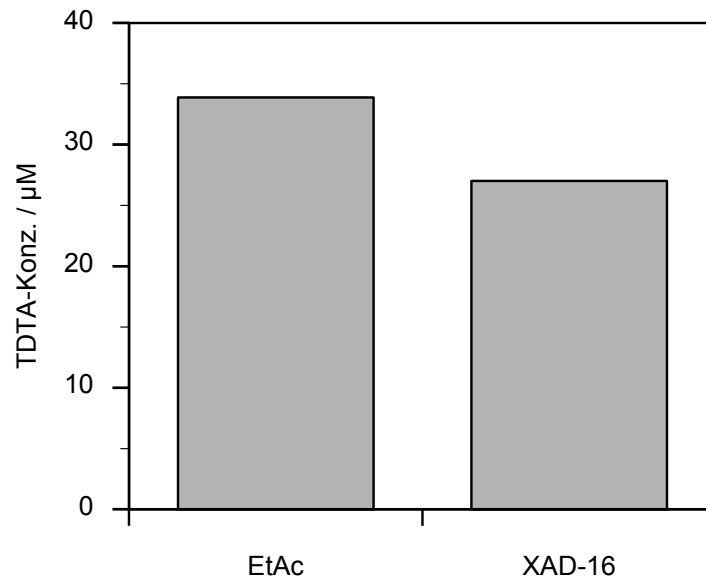


Abb. 3.27: Vergleich von Solventextraktion und Adsorptionschromatographie.

3.6.2 Vergleich verschiedener Adsorberharze

Es wurden verschiedene Adsorberharze zur Abtrennung der TDTA getestet. In Tab. 3.7 werden die Eigenschaften dieser Harze aufgelistet, und das Ergebnis des Vergleiches ist in Abb. 3.28 zu sehen.

Tab. 3.7: Vergleich der Eigenschaften der Harze

		XAD-4	XAD-7	XAD-16	Butyl 650-M
Vernetzung		aromatisch	aliphatisch	aromatisch	aliphatisch
Oberfläche	m^2/g	725	450	800	
Porendurchmesser	Å	40	90	100	1000
Dichte	g/ml	1,08	1,24	1,08	
Partikelgröße	μm	490-690	560-710	560-710	40-90
max. Temperatur	$^{\circ}\text{C}$	150	100	150	> 121

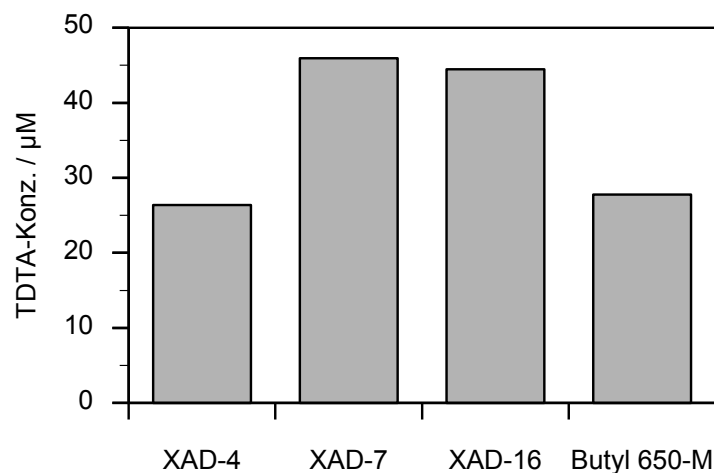


Abb. 3.28: Vergleich verschiedener Adsorberharze.

Amberlite[®] XAD-7 und Amberlite[®] XAD-16 haben ähnlich große Produktmengen abgetrennt, während Amberlite[®] XAD-4 und Toyopearl[™] Butyl-650M nicht einmal 2/3 dieser Menge vorweisen können. Obwohl mit Amberlite[®] XAD-7 gegenüber Amberlite[®] XAD-16 eine geringfügig größere Produktmenge erzielt wurde, wird für die weiteren Aufarbeitungen Amberlite[®] XAD-16 benutzt, da dieses autoklavierbar ist und somit auch zur im Bioreaktorsystem integrierten Produktabtrennung eingesetzt werden kann.

3.6.3 Scale-up der Extraktionssäule

Als Aufbereitungsverfahren wurde die Adsorptionschromatographie im „expanded-bed“ gewählt, um auch Kulturflüssigkeit ohne vorherige Abtrennung der Zellen extrahieren zu können. Beim Expanded-Bed-Verfahren wird die aufzuarbeitende Flüssigkeit von unten durch die Säule gepumpt, wodurch sich das Harzbett ausdehnt und das Passieren von Partikeln (z.B. Zellen) ermöglicht.

Für die Aufarbeitung bis 10 l Kulturflüssigkeit wird eine Säule (100 cm x 3 cm) benutzt, in der sich ein Bett mit einer Höhe von ca. 50 cm und einem Durchmesser von 2,8 cm befindet, was einem Volumen von ca. 300 ml entspricht. Im Betrieb dehnt sich das Bett auf ca. 80-90 cm Höhe aus.

Um zu überprüfen, ob die Menge Harz (300 ml entsprechen ca. 200 g Amberlite® XAD-16 direkt aus der Verpackung) genügend Kapazität für 10 l Kulturflüssigkeit hat, sollte der Breakthrough-Punkt bestimmt werden. An diesem Punkt steigt die Produktkonzentration am Ausgang der Säule bei Sättigung des Harzes sprunghaft von fast Null auf die Konzentration in der Vorlage an. Für diesen Versuch wurden 10 l Kulturflüssigkeit durch die Säule gepumpt und die Produktkonzentration im Ablauf nach jedem Liter aufgearbeiteter Flüssigkeit gemessen (Abb 3.29).

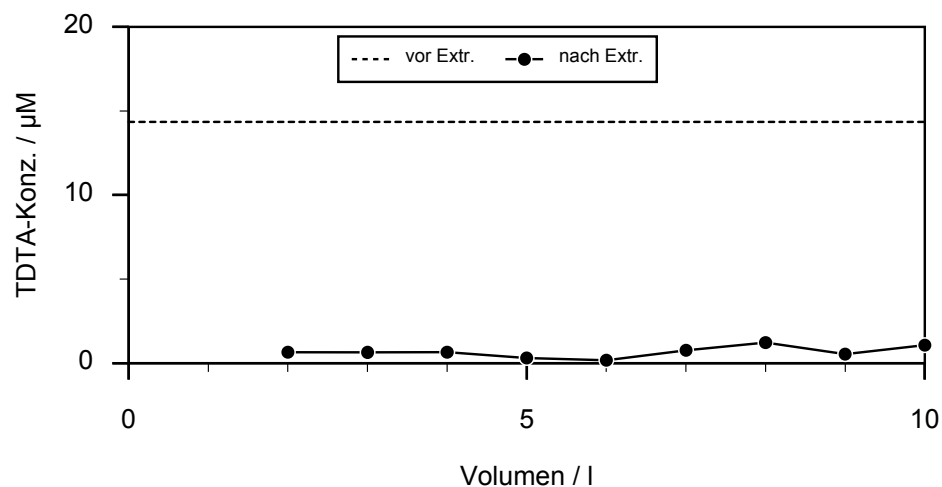


Abb. 3.29: Test auf ausreichende Kapazität (Breakthrough).

Der Breakthrough-Punkt wurde nach der Extraktion von 10 l Kulturflüssigkeit nicht erreicht, so daß man von einer ausreichenden Kapazität des Harzes ausgehen kann. Auf dieser Grundlage wurde eine Säule angefertigt, die zur Extraktion von bis zu 100 l Kulturflüssigkeit geeignet ist.

Für das Scale-up der Extraktionssäule ist wichtig, daß die Verweilzeit der abzutrennenden Substanzen in der Säule konstant bleibt, da nur so die für die Abtrennung wichtigen Eigenschaften von einer Säule auf eine andere übertragbar sind. Da in der Expanded-Bed-Adsorption die Höhe des expandierten Bettes von der vertikalen Strömungsgeschwindigkeit in der Säule abhängt, müssen sowohl die vertikale Strömungsgeschwindigkeit als auch die Betthöhe konstant gehalten werden. Das Harzvolumen wird in der gleichen Größenordnung geändert, die der Änderung des aufzuarbeitenden Flüssigkeitsvolumens entspricht. Das heißt in diesem Fall eine Erhöhung des Bettvolumens um den Faktor 10 auf 3 l, wodurch sich der Säulendurchmesser bei konstanter Höhe auf ca. 9 cm vergrößert.

Mit dieser Säule wurden ca. 96 l Kulturflüssigkeit (aus 100 l-Fermentation) mit einer Produktkonzentration von ca. 120 µM aufgearbeitet, und auch im Ablauf des letzten Liters konnte keine meßbare Produktkonzentration gemessen werden. Damit wurde bestätigt, daß die Kapazität dieser Säule ausgereicht hat. Allerdings war auch im erhaltenen Rohextrakt kein Produkt mehr nachzuweisen (siehe Diskussion).

3.7 Aufbau eines kontinuierlichen Produktionsprozesses

3.7.1 Kontinuierliche Produktion im Chemostaten

Zur kontinuierlichen Produktion der Tropodithiolsäure wurde zunächst die Fermentation im Chemostaten untersucht. Bei dieser Betriebsweise wird der Bioreaktor zunächst als Batch gestartet und während der exponentiellen Wachstumsphase begonnen, Medium mit einer konstanten Durchflußrate durch den Bioreaktor zu pumpen. Wird die Verdünnungsrate niedriger eingestellt als die kritische Wachstumsrate des Organismus, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und abgezogenen Zellen ein, so daß Biomasse-, Substrat- und Produktkonzentration konstant bleiben („steady-state“).

Die Fermentation im Chemostat wurde mit dem Vollmedium Marine Broth im 1,5 l-Bioreaktor durchgeführt (Abb. 3.30).

Als Vorkultur wurden drei 250 ml-Schüttelkolben mit je 50 ml MB, die jeweils mit 1 ml Glycerin-Stammkultur angeimpft worden waren, über Nacht bei 25 °C und 180 min⁻¹ inkubiert. Nach dem Animpfen des Bioreaktors ging die Kultur sofort in die exponentielle Wachstumsphase mit einer Wachstumsrate von 0,4 h⁻¹ über. Nach 4,5 h wurde die Substratzufuhr (Medium: Marine Broth) eingeschaltet (grau hinterlegte Fläche). Der Volumenstrom betrug 1,5 ml min⁻¹, das entspricht einer Verdünnungsrate von 0,06 h⁻¹. Im kontinuierlichen Betrieb stieg die Wachstumskurve zunächst weiterhin steil an, beschrieb eine kurze Schwingung und erreichte dann bei 24,5 h die maximale Biotrockenmassekonzentration von ca. 0,8 g l⁻¹. Ab diesem Zeitpunkt war nur noch eine Abnahme der Biomasse zu beobachten, ein „steady-state“ konnte in 70 h nicht erreicht werden. Der pO₂ gab den Verlauf der Wachstumskurve gut wider, er verlief fast spiegelbildlich. Der pH-Wert hatte zunächst eine Tendenz in den sauren Bereich und wurde durch Zudosierung von NaOH kontrolliert, bis ab dem Ende der exponentiellen

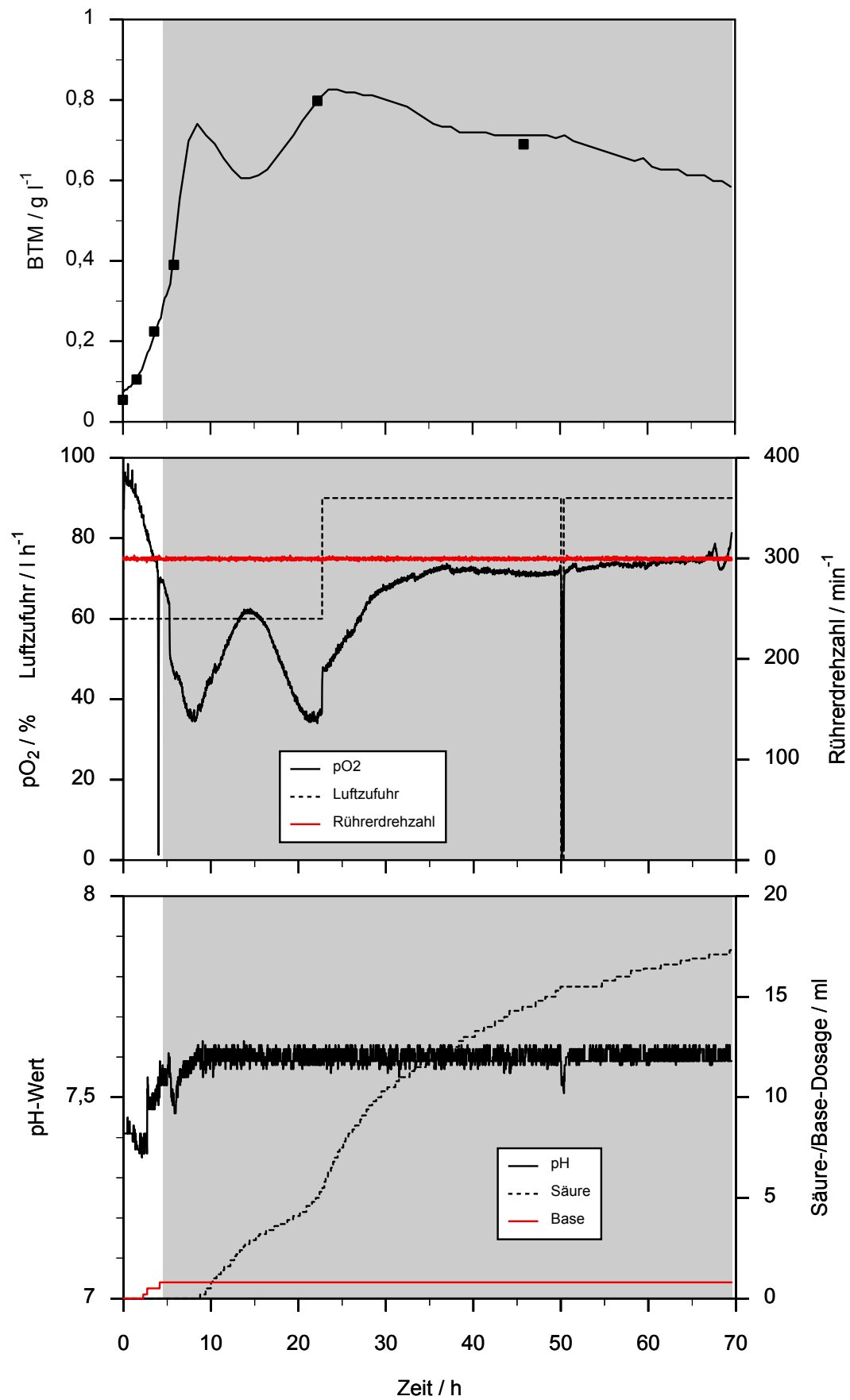


Abb. 3.30: Chemostat-Fermentation. - grau hinterlegte Fläche: Chemostat-Betrieb

Wachstumsphase ausschließlich Säure dosiert wurde, der Organismus also eine basische Substanz produzierte oder eine saure abbaute. Dieses pH-Verhalten wurde auch schon in den Batch-Ansätzen beobachtet.

In Tab. 3.8 sind die vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen dieser Fermentation aufgelistet.

Tab. 3.8: Chemostat-Kultivierung mit Marine Broth

Bioreaktor		2,3 l-FairMenTec
Arbeitsvolumen	l	1,5
Medium Vorkultur		MB
Medium Hauptkultur		MB
Betriebsweise		Chemostat
Temperatur	°C	30
pH		7,5 (m.R.)
Belüftungsrate	v/vm	0,75 / 1
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	300
Feed	ml min ⁻¹	1,5
Verdünnungsrate	h ⁻¹	0,06
Kultivierungsdauer	h	70
μ_{\max}	h ⁻¹	0,4
max. BTM	g l ⁻¹	0,8

Obwohl die Verdünnungsrate mit $0,06 \text{ h}^{-1}$ weit unter der maximalen Wachstumsrate von $0,4 \text{ h}^{-1}$ lag, war kein stabiler Gleichgewichtszustand zu erreichen, die Biomasse wurde ausgewaschen. Vergleicht man die Verdünnungsrate, also die Abnahme der Biomasse ohne jegliches Wachstum, mit der Auswaschrage, also die Verdünnungsrate plus vorhandenem Wachstum, in der logarithmischen Darstellung, kann man aus der Differenz direkt die tatsächliche Wachstumsrate berechnen (Abb. 3.31). Diese betrug $0,05 \text{ h}^{-1}$.

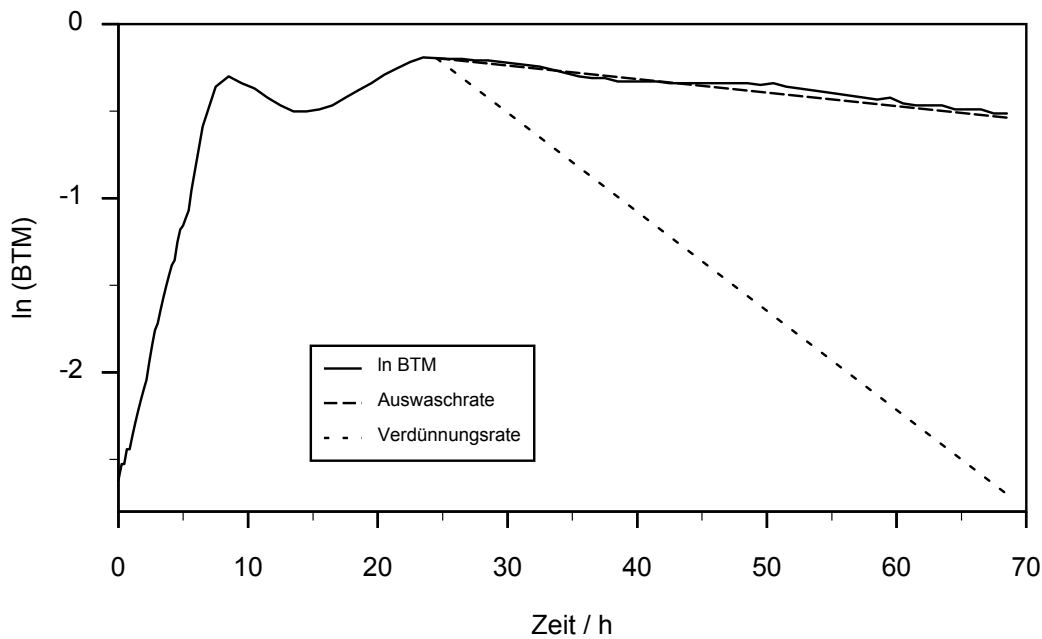


Abb. 3.31: Vergleich von Verdünnungsrate und Auswaschrate.

Bei der Kultivierung im Chemostaten war mit zunehmender Kultivierungsdauer eine Veränderung der Zellmorphologie festzustellen. Während in der exponentiellen Wachstumsphase hauptsächlich einzelne, sehr bewegliche kleine Stäbchen zu erkennen waren, lagern sich diese im weiteren Verlauf der Kultivierung zu Aggregaten zusammen, und man kann auch sehr lange Zellen (mehrere μm) und solche mit Verdickungen entdecken. In Abb. 3.32 werden Beispiele gezeigt.

Diese Veränderungen der Zellmorphologie wurden mehrfach vor allem bei älteren Kulturen beobachtet, eine Kontamination konnte ausgeschlossen werden.

Desweiteren wurde beim Ausplattieren von Proben einer kontinuierlichen Kultur ein Organismus gefunden, der beige statt braune Kolonien auf MB bildet. Zunächst ist von einer Kontamination ausgegangen worden, durch Sequenzanalyse der 16S rDNA konnte jedoch nachgewiesen werden, daß es sich um eine Mutante des Stammes T5 handelt, die keine Tropodithiolsäure bildet. Eine solche Mutante wurde innerhalb dieser Arbeit zweimal unabhängig voneinander und ein weiteres Mal bei einem Projektpartner isoliert.



Abb. 3.32: Veränderung der Zellmorphologie.

Daß durch eine erheblich herabgesetzte Wachstumsrate kein stabiler Zustand in der kontinuierlichen Kultur im Chemostaten erreicht wird, könnte möglicherweise auf die antibiotisch wirksame Tropodithiolsäure zurückgeführt werden. Wie schon in Abschnitt 3.4.6 erwähnt, wirkt dieses Produkt ab einer bestimmten Konzentration auf den Stamm T5 stark inhibierend, so daß ein Einfluß auf das Wachstumsverhalten auch bei niedrigeren Konzentrationen wahrscheinlich ist.

Aufgrund dieser Tatsache wurden zwei Strategien weiter verfolgt. Zum einen sollten die Zellen am Auswaschen gehindert werden (Querstromfiltration oder Immobilisierung), zum anderen sollte die Tropodithiolsäure schon im Bioreaktor aus dem Medium entfernt werden, um eine Produktinhibierung zu verhindern.

3.7.2 Einsatz immobilisierter Zellen

Ein Auswaschen der Zellen in einer kontinuierlichen Kultur kann durch ein Zellrückhaltesystem verhindert werden. Dafür kann man entweder ein Querstromfiltrationsmodul am Biorektorausgang einsetzen oder die Zellen im Bioreaktor immobilisieren. Da im Filtrationsmodul auf Dauer die Gefahr des Verblockens durch Zellwachstum auf der Membran besteht, wurde in dieser Arbeit die Zellimmobilisierung eingesetzt.

Als Immobilisierungssystem wurde ein Matrixeinschluß mit Polyvinylalkohol (LentiKats®) gewählt, da diese bei guter biologischer Verträglichkeit chemisch und mechanisch sehr stabil sind, was den Einsatz direkt im Rührkesselreaktor ermöglicht. Durch die Linsenform sind außerdem die Diffusionswege sehr klein, wodurch der Stofftransport (Sauerstoff, Substrate, Produkt) begünstigt wird.

Als Vorversuch wurden die immobilisierten Zellen zunächst im Schüttelkolben kultiviert. Dafür wurden 2 ml eines Zellkonzentrates, die ca. 4,2 mg Biotrockenmasse entsprechen, in 8 ml LentiKat[®]-Polymer suspendiert und die linsenförmigen Immobilisate hergestellt. Die immobilisierten Zellen wurden in 50 ml definiertem Phenylalanin/Histidin-Medium in einem 250 ml-Schüttelkolben bei 25 °C und 180 min⁻¹ inkubiert. Die Biotrockenmassekonzentration zu Beginn der Kultivierung betrug ca. 0,084 g l⁻¹. Als BTM wurde zu der Biomasse im Überstand der Anfangswert (0,084 g l⁻¹) der Biomasse in den Immobilisaten hinzuaddiert. Ein Wachstum der Zellen in den Immobilisaten wurde nicht berücksichtigt (Abb. 3.33).

Nach 185 Stunden wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt.

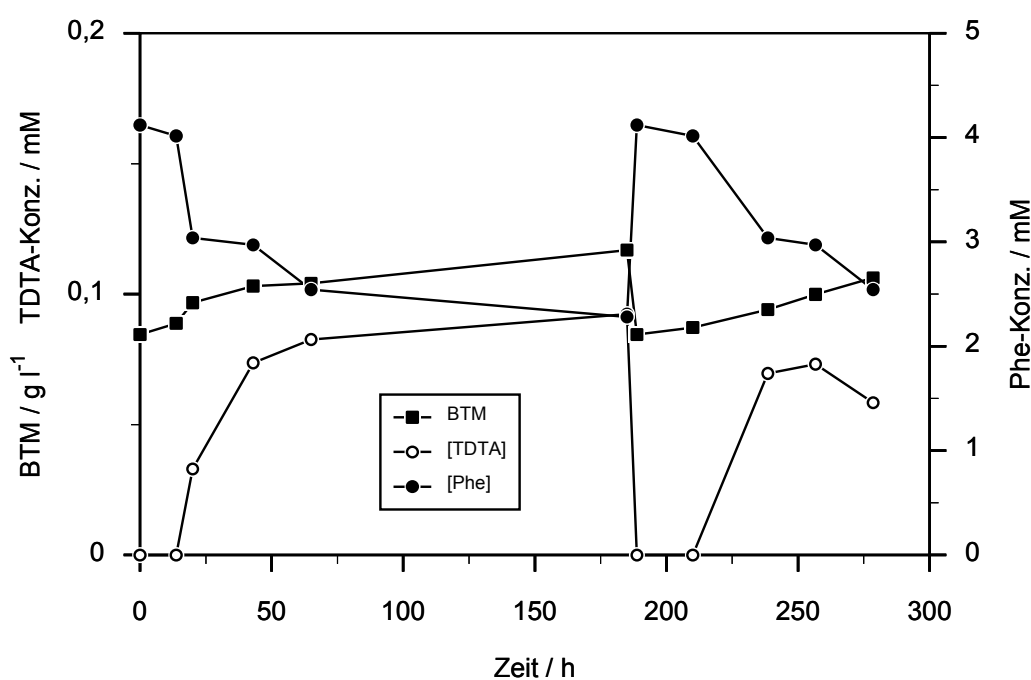


Abb. 3.33: Immobilisierte Zellen im Schüttelkolben.

Der Versuch hat gezeigt, daß die Zellen auch in immobilisierter Form produktiv sind. Im ersten Abschnitt wurden 92 und im zweiten maximal 73 mM Produkt gebildet, was durchaus mit den Werten aus den Fermentationen vergleichbar ist. Außerdem wurde die Vermutung bekräftigt, daß der Produktionsprozeß im Laufe der Kultivierung durch eine Limitierung oder Inhibierung gestört werden könnte, da die

Produktkonzentration bei Austausch des Mediums nach einer lag-Phase wieder stark anstieg, während sie vor Austausch des Mediums schon fast konstant war. Am Ende des 2. Abschnittes nahm die Produktkonzentration wieder leicht ab.

Als nächstes wurde der Einsatz der immobilisierten Zellen im Bioreaktor untersucht.

Dafür wurden 20 ml eines Zellkonzentrates, die ca. 48 mg Biotrockenmasse entsprechen, in 80 ml LentiKat[®]-Polymer suspendiert und die linsenförmigen Immobilisate hergestellt. Die immobilisierten Zellen wurden in 1 l definiertem Phenylalanin/Histidin-Medium aufgenommen und in den Bioreaktor überführt. Die Biotrockenmassekonzentration zu Beginn der Fermentation betrug ca. 0,048 g l⁻¹. Als BTM wurde zu der Biomasse im Überstand der Anfangswert (0,048 g l⁻¹) der Biomasse in den Immobilisaten hinzuaddiert. Ein Wachstum der Zellen in den Immobilisaten wurde nicht berücksichtigt.

Während der gesamten Fermentation war ein linearer Biomassezuwachs (ca. 1,2 mg l⁻¹ h⁻¹) bis auf einen Endwert von 0,12 g l⁻¹ zu beobachten. Der pO₂-Wert lag konstant um 100 % und der pH-Wert hatte eine Tendenz in den basischen Bereich, wurde jedoch ab der 10. h mit Schwefelsäure auf pH 7,5 geregelt.

Die Produktkonzentration stieg ab der 10. h stark an und erreichte einen Endwert von 132 μM. Die Phenylalaninkonzentration nahm von 4 auf 2,3 mM ab. Bezogen auf die gesamten 60 h ergibt sich eine Produktausbeute $Y_{P/S}$ von 0,08 mol mol⁻¹, ein Produktertrag $Y_{P/X}$ von 1562 μmol g⁻¹ und eine spez. Produktbildungsrate q_P von 26 μmol g⁻¹ h⁻¹.

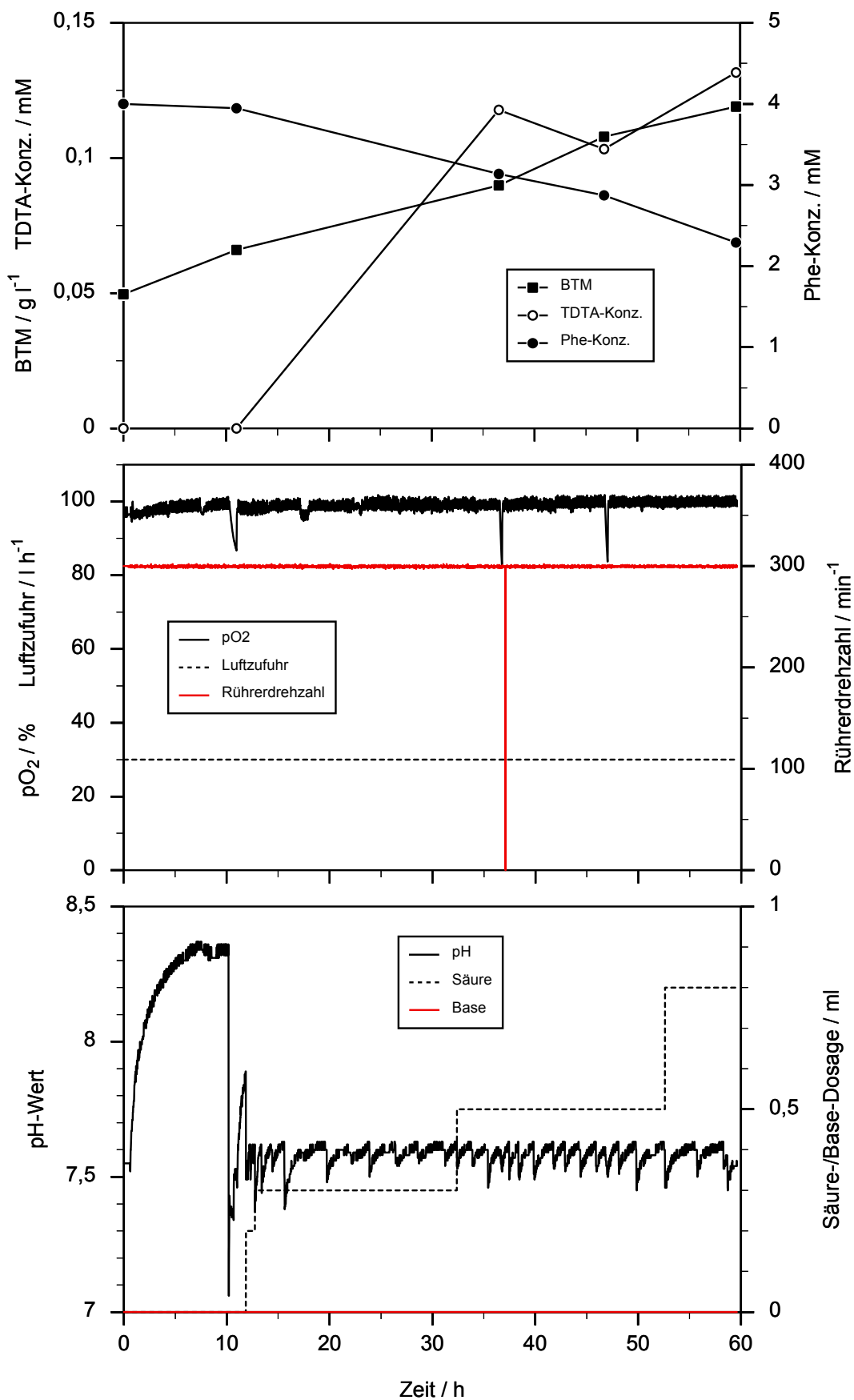


Abb. 3.34: Fermentation mit immobilisierten Zellen.

In Tab. 3.9 sind die vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen dieser Fermentation aufgelistet.

Tab. 3.9: Fermentation mit immobilisierten Zellen

Bioreaktor		1,5 l-FairMenTec
Arbeitsvolumen	l	1
Medium Vorkultur		Pepton/HE
Medium Hauptkultur		Phe/His
Betriebsweise		Batch, immobilisierte Zellen
Temperatur	°C	30
pH		7,5
Belüftungsrate	v/vm	0,5
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	300
Kultivierungsdauer	h	60
μ_{linear}	mg l ⁻¹ h ⁻¹	1,2
max. BTM	g l ⁻¹	0,119
max. Produktkonz.	µM	132
Verbrauch Phe	mM	1,7
$Y_{P/S}$	mol mol ⁻¹	0,08
$Y_{P/X}$	µmol g ⁻¹	1.562
q_P	µmol g ⁻¹ h ⁻¹	26

3.7.3 Integrierte Produktabtrennung

Durch die Immobilisierung der Zellen kann das Problem des Auswaschens der Zellen in der kontinuierlichen Kultur gelöst werden, nicht jedoch das der Produktinhibierung. Um eine Inhibierung von Wachstum und Produktbildung durch das Produkt selbst zu verhindern, muß das Produkt aus der Fermentationsflüssigkeit entfernt werden. Dieses wurde mit einem externen Kreislauf durch eine Adsorbersäule ermöglicht (vgl. Abb. 2.1). Vor Eintritt der Fermentationsflüssigkeit in die Säule wurde der pH-Wert in einer vorgeschalteten Flasche mit Magnetrührkern, pH-Elektrode und Säure-Dosierung auf pH 3 geregelt, da das Produkt nur unter sauren Bedingungen an das Säulenmaterial (Amberlite® XAD-16) adsorbiert wird. Nach Durchlaufen der Säule gelangte die Fermentationsflüssigkeit

wieder in den Bioreaktor zurück, in dem der pH auf 7,5 geregelt wurde. Durch die Temperaturbeständigkeit des Adsorbermaterials bis 150 °C konnte das gesamte System autoklaviert und damit unter sterilen Bedingungen eingesetzt werden.

Dieses System wurde in der Fermentation mit immobilisierten Zellen benutzt (Abb. 3.35).

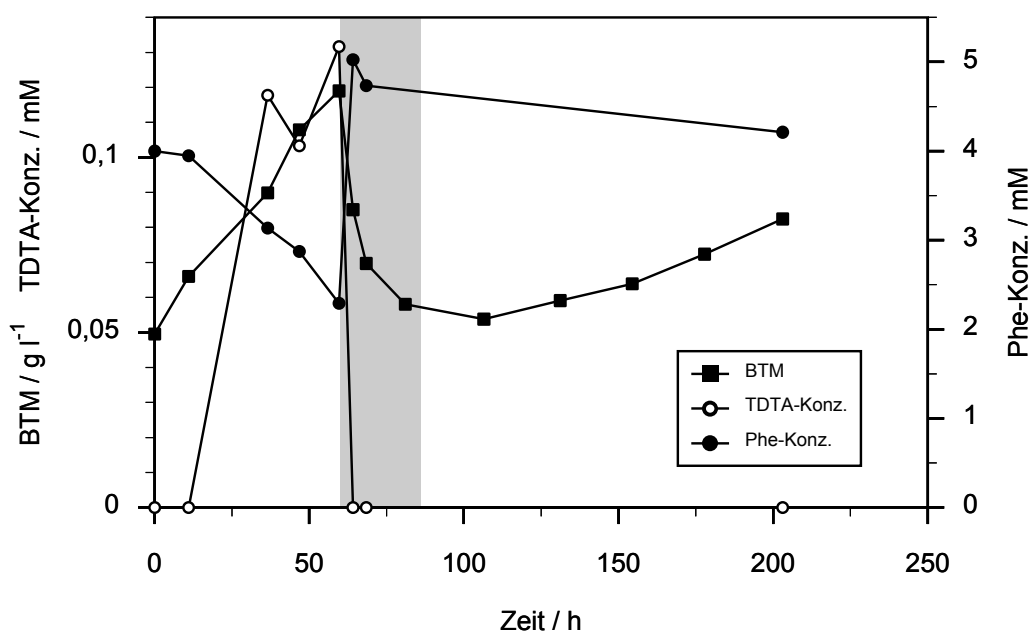


Abb. 3.35: Integrierte Produktabtrennung. - grau hinterlegte Fläche: kont. Produktextr.

Bis zur 60. h entsprechen die Meßwerte denen der beschriebenen Fermentation mit immobilisierten Zellen. In der 60. h wurde der Bioreaktor mit ca. 500 ml frischem Medium (doppelte Phe-/His-Konzentration) aufgefüllt und der externe Extraktionskreislauf aktiviert (grau hinterlegte Fläche). In der 84. h wurde die integrierte Produktextraktion wieder abgeschaltet.

Mit aktiviertem Extraktionskreislauf ist die Produktkonzentration schnell auf Null gesunken, während die Phenylalanin-Konzentration durch die Mediumzugabe auf 5 mM anstieg. Gleichzeitig halbierte sich die Biotrockenmassekonzentration von 119 auf 58 mg l⁻¹, was sowohl auf die Verdünnung als auch auf Zellyse und Filtration/Adsorption im Extraktionskreislauf zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf stieg die

Biotrockenmassekonzentration wieder leicht an, während die Phenylalanin-Konzentration abnahm. Die Produktkonzentration blieb jedoch konstant auf Null, es konnte kein Produkt mehr gemessen werden.

Wie schon bei der Aufarbeitung der 100 l-Fermentation berichtet, konnte auch hier kein Produkt im Eluat der eingesetzten Säule nachgewiesen werden. Die Säule wurde für ca. 24 h vom Medium durchflossen, währenddessen es vermutlich zum Abbau oder zu weiteren Reaktionen des Produktes gekommen sein muß.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Bestimmung der optimalen Temperatur, des optimalen pH-Wertes und der optimalen Salinität bezüglich Wachstum und Produktbildung zunächst ein Minimalmedium und darauf aufbauend ein definiertes Medium für die Produktion der Tropodithiolsäure entwickelt. Dann wurde die Produktion mit diesem Medium im Batchverfahren bis in einen Maßstab von 100 l und außerdem die kontinuierliche Kultur, der Einsatz von immobilisierten Zellen und eine integrierte Produktabtrennung untersucht.

4.1 Optimierung physikalischer und chemischer Bedingungen bezüglich des Wachstums und der Produktbildung

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der maximalen Wachstumsrate und der maximalen Produktbildungsrate von der Temperatur und dem pH-Wert zeigen eine weitgehende Übereinstimmung.

Bei einer Temperatur von 30 °C ist sowohl die Wachstums- als auch die Produktbildungsrate maximal. Temperaturoptima zwischen 25 °C und 35 °C findet man häufig in der Literatur, obwohl die Temperaturen im natürlichen Lebensraum dieser Organismen meist sehr viel niedriger liegen (in der Meerwassersäule zwischen 4 °C und 20 °C). Im Wattenmeer, dem Ort der Isolierung des Stammes T5, können zu Niedrigwasserzeiten allerdings durchaus auch Temperaturen von 35 °C und mehr auftreten. Der durch eine 16S rDNA-Analyse als nächster Verwandter identifizierte *Roseobacter gallaeciensis* besitzt eine optimale Wachstumstemperatur zwischen 23 °C und 27 °C [Ruiz-Ponte et al. 1998].

Das pH-Optimum liegt für die Wachstums- und die Produktbildungsrate bei pH 7,5. Dieser Wert entspricht dem pH-Wert im Meerwasser. Der *Roseobacter gallaeciensis* hat ein pH-Optimum für Wachstum von 7,0 [Ruiz-Ponte et al. 1998].

Die Untersuchung zur Auswirkung der Salinität auf die Wachstumsrate und die Produktbildung zeigt eindeutig, daß der Stamm T5 an ein marines Milieu angepaßt ist. Bei einer Salinität von nahezu Null ist nur geringes Wachstum und fast keine Produktbildung zu messen. Erst ab einer Salinität von 25 g l⁻¹ sind gutes Wachstum und gute Produktbildung festzustellen. Während die maximale Wachstumsrate ab einer Salinität von 40 g l⁻¹ nur leicht abnimmt, fällt die Produktbildung schon bei Salinitäten größer als 25 g l⁻¹ wieder schnell ab. Als Erklärung für die geringe Produktbildung bei hohen Salinitäten könnte die Aufwendung von Energie für die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes in der Zelle gegenüber dem umgebenden Medium sein, wodurch weniger Energie für die Produktbildung zur Verfügung steht. Für die weitere Optimierung wurde eine Salinität von 32 g l⁻¹ verwendet.

4.2 Entwicklung eines Minimalmediums als Grundlage für ein definiertes Produktionsmedium

Als Grundlage für ein definiertes Produktionsmedium wurde zunächst ein Minimalmedium entwickelt, das für das Wachstum erforderlichen Anforderungen bei minimalem Einsatz von Mediumbestandteilen entspricht. Als Ausgangsmedium diente ein künstliches Meerwassermedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. Es wurde die Abhängigkeit des Zellwachstums von essentiellen Vitaminen und Aminosäuren und die Nutzung von Aminosäuren und Kohlenstoffquellen durch den Organismus untersucht.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß der Stamm T5 weder Vitamine noch Aminosäuren zum Wachsen benötigt. Es handelt sich also um einen sehr anspruchslosen Organismus, dem schon ein geringes Nährstoffangebot zur Vermehrung ausreicht, was das Überleben im natürlichen Lebensraum der Meere sichert.

In Versuchen zur Nutzung von Aminosäuren haben sich L-Glutamin, L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure als die Aminosäuren herausgestellt, die als erste aufgebraucht wurden. Bei hier nicht weiter aufgeführten Experimenten wurde außerdem bei Zusatz von L-Glutamin und L-Asparaginsäure die größte maximale Wachstumsrate erzielt, was auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäuren im Aminosäurestoffwechsel schließen läßt. L-Glutamin wird wahrscheinlich vom Organismus als leicht verwertbare Stickstoffquelle benutzt, da die Amidgruppe dieser Aminosäure als Stickstoffdonator für viele stickstoffhaltige Verbindungen (Aminozucker, Purine, Aminosäuren) dienen kann [Karlson et al. 1994]. Eine möglicherweise vorhandene Stickstofflimitierung könnte dann durch L-Glutamin und L-Asparaginsäure aufgehoben werden.

Bei der Untersuchung des als Kohlenstoffquelle nutzbaren Substratspektrums wurde das beste Wachstum mit D(+)-Glucose, D(+)-Galaktose, D(-)-Mannit, Saccharose, Maltose und Glycerin erzielt, während ein Wachstum auf Polysacchariden nicht möglich war. Da Glucose als Ursache für eine Katabolitrepression bekannt ist [Greasham und Herber 1997], stehen mit Mannit, Saccharose, Maltose und Glycerin gute Alternativen zur Verfügung.

Als Grundlage für die Entwicklung eines definierten Produktionsmediums wurde aufgrund dieser Versuche ein Medium benutzt, das außer Mineralsalzen und Spurenelementen nur Glucose, Ammoniumchlorid und Phosphat enthält.

4.3 Entwicklung eines definierten Produktionsmediums

Die Entwicklung des definierten Produktionsmediums hat ergeben, daß die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Histidin für die Bildung der Tropodithiolsäure notwendig sind. L-Phenylalanin scheint als Substrat zu dienen, da eine Erhöhung der L-Phenylalanin-Konzentration eine Erhöhung der Produktkonzentration bewirkt. Die Produktkonzentration steigt jedoch nicht linear mit der L-Phenylalanin-Konzentration an, sondern scheint sich einem Grenzwert anzunähern. Als Erklärung kommt entweder eine Limitierung durch andere für die Reaktion wichtigen Substanzen oder eine Sättigung des Enzymsystems z.B. gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik in Frage. Aufgrund geringer Animpfmengen und geringen Wachstums könnte man tatsächlich von einer Sättigung der vorhandenen Enzymsysteme ausgehen, d.h. die Enzymsysteme aller Zellen sind vollständig an das Substrat gebunden, so daß eine höhere Substratkonzentration in der zur Verfügung stehenden Zeit keine Erhöhung der Produktkonzentration ermöglicht.

Eine Erhöhung der L-Histidin-Konzentration hingegen bewirkt keine Produktkonzentrationserhöhung, es reichen schon sehr geringe Mengen (50 µM) L-Histidin aus. In dem eingesetzten Produktionsmedium betrug das Verhältnis von L-Phenylalanin und L-Histidin 100:1. Die Wirksamkeit einer solch geringen Konzentration läßt eine eher „katalytische“ Funktion der Aminosäure L-Histidin vermuten. L-Histidin ist möglicherweise Bestandteil der für die Produktbildung wichtigen Enzyme und kann aufgrund seines komplexen Biosyntheseweges [Karlson et al. 1994] durch den Organismus gar nicht oder nur langsam synthetisiert werden.

Bei den untersuchten Kohlenstoffquellen war auffällig, daß Glucose bei Zusatz zu Marine Broth nicht nur die Produktbildung inhibiert, was als Katabolitrepression oft beobachtet wird [Rhodes u. Stanbury 1997], sondern auch das Wachstum. Dieses könnte damit erklärt werden, daß der Organismus aufgrund seines Lebensraumes im Meer an niedrige Substratkonzentrationen angepaßt ist.

Von den untersuchten Stickstoffquellen hat Harnstoff eine geringe und Ammonium eine starke Hemmwirkung auf die Produktbildung. Die Hemmung des Sekundärmetabolismus durch Ammonium ist in der Literatur beschrieben worden [Greasham und Herber 1997]. Mit Nitrat war die geringste Hemmung zu beobachten, was jedoch daran liegen kann, daß Nitrat nicht in den Stoffwechsel eingreift. Der nächste Verwandte vom Stamm T5, *R. gallaeciensis*, ist nicht in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren [Ruiz-Ponte et al. 1998]. Möglicherweise fehlt den Organismen die Nitrat-Reductase B [Schlegel 1992]. Bei Zusatz von Hefeextrakt zum definierten Phe/His-Medium, wurde das Wachstum verfünffacht, während die Produktkonzentration um 1/3 sank, was darauf hindeutet, daß besseres Wachstum die Produktbildung inhibiert, bzw. limitiertes Wachstum die Produktbildung verstärkt.

Wie Hefeextrakt fördert auch Phosphat das Wachstum, während es die Produktbildung inhibiert. Diese Auswirkung von Phosphat auf den Sekundärmetabolismus ist ebenso in der Literatur beschrieben worden, wie die schon erwähnte Sekundärmetabolithemmung durch Glucose und Ammonium [Greasham und Herber 1997].

Die Spurenelemente inhibieren sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung, wobei allerdings nicht klar ist, welches Spurenelement dafür verantwortlich ist. Diese inhibierende Wirkung kann von den Vitaminen aufgehoben werden, jedoch ist auch hier die Identität des verantwortlichen Vitamins unbekannt. Die Vitamine allein haben keine signifikante Wirkung auf Wachstum und Produktbildung.

Bei der Untersuchung zur Auswirkung der einzelnen Mineralsalze auf das Wachstum und die Produktbildung stellten sich Kalium, Magnesium und Sulfat als für die Produktbildung essentiell heraus. Wachstum war jeweils ohne die einzelnen Salze möglich, wenn auch schwächer. Die Funktion von Sulfat für die Produktbildung ist offensichtlich, da das Sulfat die einzige Schwefelquelle des Mediums darstellt und der Organismus den in der Tropodithiätsäure enthaltenden Schwefel folglich über die assimilatorische Sulfat-Reduktion aufnehmen muß. Diese Vermutung wird dadurch

bestätigt, daß der Zusatz der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein oder Methionin keine Auswirkung auf die Produktbildung erkennen ließen. Die Funktion von Kalium und Magnesium könnte die Aktivierung von Enzymen sein, die bei der Produktbildung beteiligt sind.

Durch Hemmtestversuche mit der Tropodithiolsäure [Brinkhoff et al. in Vorb.] wurde eine antibiotische Wirkung auch auf den Stamm T5 selbst beobachtet. Da die TDTA-Konzentration im Medium an der äußeren Grenze des Hemmhofes nicht bekannt ist, kann man keine Aussage über die Konzentration machen, ab der eine hemmende Wirkung in einer Flüssigkultur beginnen würde. Es kann lediglich festgestellt werden, *daß* die Tropodithiolsäure das Wachstum des Stammes T5 ab einer bestimmten Konzentration merklich beeinflusst. Während die Produktkonzentration im natürlichen Lebensraum durch die Verdünnung im Meerwasser nicht sehr hoch ansteigen kann, sind im Bioreaktor jedoch gerade hohe Produktkonzentrationen erwünscht, was dann zu einer Hemmung des Stammes T5 führen muß. Daher wären prozeßtechnische Maßnahmen sinnvoll, um die Produktkonzentration im Bioreaktor möglichst gering zu halten.

Als definiertes Produktionsmedium wurde aufgrund der aufgeführten Versuchsergebnisse ein Medium gewählt, daß neben den Mineralsalzen NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, Na₂SO₄ und NaHCO₃ mit einer Salinität von 32 g l⁻¹ nur die beiden Aminosäuren L-Phenylalanin (5 mM) und L-Histidin (0,05 mM) enthält.

Für die Vorkultur wurden statt der Aminosäuren Bactopepton (5 g l⁻¹) und Bacto-Hefeextrakt (1 g l⁻¹) eingesetzt, um für die Hauptkultur eine möglichst große Animpf-Zellkonzentration zu erhalten.

Als Nebenprodukte wurden Anthranilsäure und der Ethylester der Anthranilsäure identifiziert. Diese werden dann produziert, wenn L-Phenylalanin durch L-Tryptophan ersetzt wird. Da die Anthranilsäure ein Metabolit in der Tryptophan-Biosynthese ist, wird es sich hier um den Abbau des Tryptophans über das

Kynurenin handeln. In weiteren, hier nicht aufgeführten Versuchen wurde der Organismus in Medien kultiviert, die neben L-Histidin jeweils eine weitere Aminosäure enthielten. Tatsächlich wird die Tropodithiolsäure hauptsächlich mit L-Phenylalanin und die Anthranilsäure samt Ethylester mit L-Tryptophan gebildet. In den Medien, in denen die übrigen Aminosäuren enthalten waren, wurden nur geringe Konzentrationen dieser Verbindungen gemessen. Mit L-Methionin traten auf dem HPLC-Chromatogramm Signale auf, die sich von denen der anderen Aminosäuren unterschieden, so daß man mit L-Methionin möglicherweise noch weitere Produkte erhalten könnte.

Der Genetische Algorithmus (GA) wurde innerhalb dieser Optimierung eingesetzt, weil er eine interessante Alternative zu statistischen Optimierungsmethoden (z.B. Plackett-Burman-Methode, lateinisches Quadrat oder Box-Wilson-Methode) darstellt. Im Gegensatz zu den meisten statistischen Methoden ist die Suche nach einem Optimum beim GA durch den Einsatz von Wahrscheinlichkeitsrechnung und Zufallsgenerator variabler und unterliegt nicht einem linearen Modell. Dadurch kann man den GA auch bei Optimierungsproblemen einsetzen, bei denen ein globales Optimum von lokalen Optima umgeben ist, d.h. durch die Wahrscheinlichkeits- bzw. Zufallskomponente kann man ein lokales Optimum wieder verlassen und das globale finden. Aus dem gleichen Grund ist der Einfluß von Meßrauschen auf die Optimumsfindung geringer [Beste et al., Milavec et al. 2002].

In dem hier vorliegenden Fall hat der GA die Erwartungen nicht erfüllt, da die Aminosäuren, die keinen Einfluß auf die Produktbildung haben, komplett eliminiert, also auf Null gesetzt werden sollten. Wenn aber eine Aminosäure weder die Produkt- noch die Nebenproduktbildung beeinflusst, ist diese für den GA gar nicht erfaßbar, da die Güte eines Individuum nur durch die Produkt- und Nebenproduktkonzentration bewertet wird. Die Konzentration dieser Aminosäure wäre dann am Optimum rein zufällig. Das bedeutet, es hätte noch eine dritte Zielfunktion definiert werden müssen, z.B. die Minimierung der Gesamtaminosäurekonzentration [vgl. Weuster-Botz u. Wandrey 1995, Freyer 1996]. Dann wären die Individuen bevorzugt in die

nächste Generation übernommen worden, die eine hohe Produktkonzentration bei möglichst geringer Gesamtaminosäurekonzentration erzielt hätten. Aminosäuren, die keinen Einfluß auf die Produktkonzentration haben, müßten herausfallen.

4.4 Scale-up der Kultivierung im Bioreaktor

Bei den Untersuchungen zur Produktion der Tropodithiolsäure im Bioreaktor, wurde zunächst eine Fermentation mit dem Vollmedium Marine Broth als Referenz durchgeführt und dann die Fermentation mit dem entwickelten definierten Medium vom kleinen (1,5 l) in den größeren Maßstab (8 l, 100 l) übertragen.

Tab. 4.1 zeigt eine Zusammenstellung der vorgegebenen und erhaltenen Prozeßgrößen der Fermentationen und in Abb. 4.1 werden alle Wachstums- und Produktbildungskurven vergleichend dargestellt.

Tab. 4.1: Übersicht über die Fermentationen

Bioreaktor		1,5 l-FMT	1,5 l-FMT	Biostat C	Biostat D
Arbeitsvolumen	l	1,5	1,5	8	100
Medium Vorkultur		MB	Pepton/HE	Pepton/HE	Pepton/HE
Medium Hauptkultur		MB	Phe/His	Phe/His	Phe/His
Betriebsweise		Batch	Batch	Batch	Batch
Temperatur	°C	30	30	30	30
pH		7,5 (o./m.R.)	7,5 (o.R.)	7,5 (o.R.)	7,5 (o.R.)
Belüftungsrate	v/vm	0,5	0,3	0,5	0,25
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	300	300	300	200
Kultivierungsdauer	h	8	27	38	44
μ_{\max}	h ⁻¹	0,4	0,04	0,04	0,02
max. BTM	g l ⁻¹	0,45	0,33	0,35	0,19
max. Produktkonz.	µM	72	267	96	122
Gesamtproduktmasse	g	0,02	0,08	0,16	2,59
Verbrauch Phe	mM	0,5	2,8	2,7	2,0
$Y_{P/S}$	mol mol ⁻¹	0,20	0,11	0,04	0,06
$Y_{P/X}$	µmol g ⁻¹	260	1.161	417	763
q_P	µmol g ⁻¹ h ⁻¹	52	58	11	17

Der auffälligste Unterschied zwischen der Fermentation mit dem Vollmedium und den Fermentationen mit dem definierten Medium ist die sehr unterschiedliche maximale Wachstumsrate. Während μ_{\max} mit dem Vollmedium bei $0,4 \text{ h}^{-1}$ liegt, erreichen die maximalen Wachstumsraten mit dem definierten Medium nur höchstens $0,04 \text{ h}^{-1}$, also $1/10$ des ersten Wertes. Entsprechend unterschiedlich sind auch die Kultivierungszeiten. Mit dem Vollmedium erreicht die Kultur bereits nach 5 h die stationäre Phase, mit dem definierten Medium wachsen die Zellen über einen Zeitraum von 20 - 40 h scheinbar linear (tatsächlich ist bei logarithmischer Auftragung im ersten Teil der Fermentation exponentielles Wachstum zu erkennen, vgl. Abb. 4.1). Auch die Produktkonzentrationskurve ist bei der Fermentation mit dem Vollmedium erheblich steiler. Sie erreicht nach 5 h einen maximalen Wert von $72 \mu\text{M}$ und fällt danach wieder ab. Mit dem definierten Medium werden im 1,5 l-Bioreaktor nach 20 h $267 \mu\text{M}$ erreicht, bei der 8 und 100 l-Fermentation sind es nach ca. 40 h 96 bzw. $122 \mu\text{M}$. Das entspricht dem fast 4-, 1,3- bzw. 1,7-fachen der Konzentration, die bei der Kultivierung mit dem Vollmedium erzielt wurde, wenn auch in einer erheblich längeren Fermentationsdauer.

In Abb. 4.2 werden die Produkterträge und die spezifischen Produktbildungsraten miteinander verglichen.

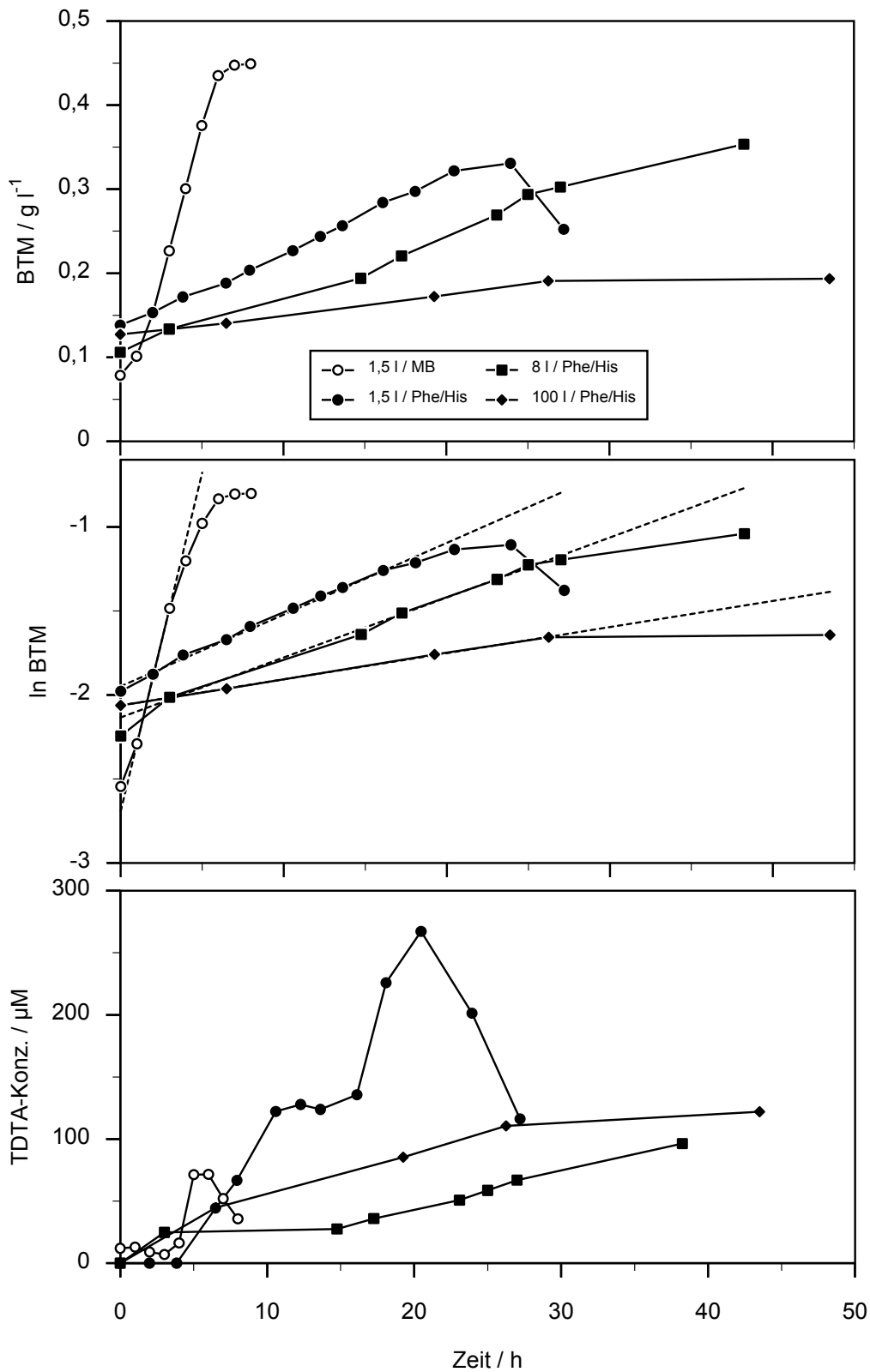


Abb. 4.1: Vergleich der Bioreaktor-Kultivierungen.

Die gestrichelten Linien in der logarithmischen Darstellung entsprechen den Steigungen der Wachstumskurven während der exponentiellen Wachstumsphase

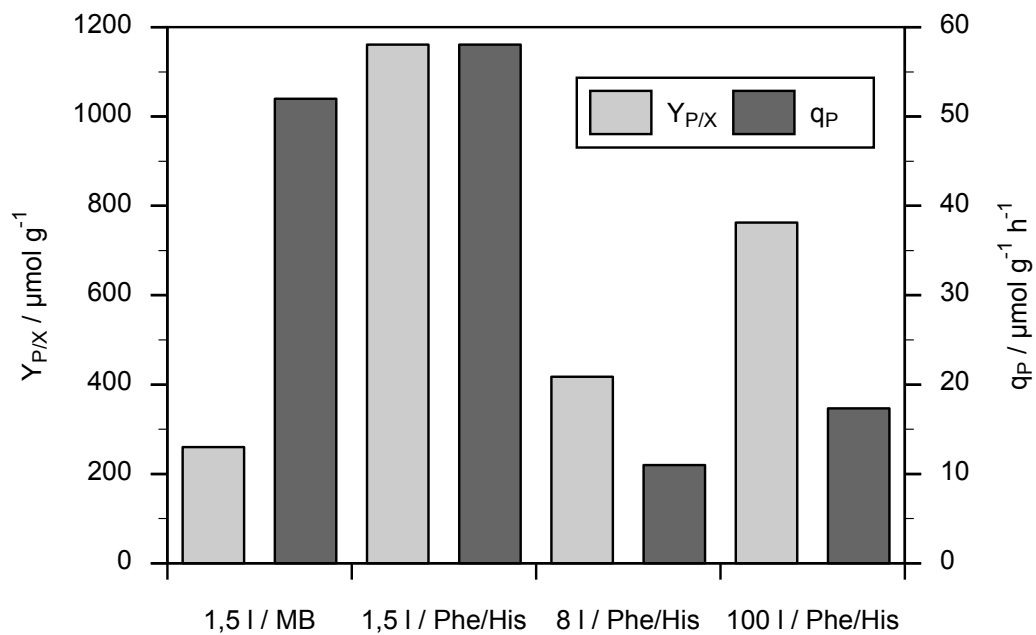


Abb. 4.2: Vergleich der Produkterträge und spez. Produktbildungsraten.

Der Produktertrag ist ein Maß für die gebildete Produktmenge bezogen auf die mittlere Biotrockenmassekonzentration, wodurch auf die Produktbildung einer einzelnen Zelle geschlossen werden kann. Beim Vergleich dieses Koeffizienten erkennt man, daß im definierten Medium die einzelne Zelle erheblich mehr produziert als im Vollmedium. In den 1,5 l-Ansätzen unterscheiden sich die Werte um den Faktor 4,5, im größeren Maßstab sind es immerhin noch Faktoren von 1,6 und 3. Berücksichtigt man außerdem die Dauer der Kultivierung, erhält man die spezifische Produktbildungsrate. Im direkten Vergleich der 1,5 l-Ansätze mit Voll- und definiertem Medium ist das definierte Medium nur noch um den Faktor 1,1 besser. Die Fermentationen im größeren Maßstab haben geringere spez. Produktbildungsraten.

Eine zusammenfassende Betrachtung dieses Vergleiches zeigt, daß mit dem Vollmedium eine schnellere Produktbildung und vor allem ein erheblich schnelleres Wachstum möglich ist, was mit der Verfügbarkeit eines großen Aminosäureangebotes zusammenhängt. Mit dem definierten Medium ist nur sehr geringes Zellwachstum und eine damit verbundene niedrige Produktbildungsrate

vorhanden. Dafür wird aber bei geringerer Bildung von Nebenprodukten eine bis zu 4-fach höhere Produktendkonzentration erreicht. Außerdem ist die Produktmenge pro Zelle erheblich höher, weshalb bei Einsatz des definierten Mediums eine hohe Produktivität durch eine hohe Animpf-Zellkonzentration möglich sein sollte. Der Prozeß müßte also in zwei Stufen erfolgen, in der ersten würde eine hohe Biomassekonzentration mittels eines komplexen Mediums erzeugt, und in der zweiten würde das L-Phenylalanin durch die Zellen zu Tropodithiolsäure umgesetzt.

Das „Scale-up“ der Batch-Fermentation hat gezeigt, daß der Prozeß grundsätzlich in einen größeren Maßstab übertragbar ist. In den Tendenzen der gemessenen Prozeßgrößen (pO_2 , pH) haben sich keine gravierenden Unterschiede ergeben, nur die erzielten Produktkonzentrationen waren im 8 und 100 l-Maßstab geringer als bei 1,5 l, wobei die 100 l-Fermentation noch bessere Ergebnisse geliefert hat, als die 8 l-Fermentation. Bei Vergleich der absoluten Produktmengen (vgl. Tab. 4.1), die man aus den Fermentationen hätte isolieren können, erkennt man jedoch, daß die Kultivierung im großen Maßstab für die Gewinnung ausreichender Produktmengen sinnvoll ist.

In den 1,5 l-Ansätzen mit dem Voll- und dem definierten Medium ist die Produktkonzentration zum Ende der Fermentation wieder schnell abgefallen, was auf einen Abbau des Produktes hindeutet. Um dieses zu verhindern, muß entweder die Fermentation rechtzeitig abgebrochen werden, oder das Produkt muß kontinuierlich aus dem Bioreaktor entfernt und aufgearbeitet werden.

4.5 Optimierung der Produktaufarbeitung

Für einen Produktionsprozeß spielt die Aufarbeitung der Kulturflüssigkeit eine entscheidende Rolle, da nur durch eine effektive Aufarbeitung der größte Teil des im Bioreaktor produzierten Produktes später als Reinsubstanz vorliegen wird. Während die Solventextraktion („Ausschütteln“) im kleinen Maßstab bis zu wenigen Litern eine gute und effektive Methode darstellt, ist im größeren Maßstab (100 l) die

Abtrennung über einen Adsorberharz in einer Säule vor allem bezüglich benötigter Lösemittelmengen vorteilhafter. Große Lösemittelmengen (mehrere 100 l) stellen ein gesundheitliches ebenso wie umwelt- und sicherheitstechnisches Risiko dar, und außerdem werden teure Apparate für die Extraktion und Rückgewinnung benötigt.

Ein Vergleich zwischen der Solventextraktion mit Ethylacetat und der Produktabtrennung mit dem Adsorberharz Amberlite[®] XAD-16 zeigt eine etwas geringere Effektivität des Adsorberharzes, die aber aus den oben genannten Gründen hingenommen wird. Neben Amberlite[®] XAD-16 wurden drei weitere Adsorberharze getestet, von denen Amberlite[®] XAD-7 eine etwas bessere, Amberlite[®] XAD-4 und Toyopearl[™] Butyl-650 M aber erheblich schlechtere Effektivitäten besitzen. Den hydrophoben Harzen Amberlite[®] XAD-4, XAD-7 und XAD-16 liegt das Prinzip der Adsorptionschromatographie zugrunde. Sie unterscheiden sich jedoch in der Vernetzung (XAD-4, XAD-16: aromatisch - XAD-7: aliphatisch) und im Porendurchmesser (XAD-4: 40 Å - XAD-7, XAD-16: 90 bzw. 100 Å). Die geringere Ausbeute bei Amberlite[®] XAD-4 könnte daher mit dem kleinen Porendurchmesser zusammenhängen, wenn die Produktmoleküle nur schwer oder gar nicht in die Poren gelangen können und so nur die äußere Oberfläche für eine Bindung zur Verfügung steht. Das Harz Toyopearl[™] Butyl-650 M funktioniert auf der Basis der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) und unterscheidet sich von den anderen Harzen erheblich in der Partikelgröße (Faktor ca. 10), wodurch der Einsatz im „expanded bed“ nicht möglich wäre. Die niedrigere Ausbeute dieses Harzes könnte mit einer geringeren Wechselwirkung der Produktmoleküle mit der Harzmatrix zusammenhängen.

Grundsätzlich käme für die Abtrennung der Tropodithiätsäure aufgrund der Säuregruppe auch ein Anionenaustauscher in Betracht, der das Produkt durch die gegenüber hydrophoben Wechselwirkungen größere Bindungsenergie der ionischen Bindung stärker bindet und damit wahrscheinlich eine größere Effektivität

ermöglichen würde. Da die Produktaufarbeitung aber auch auf andere Produkte, die einen reinen hydrophoben Charakter haben, angewendet werden soll, wurde ein nicht-ionisches Harz eingesetzt.

Wegen einer höheren Temperaturstabilität wurde das Amberlite[®] XAD-16 zur weiteren Produktaufarbeitung ausgewählt, da es zum sterilen Einsatz in einer im Fermentersystem integrierten Produktabtrennung autoklaviert werden kann.

Während das Produkt bei kleineren Kulturvolumina nach dem Eluieren und Einengen des Lösemittels mit einer Kieselgelsäule weiter aufgereinigt werden konnte, war im Rohextrakt der 100 l-Fermentation kein Produkt mehr nachzuweisen. Statt dessen sind andere Peaks im HPLC-Chromatogramm zu beobachten, die auf einen Abbau bzw. eine Umwandlung des Produktes in andere Substanzen hindeuten. Der Unterschied der Produktaufarbeitung dieses großen Kulturvolumens gegenüber den kleineren Volumina ist die größere Zeitspanne, d.h. das Produkt verblieb fast die doppelte Zeit in der Säule (ca. 22 h) und auch erheblich länger bei ca. 37 °C im Kolben des Rotationsverdampfers. Das Produkt wird wahrscheinlich an der Disulfid-Brücke, die leicht reduktiv spaltbar ist [Beyer und Walter 1991], mit anderen Molekülen reagieren, wobei diese Reaktionen durch hohe Konzentrationen in der Säule und im Kolben am Rotationsverdampfer begünstigt werden.

Als Lösung des Problems gibt es mehrere Möglichkeiten:

1. Die Zeit, die das Produkt auf der Säule und im Kolben verbringt, muß möglichst kurz gehalten werden, was eine chargenweise Aufarbeitung bedeuten würde, wodurch der gesamte Arbeits- und Zeitaufwand durch mehrfaches Spülen, Eluieren und Einstellen des Fließbettes jedoch erheblich zunehmen würde.
2. Die Temperatur während der Säulenextraktion und im Kolben am Rotationsverdampfer muß möglichst niedrig gewählt werden, um die Reaktionsgeschwindigkeiten der Ab-/Umbaureaktionen niedrig zu halten.

3. Es müssen andere Säulenmaterialien, z.B. ein Anionenaustauscher, getestet werden, da das Produktmolekül durch eine andere Bindungscharakteristik bei einem anderen pH-Wert möglicherweise stabilisiert wird.
4. Es muß getestet werden, ob für die Aufarbeitung dieses Produktes eine Solventextraktion sinnvoller ist.

4.6 Aufbau eines kontinuierlichen Produktionsprozesses

Bei vorhandener Prozeßstabilität liegt der Vorteil eines kontinuierlichen Produktionsprozesses in geringen Ausfallzeiten der Produktionsanlage, die beim satzweisen Betrieb für die Reinigung, die Sterilisation und das Anwachsen der Kultur anfallen.

Ein Chemostat hätte Vorteile durch geringe Substrat- und Produktkonzentrationen, durch die Inhibierungen verhindert werden könnten, und konstante Bedingungen im Gleichgewichtszustand, wodurch eine gleichbleibende Produktqualität gesichert wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz des Chemostaten untersucht. Der Prozeß stellte sich jedoch als nicht stabil heraus. Bei einer vorgegebenen Verdünnungsrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ wurde eine Wachstumsrate von nur $0,05 \text{ h}^{-1}$ gemessen, d.h. obwohl die Verdünnungsrate weit unter der maximalen Wachstumsrate lag, konnte der Organismus die erforderliche Wachstumsrate nicht erreichen. Ursache für die geringe Wachstumsrate könnte die Tropodithiätsäure sein, die, wie schon weiter oben dargestellt, das Wachstum des Stammes T5 inhibieren kann.

Die Beobachtung, daß die Zellen in älteren Kulturen und gerade auch in der späten Chemostat-Kultur ihre Morphologie ändern, ist ein weiteres Indiz für eine mögliche Wirkung des Produktes auf den Organismus. Bei einer Mutante des Stammes T5, die

kein Produkt bildet, war eine so starke Änderung der Morphologie nicht zu beobachten, was die Vermutung zuläßt, daß durchaus ein Zusammenhang zwischen dem Produkt und der Änderung der Zellmorphologie bestehen könnte.

Um ein Auswaschen der Zellen in der kontinuierlichen Kultur zu verhindern, wurden die Zellen in LentiKats[®] immobilisiert. LentiKats[®] bestehen aus Polyvinylalkohol, einem Polymer, das biologisch verträglich und gleichzeitig chemisch und mechanisch sehr stabil ist. Durch die Linsenform wird der Stofftransport in den Immobilisaten aufgrund kleiner Diffusionswege begünstigt. Bei mit diesem System immobilisierten Pilzzellen wurde ein unsteriler kontinuierlicher Produktionsprozeß über mehrere Wochen aufrechterhalten [Welter 2000]. Als Nachteile müssen die etwas komplizierte und zeitaufwendige Herstellung der Immobilisate im Labor und die Eigenschaft der Immobilisate, an glatten Oberflächen nach dem Prinzip eines Saugnapfes kleben zu bleiben, angeführt werden.

Bei einem repeated-batch-Versuch im Schüttelkolben zeigte sich, daß der Stamm T5 auch in immobilisierter Form die Tropodithiolsäure produziert. Die Produktkonzentration stieg nach einer lag-Phase zunächst steil an und strebte dann aber einem Grenzwert entgegen, was erneut vermuten läßt, daß entweder eine Limitierung oder eine Produktinhibierung vorliegt. Bei Austausch des Mediums durch frisches Medium stieg die Produktkonzentration nach einer lag-Phase mit im Vergleich zum ersten Versuchsabschnitt nahezu gleicher Geschwindigkeit an und nahm dann nach Überschreiten eines Maximums erneut ab. Die Zellen hatten das Vermögen zur Produktbildung also nicht verloren, sondern es muß sich tatsächlich, wie schon mehrfach erwähnt, um eine Limitierung durch Edukte oder eine Hemmung durch Produkte handeln.

In Tab. 4.2 werden die Fermentationen von immobilisierten und nicht immobilisierten Zellen miteinander verglichen.

Tab. 4.2: Fermentation ohne/mit Immobilisierung

Bioreaktor		1,5 I-FMT	1,5 I-FMT
Arbeitsvolumen	l	1,5	1
Medium Vorkultur		Pepton/HE	Pepton/HE
Medium Hauptkultur		Phe/His	Phe/His
Betriebsweise		Batch	Batch, immobilisierte Zellen
Temperatur	°C	30	30
pH		7,5 (o.R.)	7,5
Belüftungsrate	v/vm	0,3	0,5
Rührerdrehzahl	min ⁻¹	300	300
Kultivierungsdauer	h	27,2	59,6
$\mu_{\max} / \mu_{\text{linear}}$	h ⁻¹ / mg l ⁻¹ h ⁻¹	0,04	1,2
max. BTM	g l ⁻¹	0,33	0,119
max. Produktkonz.	μM	267	132
Verbrauch Phe	mM	2,8	1,7
$Y_{P/S}$	mol mol ⁻¹	0,11	0,08
$Y_{P/X}$	μmol g ⁻¹	1.161	1.562
q_P	μmol g ⁻¹ h ⁻¹	58	26

Die immobilisierten Zellen erreichen nach der doppelten Kultivierungsdauer nur die halbe Produktkonzentration, die mit 132 μM jedoch noch über denen der 8 und 100 l-Fermentation liegt. Unter Berücksichtigung der vorhandenen Biomasse (bei der aus meßtechnischen Gründen kein Wachstum in den Immobilisaten eingerechnet wurde) ergibt sich jedoch ein höherer Produktertrag der immobilisierten Zellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß eine Erhöhung der Biomasse im Reaktor zu einer Erhöhung der Produktkonzentration und der Produktbildungsrate führen müßte. Die Erhöhung der Biomasse kann sowohl durch eine höhere Immobilisatdichte im Bioreaktor als auch durch eine höhere Beladung der Immobilisate erreicht werden. Dabei müssen natürlich Stofftransportlimitierungen im Bioreaktor und in jedem einzelnen Immobilisat berücksichtigt werden. Bei Kenntnis der optimalen Biomassekonzentration müßte dann eine Produktion in „repeated-batch“- oder kontinuierlicher Betriebsweise möglich sein.

Durch eine im Fermentersystem integrierte Produktabtrennung kann die Produktkonzentration im Bioreaktor gering gehalten werden, wodurch eine Produktinhibierung verhindert wird [Maass et al. 2002, Serrano-Carreón et al. 2002]. Neben der Unterdrückung dieser Einwirkung des Produktes auf die Regulation von Wachstum und Produktbildung kann die kontinuierliche Entfernung des Produktes auch durch die Verschiebung des chemischen Gleichgewichtes der beteiligten Reaktionen zugunsten des Produktes eine Erhöhung der erzielbaren Produktmenge bewirken. Im Falle des Einsatzes eines Adsorber- oder Austauscherharzes könnte die Bindung des Produktes an eine Matrix außerdem auch zur Stabilisierung des Produktes beitragen.

Aus diesen Gründen wurde eine Adsorberharzsäule in einem externen Extraktionskreislauf an den Bioreaktor angeschlossen. Die Produktabtrennung durch dieses System hat funktioniert, die Produktkonzentration im Bioreaktor fiel innerhalb weniger Stunden auf Null ab. Eine erneute Produktbildung war jedoch nicht zu beobachten, obwohl die Biotrockenmassekonzentration in der Kulturflüssigkeit wieder zunahm, Zellwachstum also noch vorhanden war. Dieses könnte daran liegen, daß das Substrat oder andere für die Produktbildung erforderliche Substanzen ebenfalls an das Adsorberharz gebunden werden und dem Organismus nicht mehr zur Verfügung stehen. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß L-Phenylalanin nur teilweise an das Harz gebunden wird und somit wahrscheinlich nicht die limitierende Komponente ist, zumal am Ende der Fermentation noch über 4 mM L-Phenylalanin gemessen wurden. Nicht bekannt ist jedoch, in wieweit das für die Produktbildung außerdem notwendige L-Histidin an das Adsorberharz gebunden wird. Dieses müßte durch Konzentrationsmessungen genauer untersucht werden. Nach Eluierung der Säule war im erhaltenen Rohextrakt jedoch auch kein Produkt zu messen. Da dieses schon bei der Aufarbeitung der 100 l-Fermentation beobachtet wurde gelten die im Abschnitt 4.5 gemachten Bemerkungen und möglichen Problemlösungen entsprechend.

Insgesamt wäre der Einsatz eines spezifischer auf das Produkt abgestimmten Extraktionssystems wünschenswert, im Idealfall in Form einer Affinitätschromatographie.

4.7 Fazit und Ausblick

Durch den Einsatz des definierten Mediums wird sowohl die Bildung von Nebenprodukten verringert, als auch die spezifische Produktbildung erhöht. Die in den vorgestellten Fermentationen geringeren Produktivitäten könnten durch eine größere Biomassekonzentration zu Beginn der Kultivierung erhöht werden. Die mit immobilisierten Zellen erzielten Produktkonzentrationen sind mit den erzielten Produktkonzentrationen nicht immobilisierter Zellen vergleichbar. Die Produktabtrennung aus dem Medium muß jedoch noch weitgehender untersucht und andere Extraktionssysteme müssen getestet werden. Das Hauptproblem liegt zu diesem Zeitpunkt nicht bei der Fermentation, sondern bei der Produktaufarbeitung. Kann dieses Problem gelöst werden, müßte eine kontinuierliche Produktion mit immobilisierten Zellen in einem definierten Medium und einer integrierten Produktabtrennung möglich sein.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Produktion der Tropodithiätsäure durch den Stamm T5 optimiert und eine Maßstabsvergrößerung ermöglicht werden.

Dazu wurden zuerst die Temperatur, der pH-Wert und die Salinität in Bezug auf das Wachstum und die Produktbildung optimiert. Dann wurde ein definiertes Produktionsmedium entwickelt und dessen Einsatz im Bioreaktor vom 1,5 l- bis zum 100 l-Maßstab untersucht. Außerdem wurde versucht, die Produktaufarbeitung zu optimieren und im Maßstab zu vergrößern, und schließlich wurde der Einsatz immobilisierter Zellen und einer integrierten Produktabtrennung untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Das Temperaturoptimum liegt bei 30 °C, das pH-Optimum bei pH 7,5 und die optimale Salinität bei ca. 30 g l⁻¹.
2. Der Organismus benötigt zum Wachsen keine essentiellen Vitamine oder Aminosäuren. Am schnellsten werden die Aminosäuren L-Asparaginsäure, L-Glutamin und L-Glutaminsäure abgebaut und das beste Wachstum wird mit D(+)-Glucose, D(+)-Galactose, D(-)-Mannit, Saccharose, Maltose oder Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle erzielt.
3. Das definierte Produktionsmedium enthält nur die Mineralsalze NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ und NaHCO₃ und die beiden Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Histidin. L-Phenylalanin wird als Substrat genutzt, während L-Histidin nur in einer minimalen Konzentration notwendig ist. Zusätze, die das Wachstum fördern, inhibieren die Produktbildung (Hefeextrakt, Phosphat). Das Produkt selber inhibiert das Wachstum (Produktinhibierung) und möglicherweise auch die Produktbildung.

4. Gegenüber einem Vollmedium ist das Wachstum und die Produktbildung mit dem definierten Medium erheblich langsamer. Es werden jedoch neben der Bildung von weniger Nebenprodukten höhere Endkonzentrationen und eine höhere spezifische Produktbildung erreicht, wodurch vermutet werden kann, daß für die geringe Produktivität mit dem definierten Medium nur die geringe Zellkonzentration verantwortlich sein könnte.
5. Eine Kultivierung im Chemostat war bisher nicht möglich, da sich kein stabiler Zustand eingestellt hat. Dieses wurde vermutlich durch die Produktinhibierung verursacht.
6. Die Produktion durch in LentiKats[®] immobilisierten Zellen ist möglich und mit jener der nicht-immobilisierten Zellen vergleichbar.
7. Eine integrierte Produktabtrennung mit einem externen Kreislauf durch eine Adsorbersäule (Amberlite[®] XAD-16) ist möglich. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß keine weitere Produktbildung mehr statt fand und im Eluat der Säule kein Produkt meßbar war.
8. Die Produktaufarbeitung mit einer Adsorbersäule (Amberlite[®] XAD-16) funktioniert im kleinen Maßstab. Bei der Bindung des Produktes an das Harz über längere Zeit (>12 h) finden Ab- oder Umbaureaktionen statt, so daß im Rohextrakt kein Produkt mehr zu finden ist.

Auf weitere Sicht müßte hauptsächlich die Aufarbeitung des Produktes optimiert werden. Bei Einsatz einer effektiven Methode zur Produktabtrennung, die in das Fermentationssystem integrierbar ist, müßte eine kontinuierliche Produktion mit immobilisierten Zellen möglich sein.

6 Literatur

Beste, H. ; Freyer, S. ; Weuster-Botz, D. and Wandrey, C. Nährmedienoptimierung mit dem Programm GALOP.

Beyer, H. and Walter, W. (1991). Lehrbuch der organischen Chemie. Hirzel Verlag, Stuttgart.

Brinkhoff, T. et al. in Vorbereitung

Davidson, S. ; Allen, S. ; Lim, G. ; Anderson, C. and Haygood, M. (2001). Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula seratula*" of the bryozoan *Bugula neritina*. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4531-4537.

Demain (2000). Small bugs, big business: The economic power of the microbe. Biotechnol. Adv. **18**: 499-514.

Demain, A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotech. **52**: 455-463.

Demain, A.L. and Solomon, N.A. (1986). Manual for industrial microbiology and biotechnology. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

Fenical, W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chem. Rev. **93**: 1673-1683.

Fenical, W. and Jensen, P.R. Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. Plenum Press New York 1993.

Freyer, S. (1996). Rechnergestützte Nährmedienoptimierung. Dissertation. Universität Köln.

Greasham, R.L. Media for Microbial Fermentation. VCH-Verlag Weinheim 1993.

Jensen, P.R. and Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria. Annual Review of Microbiology **48**: 559-584.

Karlson, P. ; Doenecke, D. and Koolman, J. (1994). Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart.

Kawano, Y. ; Asada, M. ; Inoue, M. ; Nakagomi, K. ; Oka, S. and Higashihara, T. (1998). Biological activity of thiotropocin produced by marine bacterium, *Caulobacter* sp. PK654. J. Mar. Biotechnol. **6**: 49-52.

Kawano, Y. ; Nagawa, Y. ; Nakanishi, H. ; Nakajima, H. ; Matsuo, M. and Higashihara, T. (1997). Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities. J. Mar. Biotechnol. **5**: 225-229.

Kintaka, K. ; Ono, H. ; Tsubotani, S. ; Harada, S. and Okazaki, H. (1984). Thiotropocin, a new sulfur-containing 7-membered-ring antibiotic produced by a *pseudomonas* sp. J. Antibiot. **37**(11): 1294-1300.

Lafay, B. ; Ruimy, R. ; Rausch de Traubenberg, C. ; Breittmayer, V. ; Gauthier, M.J. and Christen, R. (1995). *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. Int. J. of Syst. Bacter. **45**(2): 290-296.

Lang, S. ; Wagner-Döbler, I. ; Beil, W. ; Meiners, M. and Laatsch, H. (2002). Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. **74**: 207-238.

Liang, L. et al. in Vorbereitung

Maass, D. ; Gerigk, M. ; Kreutzer, A. ; Weuster-Botz, D. ; Wubbolts, M. and Takors, R. (2002). Integrated L-phenylalanine separation in an *E. coli* fed-batch process: From laboratory to pilot scale. *Bioprocess Biosyst Eng* **25**: 85-96

Marwick, J.D. ; Wright, P.C. and Burgess, J.G. (1999). Bioprocess Intensification for Production of Novel Marine Bacterial Antibiotics Through Bioreactor Operation and Design. *Marine Biotechnology* **1**: 495-507.

Mietzsch, A. ; Gabrielczyk, T. ; Kuhrt, M. ; Levermann, J. ; Serrano, P. and Szentpétery, V. (2002). Geheimnis der chinesischen Medizin wird entschlüsselt. *transkript* **6**: 28.

Milavec, P. ; Podgornik, A. ; Stravs, R. and Koloini, T. (2002). Effect of experimental error on the efficiency of different optimization methods for bioprocess media optimization. *Bioprocess Biosyst Eng* **25**: 69-78

Möllney, M. ; Freyer, S. ; Wichert, W. and Weuster-Botz, D. GALOP-Programmdokumentation.

Munro, M. ; Blunt, J. ; Dumdei, E. ; Hickford, S. ; Lill, R. ; Li, S. ; Battershill, C. and Duckworth, A. (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* **70**: 15-25.

Parekh, S. ; Vinci, V.A. and Strobel, R.J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotech.* **54**: 287-301.

Riguera, R. (1997). Isolating bioactive compounds from marine organisms. *J. Mar. Biotechnol.* **5**: 187-193.

Ruiz-Ponte, C. ; Cilia, V. ; Lambert, C. and Nicolas, J.L. (1998). *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int. J. of Syst. Bacter.* **48**: 537-542.

Schlegel, H. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.

Serrano-Carreón, L. ; Balderas-Ruíz, K. ; Galindo, E. and Rito-Palomares, M. (2002). Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 170-174

Shiba, T. *The Genus Roseobacter*. Springer Verlag Berlin 1992.

Sponga, F. ; Cavaletti, L. ; Lazzarini, A. ; Borghi, A. ; Ciciliato, I. ; Losi, D. and Marinelli, F. (1999). Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. Biotechnol.* **70**: 65-69.

Tsubotani, S. ; Wada, Y. ; Kamiya, K. ; Okazaki, H. and Harada, S. (1984). Structure of thiotropocin, a new sulfur-containing 7-membered antibiotic. *Tetrahedron Letters* **25**(4): 419-422.

Uchino, Y. ; Hirata, A. ; Yokota, A. and Sugiyama, J. (1998). Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**: 201-210.

Watve, M. ; Tickoo, R. ; Jog, M. and Bhole, B. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch. Microbiol. **176**: 386-390

Welter, K. (2000). Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen. Dissertation. Technische Universität Braunschweig

Weuster-Botz, D. and Wandrey, C. (1995). Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase. Process Biochem. **30**(6): 563-571.

Zhang, J. and Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. Appl. Microbiol. Biotech. **51**: 407-421.

7 Anhang

7.1 Korrelation Biotrockenmasse - Optische Dichte

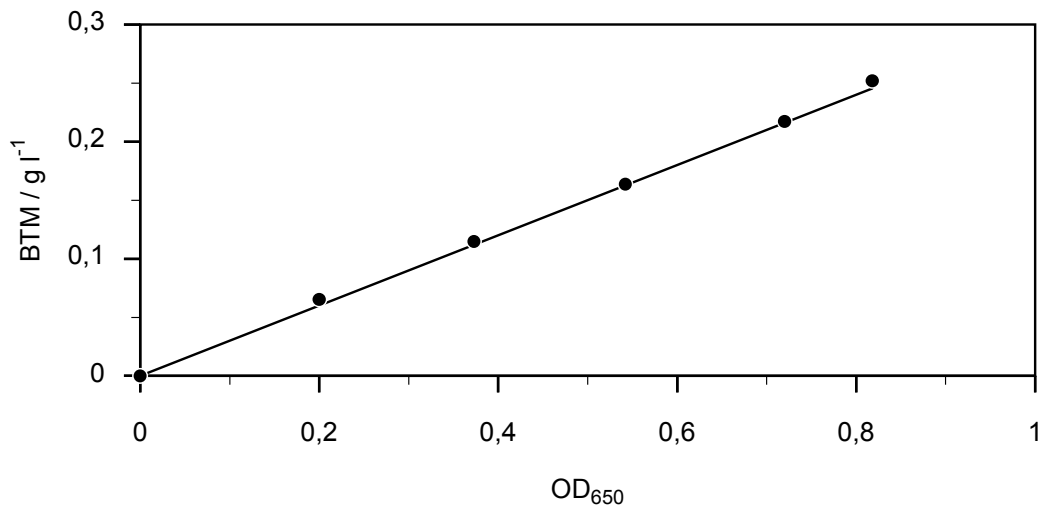


Abb. 7.1a: Korrelation Biomasse - Optische Dichte mit Marine Broth.
(BTM = 0,3 OD)

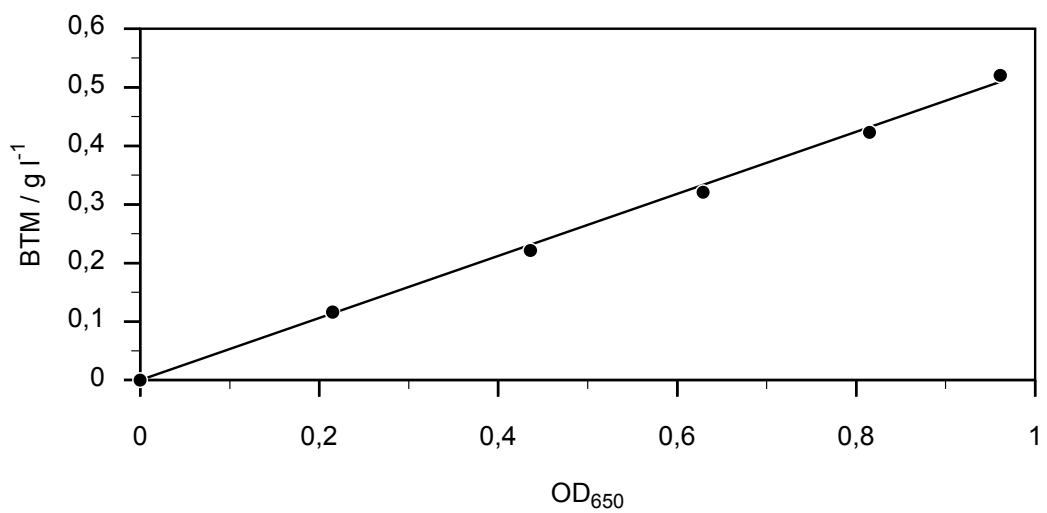


Abb. 7.1b: Korrelation Biomasse - Optische Dichte mit Medium „Vorkultur“.
(BTM = 0,53 OD)

7.2 Kalibriergeraden für die HPLC

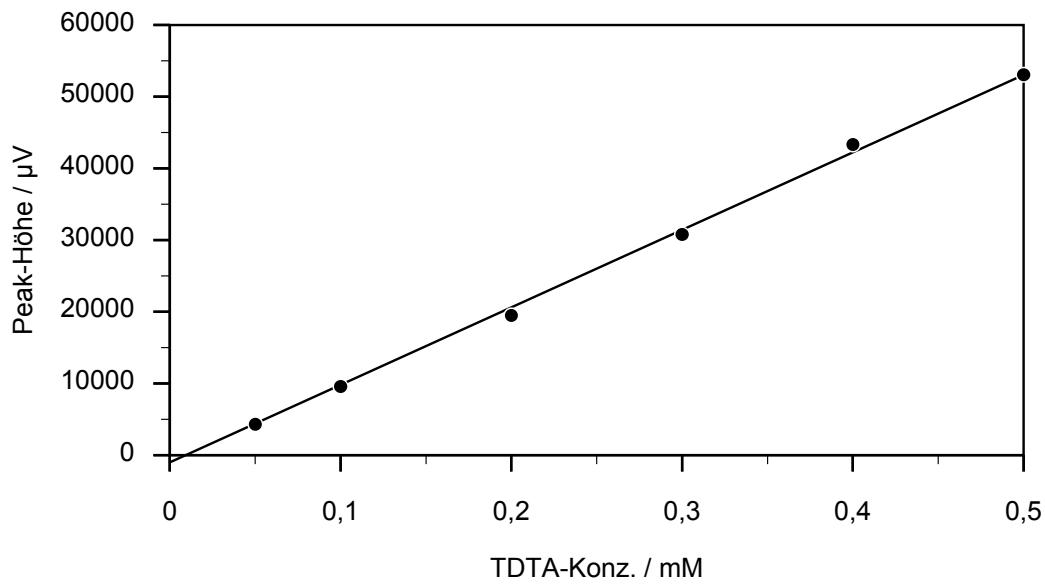


Abb. 7.2a: Kalibriergerade für die Produktkonzentrationsbestimmung.
(TDTA-Konz. = (Peak-Höhe+1000)/108096)

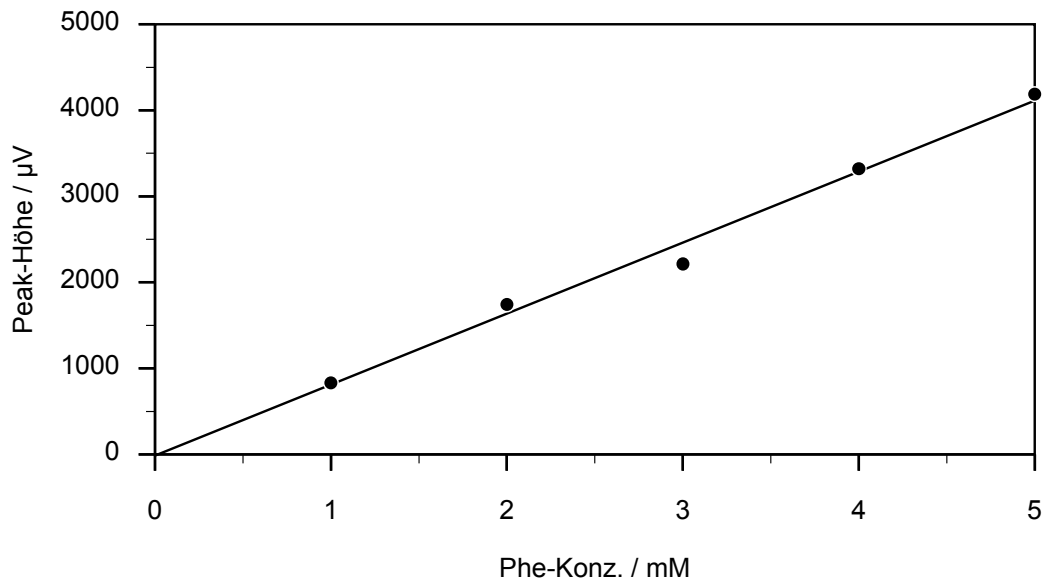


Abb. 7.2b: Kalibriergerade zur Bestimmung der L-Phenylalanin-Konzentration.
(Phe-Konz. = (Peak-Höhe+14)/825)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Meiners danke ich für die Überlassung der interessanten Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gute Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. T. Scheper danke ich für die Übernahme des Hauptreferates.

Dem Land Niedersachsen danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Forschungsschwerpunktes Meeresbiotechnologie danke ich besonders Herrn Dr. T. Brinkhoff (Universität Oldenburg), Frau Dr. G. Bach und Frau L. Liang (beide Universität Göttingen). Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen Herrn Prof. Dr. J. Cai, Herrn Dr. H. Schünke, Herrn B. Kopke und Frau B. Ritzka danke ich für die gute Zusammenarbeit in Labor und Büro und Frau R. Sanders-Janssen für die Unterstützung seitens der Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, Standort Emden.

Den Mitarbeitern des Forschungszentrums Terramare und der Meeresstation des ICBM der Universität Oldenburg danke ich für die Hilfe bei technischen und organisatorischen Problemen.

Herrn Prof. Dr. Laatsch und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung beim Aufbau der Produktaufarbeitung und Dr. Hans-Peter Grossart für die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC.

Schließlich danke ich meiner Frau Karen und meinen Eltern, die immer für mich da waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Heidorn
Geburtsdatum: 14. August 1970
Geburtsort: Ebingen / Baden-Württemberg
Familienstand: verheiratet mit Karen Heidorn

Bildungsgang:

8 / 1976 - 5 / 1989 Schulausbildung; Abschluß: allg. Hochschulreife
6 / 1989 - 5 / 1993 Soldat auf Zeit bei der Marine
10 / 1993 Beginn des Studiums „Biotechnologie“ an der
Technischen Universität Braunschweig
1 - 3 / 1998 Studienarbeit am MPI für marine Mikrobiologie, Bremen
7 / 1998 - 3 / 1999 Diplomarbeit am MPI für marine Mikrobiologie, Bremen
3 / 1999 Abschluß des Biotechnologiestudiums
4 / 1999 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der
Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven
und Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

Eidesstattliche Versicherungen

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die hier vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie gegebenenfalls die zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Außerdem versichere ich an Eides statt, daß die hier vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Wilhelmshaven, 24.6.2002