

**Reaktionstechnische Optimierung der  
Ergotalkaloidproduktion bei *Claviceps purpurea***

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

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

genehmigte  
**Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Miriam Menge  
geboren am 22.03.1972  
in Peine

Hannover, im Januar 2000

Referent:	Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent:	Prof. em. Dr. Dr. h. c. K. Schügerl
Tag der Promotion:	28.01.2000

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

Hannover, im Januar 2000

---

(Miriam Menge)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis Dezember 1999 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover durchgeführt. Für die Leitung und Betreuung der Arbeit sowie die mir gegebenen Möglichkeiten möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken.

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

Bei allen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Technische Chemie bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Joydeep Mukherjee für seinen unermüdlichen Einsatz, seine überragende Hilfsbereitschaft und seinen „Beistand“ bei den *Claviceps* Kultivierungen,

Daniela Boehl für die sehr gute Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeit und bei späteren Fluoreszenzmessungen,

Stefan Marose für die sehr große Hilfe und die Zusammenarbeit bei den Fluoreszenzmessungen,

Michael Dors für die Entwicklung der Regelung der Wasserstoffperoxid-Zugabe und seine Hilfe bei allen RISP-Problemen,

allen Mitarbeitern der institutseigenen Werkstatt für den Bau des Edelstahlfermenters und die schnelle Hilfe bei jeder Art von Problemen,

Martina Weiß für die stetige Hilfe bei aller Art von Problemen,

Torsten Müller für die vielen anregenden Diskussionen und die sehr gute Zusammenarbeit im Labor,

allen Mitarbeitern in der Bibliothek für das hervorragende, freundschaftliche Klima,

Daniela Boehl, Tanja Brinschwitz und Torsten Müller für das Korrekturlesen dieser Arbeit,

allen Freunden und besonders meiner Familie, die mich während des Studiums begleitet und später im oftmals streßigen Kultivierungsalltag stets unterstützt und motiviert haben.

## Abstract

Miriam Menge

### **Reaktionstechnische Optimierung der Ergotalkaloidproduktion bei *Claviceps purpurea***

Die Submerskultivierung des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* zur Produktion der pharmazeutisch wichtigen Ergotalkaloide besitzt einen hohen wirtschaftlichen Stellenwert. Ein Hauptproblem dabei ist jedoch die ausreichende Sauerstoffversorgung des Pilzes während der Kultivierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei alternative Verfahren zur Sauerstoffversorgung bei Kultivierungen von *Claviceps purpurea* im Rührkesselreaktor entwickelt und erfolgreich angewendet. Dabei wurde die konventionelle Begasung mit Druckluft durch Zugabe von Wasserstoffperoxid oder durch den Einsatz von perfluorierten Kohlenwasserstoffen unterstützt.

Für die Optimierung des 2L-Rührkesselreaktorssystems wurden verschiedene Rührer getestet, wobei Paddelrührer aufgrund der geringeren Scherwirkung zu höheren Biomassen und Alkaloidkonzentrationen im Medium führten. Durch den Einsatz eines Antischaummittels konnten sowohl das Wachstum als auch die Produktion der Alkaloide um das drei- bzw. fünffache gesteigert werden. Es zeigte sich, daß bei zwei unter denselben Bedingungen durchgeführten Fermentationen große Unterschiede bezüglich der Ausbeuten auftraten.

In drei Kultivierungen wurde Wasserstoffperoxid zum Medium gegeben, wobei der Einsatz von Mangandioxid ( $\text{MnO}_2$ ) als Katalysator für eine schnellere Spaltung des Peroxids notwendig war. Die Zugabe der Wasserstoffperoxid-Lösung erfolgte mit Hilfe eines für dieses System entwickelten Reglers, der die Zugabe über den Sauerstoffverbrauch berechnete. Dabei konnte die Wasserstoffperoxid-Zugabe die Druckluftbegasung über einen Zeitraum von 200 h erfolgreich unterstützen.

Die Verwendung eines perfluorierten Kohlenwasserstoffs ermöglichte die Kultivierung von *Claviceps purpurea* in einem Zwei-Phasen System. Der Vorteil dieses Systems war ein hoher Gelöstsauerstoffgehalt trotz niedriger Begasungsrate, was zu einer Verringerung der Scherbelastung führte. Alle Kultivierungen zeichneten sich durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ausbeuten aus, wobei gleichzeitig die Konzentration des wichtigen Hauptproduktes Ergotamin im Vergleich zu den Referenzkultivierungen gesteigert werden konnte.

Durch den Einsatz der Zweidimensionalen Fluoreszenzspektroskopie zur Prozeßbeobachtung konnte bei einigen Kultivierungen sowohl die Protein- als auch die Ergotalkaloidproduktion on-line verfolgt werden.

**Stichworte:** *Claviceps purpurea*, Sauerstoffversorgung, Wasserstoffperoxid, perfluorierte Kohlenwasserstoffe

## Abstract

Miriam Menge

### Optimisation of the production of ergot alkaloids by *Claviceps purpurea*

The production of the pharmacologically important ergot alkaloids submerged fermentation is of high economic importance. A major problem is to supply sufficient oxygen to the fungus during the process. To overcome this problem, two alternative systems for the oxygen supply during cultivation of *Claviceps* in a stirred tank were developed as described in this work and used successfully. The conventional aeration by air was supported by the use of two different systems namely, addition of hydrogen peroxide and perfluorinated hydrocarbon.

Several stirrer types were tested to optimise the 2L stirred tank system. The use of a paddle type stirrer decreased the mechanical stress and led to higher biomass production and alkaloid concentration. The use of an antifoam agent brought about a three- and fivefold increase of growth and alkaloid production, respectively. Two cultivations carried out under the same conditions however yielded significant differences in alkaloid productivity.

Hydrogen peroxide was added to the media during three cultivations. The use of manganese dioxide ( $\text{MnO}_2$ ) as catalyst was necessary to accelerate the degradation of the peroxide. The appropriate dosage of hydrogen peroxide was determined by a software program by controlling the oxygen consumption calculated from the oxygen content in the exhaust gas. The dosage of hydrogen peroxide was able to support the conventional aeration for about 200 hours.

The use of perfluorinated hydrocarbon enabled the cultivation of *Claviceps purpurea* in a liquid two phase system with the advantages of a high oxygen partial pressure and a decreased aeration rate leading to a reduced mechanical stress. In all two phase cultivations the alkaloid productivity were found to be very reproducible. Simultaneously the concentration of the major product ergotamine was increased in comparison to the control cultivations.

On-line two-dimensional fluorescence spectroscopy was used to determine simultaneously the protein and alkaloid concentrations during several cultivations.

**Key words:** *Claviceps purpurea*, oxygen supply, hydrogen peroxide, perfluorinated hydrocarbons

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Geschichte des Mutterkorns .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Ergotalkaloide .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Pharmakologie.....	7
2.2.2 Biosynthese .....	8
<b>2.3 <i>Claviceps purpurea</i>.....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Entwicklungszyklus.....	11
2.3.2 Parasitäre Kultivierung .....	12
2.3.3 Kultivierung im Submersverfahren .....	13
2.3.3.1 Morphologie .....	13
2.3.3.2 Physiologie und Regulation der Ergotalkaloidproduktion.....	14
2.3.3.3 Wachstum in Submerskultur .....	17
<b>2.4 Sauerstoffversorgung .....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Alternative Systeme zur Sauerstoffversorgung.....	22
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Verwendeter Stamm.....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Stammhaltung.....	27
3.1.2 Inokulum .....	27
<b>3.2 Voruntersuchungen in Schüttelkolbenkultivierungen.....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Untersuchungen des Einflusses von Antischaummitteln.....	28
3.2.2 Test auf Toxizität von Wasserstoffperoxid.....	29
3.2.3 Test auf Toxizität von Mangandioxid.....	29
3.2.4 Kultivierungen unter Zusatz von Katalysatoren und Wasserstoffperoxid-Zugabe .	30
3.2.5 Kultivierungen mit Zugabe von Sojaöl.....	30
3.2.6 Kultivierungen mit Zusatz von Kohlenwasserstoffen .....	31
3.2.7 Kultivierungen mit Zusatz von Hostinert 216.....	31
<b>3.3 Kultivierungen im Bioreaktor.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4 2D-Fluoreszenzspektrometrie .....</b>	<b>35</b>
3.4.1 Off-line Messungen .....	37
<b>3.5 Prozeßregelung der Wasserstoffperoxid-Zugabe.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6 Off-line Analytik.....</b>	<b>42</b>
3.6.1 Morphologische Betrachtungen .....	42
3.6.2 Bestimmung der Biotrockenmasse .....	43
3.6.3 Bestimmung des extrazellulären Proteingehaltes.....	43
3.6.4 Bestimmung des Zuckergehaltes.....	43

3.6.5 Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes.....	44
3.6.5.1 Untersuchung des Einflusses von Hostinert 216 auf die Ergotalkaloide .....	44
3.6.6 Bestimmung der Ergotamin- und $\alpha$ -Ergokryptingehalte .....	44
3.6.6.1 Untersuchungen zum Einfluß von $H_2O_2$ auf die Ergotalkaloide .....	45
3.6.6.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate der Ergotalkaloide bei der Extraktion ..	45
<b>4 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate bei der Extraktion von Kultivierungsproben.</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Kultivierungen von <i>Claviceps purpurea</i> in Schüttelkolben unter Zusatz         verschiedener Antischaummittel.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Voruntersuchungen zur Sauerstoffversorgung mit <math>H_2O_2</math>.....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Untersuchungen zum Einfluß von Wasserstoffperoxid auf die Ergotalkaloide.....	50
4.3.2 Einfluß von Wasserstoffperoxid auf Kultivierungen von <i>Claviceps purpurea</i> .....	51
4.3.3 Voruntersuchungen für den Einsatz der Katalysatoren .....	53
4.3.4 Untersuchungen zum Einfluß von $MnO_2$ auf <i>Claviceps purpurea</i> .....	54
4.3.5 Schüttelkolbenkultivierungen von <i>Claviceps purpurea</i> mit Zugabe von $H_2O_2$ und Katalysatoren.....	55
<b>4.4 Kultivierungen in Schüttelkolben unter Zusatz von Sojaöl.....</b>	<b>57</b>
<b>4.5 Voruntersuchungen zu Kultivierungen im 2-Phasen-System.....</b>	<b>58</b>
4.5.1 Einsatz verschiedener Kohlenwasserstoffe in Schüttelkolbenkultivierungen .....	58
4.5.2 Einsatz von perfluorierten Kohlenwasserstoffen in Schüttelkulturen .....	60
4.5.2.1 Untersuchungen zum Einfluß von Hostinert 216 auf die Ergotalkaloide .....	67
<b>4.6 Kultivierungen im 2L-Bioreaktor Biostat B.....</b>	<b>68</b>
4.6.1 Kultivierungen mit unterschiedlichen Rührertypen .....	68
4.6.2 Kultivierung unter Zusatz eines Antischaummittels .....	70
4.6.3 Kultivierungen mit Zudosierung von Wasserstoffperoxid .....	76
4.6.3.1 Kultivierung H1 .....	76
4.6.3.2 Kultivierung H2 .....	79
4.6.3.3 Kultivierung H3 .....	82
4.6.3.4 Vergleich der Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe .....	84
4.6.4 Kultivierungen mit Zusatz verschiedener Konzentrationen Hostinert 216 .....	88
<b>4.7 Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie.....</b>	<b>100</b>
4.7.1 Off-line-Messung der 2D-Fluoreszenz an verdünnten Kultivierungsproben .....	103
4.7.2 Anwendung einer multivariaten Regression .....	105
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>109</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>123</b>
<b>7.1 Medienzusammensetzungen.....</b>	<b>123</b>
7.1.1 T2 Medium (für die Stammhaltung auf Agarplatten).....	123
7.1.2 Medien für die Flüssigkulturen .....	123



---

<b>7.2 Reagenzien für den BIORAD <i>DC</i> Protein Assay.....</b>	<b>124</b>
<b>7.3 Reagenzien für den Photometertest nach van Urk.....</b>	<b>124</b>
<b>7.4 Verwendete Chemikalien .....</b>	<b>124</b>
<b>7.5 Kenndaten von Hostinert 216<sup>®</sup> .....</b>	<b>125</b>
<b>7.6 HPLC-System zur Zuckerbestimmung .....</b>	<b>125</b>
<b>7.7 HPLC-System zur Bestimmung der Ergotalkaloide.....</b>	<b>126</b>
<b>7.8 Prozeßanalytik.....</b>	<b>126</b>
7.8.1 pH-Wert .....	126
7.8.2 Gelöstsauerstoffgehalt .....	127
7.8.3 Abgaskohlendioxid und –sauerstoff .....	127
<b>7.9 Abgasdaten verschiedener Bioreaktorkultivierungen .....</b>	<b>128</b>
<b>7.10 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>129</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

An den in der Natur ständig ablaufenden Umsetzungsprozessen haben Pilze einen wesentlichen Anteil. Dabei können sie zum einen für den Menschen äußerst nützlich sein und zum anderen eine hohe Schädigung aufweisen.

Neben dem Verzehr essbarer Pilze, hat sich die Menschheit bereits seit mehreren tausend Jahren der besonderen Fähigkeiten der Pilze bzw. Hefen in Fermentationsprozessen zur Herstellung vieler Lebensmittel, z.B. Wein, Bier oder Käse, bedient.

In jüngerer Zeit werden Pilze in der „Mikrobiellen Biotechnologie“ zur Herstellung verschiedenster Produkte eingesetzt. So produzieren beispielsweise *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten in industriellen, aeroben Fermentationsprozessen, die gegenüber chemischen Verfahren häufig billiger sind, organische Säuren wie Citronensäure, Itaconsäure oder Gluconsäure.

*Aspergillus*-Stämme werden weiterhin zur Produktion von Enzymen, besonders der Pektinase eingesetzt. Die ebenfalls aus Pilzen hergestellten Amylasen, Cellulasen, Proteasen oder Lipasen werden z.B. für den Einsatz in der Leder-, Textil- und Waschmittelindustrie oder für die Fruchtsaftherstellung industriell in großen Mengen produziert [SCHLEGEL, 1992].

Daneben produzieren Pilze eine Reihe von sekundären Metaboliten, deren bedeutendste Vertreter die Antibiotika sind. Die wichtigsten Produzenten der Antibiotika sind u.a. *Penicillium chrysogenum* (Penicillin), *Acremonium chrysogenum* (Cephalosporin C) und *Streptomyces*-Arten, die Streptomycin oder Tetracycline bilden. Durch gezielte Mutationen konnten Hochleistungsstämme entwickelt werden, die die Produktion der Wildstämme um das 2000-fache und mehr übertreffen.

Des Weiteren werden Vitamine wie Riboflavin von den Ascomyceten *Ashbya gossypii* und *Eremothecium ashbyi* hergestellt und Mucorales zur industriell-fermentativen Carotinoidproduktion verwendet.

Hervorzuheben ist außerdem der Einsatz von Pilzen bei stereospezifischen biologischen Transformationen, die zur Produktion von Cortison und Steroidhormonen verwendet werden [MÜLLER UND LÖFFLER, 1992].

Neben diesen zahlreichen Nutzwirkungen verursachen Pilze sowohl bei Menschen, Tieren als auch Pflanzen Schädigungen. So können einige Pilzarten beim Menschen Hauterkrankungen oder Infektionskrankheiten hervorrufen.

Pilzvergiftungen werden zum einen durch Verzehr von Pilzfruchtkörpern z.B. des Knollenblätterpilzes oder des Fliegenpilzes, die die toxischen Peptide Muscarin bzw. Amanitin enthalten, verursacht. Diese Vergiftungsart wird Mykotoxikose genannt. Zum anderen werden Vergiftungen (Mycotoxikosen) durch Pilze hervorgerufen, die nicht bewußt sondern als unauffälliger Bestandteil oder Kontamination der Nahrung aufgenommen werden. Der toxinbildende Pilz infiziert beispielsweise Pflanzenorgane wie Früchte oder Blüten, produziert giftige Inhaltsstoffe, die die Lagerung oder Verarbeitung zu Lebensmitteln unverändert überstehen,

so daß die Toxine in die Nahrungskette des Menschen gelangen. Die bekanntesten Vertreter der Mycotoxine sind die sogenannten Aflatoxine oder verwandte Substanzen, die von *Aspergillus flavus*, anderen *Aspergillus*- und teilweise auch *Penicillium*-Arten gebildet werden. Aflatoxine können beim Menschen zu Leberschäden führen, gleichzeitig besitzen sie cancerogene Eigenschaften. Als Toxinquelle kommen „verschimmelte“ Lebensmittel wie Erdnüsse, Getreide, Ölfrüchte oder Futtermittel in Frage [MÜLLER UND LOEFFLER, 1992].

Ein weiterer Mycotoxin-Produzent ist der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea*, der als Parasit Gräser und Getreide (vorwiegend Roggen) befällt. Das anstelle des Getreidekorns wachsende Dauermycel des Pilzes beinhaltet die toxisch wirkenden Ergotalkaloide. Durch Aufnahme dieser Substanzen in Form von kontaminiertem Mehl oder Brot erlitten die Menschen in den vorigen Jahrhunderten Erkrankungen, die teilweise zum Tod führten (Ergotismus).

*Claviceps purpurea* und die von ihm produzierten Ergotalkaloide stellen ein ideales Beispiel dafür dar, daß ein Pilz bzw. dessen Sekundärmetabolite auf der einen Seite großen Schaden (durch Vergiftungen) zufügen und auf der anderen Seite sehr großen Nutzen bringen können.

Ergotalkaloide besitzen aufgrund ihrer vielfältigen Strukturen breite Anwendungen in der Pharmakologie, wobei sie bereits im Mittelalter bei richtiger Dosierung in der Geburtshilfe erfolgreich eingesetzt wurden. Das Anwendungsgebiet der Alkaloide erstreckt sich heute von der Therapie von Gefäßkrankheiten, Migräne, Basedowscher Krankheit bis hin zur Behandlung der Parkinsonschen Krankheit. Daneben zeigen die Ergotalkaloide, die Derivate der Lysergsäure sind, teilweise halluzinogene Wirkungen [KOBEL UND SANGLIER, 1986].

Aufgrund dieser vielseitigen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten ist das kommerzielle Interesse an diesen Substanzen sehr hoch. So wurden in den letzten Jahrzehnten Verfahren zur Produktion der Alkaloide entwickelt, die sich zunächst auf die parasitäre Kultivierung des Pilzes auf Roggenfeldern beschränkten. Mittlerweile wurden auch Submerskultivierungen von *Claviceps*-Stämmen etabliert, die in großtechnischem Maßstab Ergotalkaloide lieferten, wobei in der Regel Rührkesselreaktoren verwendet wurden.

Die Schwierigkeiten liegen dabei hauptsächlich in der Generierung von Hochleistungsstämmen, die die pharmazeutisch interessanten Ergopeptine in hoher Konzentration bilden und möglichst in das Kultivierungsmedium ausschleusen. Die durch Mutation und aufwendigem Screening erhaltenen Hochleistungsstämme neigen dabei teilweise zur schnellen Degeneration.

Intensive Forschungen auf dem Gebiet der Submerskultivierung führten zu optimierten Nährbödenzusammensetzungen und Fermentationsbedingungen. Ein Problem dabei stellt bis heute die ausreichende Sauerstoffversorgung des Pilzes dar, der zu Beginn der Wachstumsphase einen sehr hohen Sauerstoffbedarf aufweist. Aufgrund der hohen Sensitivität gegenüber mechanischer Belastung und der Tendenz zu hoher Schaumentwicklung bei gleichzeitiger Empfindlichkeit gegenüber Antischaummitteln können nur relativ geringe Begasungsraten und Rührerdrehzahlen eingestellt werden.

In den letzten Jahren waren daher die Immobilisierungen der *Claviceps* Mycelien Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, da durch die Einhüllung der Mycelien eine Verringerung der Scherbelastung zu erwarten war. Die Schwierigkeiten dabei lagen in den teilweise sehr geringen Stabilitäten der Immobilisate sowie in den Nährstoff- und Sauerstofflimitierungen. Daher waren die produzierten Alkaloidkonzentrationen in Kultivierungen mit Immobilisaten geringer als die von freien Zellen. In allen Arbeiten zeigten sich besondere Probleme im Scale up der Verfahren mit Immobilisaten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher bei Kultivierungen von freien Zellen des Stammes *Claviceps purpurea* 1029 N5 im Rührkesselreaktor alternative Methoden zur konventionellen Sauerstoffversorgung über Druckluftbegasung zu entwickeln, um somit den Sauerstoffeintrag in das Kultivierungsmedium zu erhöhen und eine Steigerung der Ergotalkaloidproduktion zu erreichen. Dabei sollen die Verfahren die konventionelle Begasung unterstützen.

Um den Sauerstoffeintrag zu erhöhen, werden zwei völlig verschiedene Verfahrensansätze gewählt. Die erste Methode beruht auf der Zugabe von Wasserstoffperoxid, aus dem durch schnelle Zersetzung Sauerstoff direkt in der flüssigen Phase erzeugt wird. Der zweite Ansatz beinhaltet die Verwendung eines Additives, in dem die Sauerstofflöslichkeit wesentlich größer ist als die in Wasser und das gleichzeitig nicht mischbar mit dem Kultivierungsmedium ist. Dadurch soll die Sauerstoffkonzentration in der flüssigen Phase erhöht werden. Als Additive bieten sich dabei z.B. (perfluorierte) Kohlenwasserstoffe an.

Zunächst wird ein Fermentationssystem etabliert, bei dem die Sauerstoffversorgung ausschließlich über Druckluftbegasung erfolgt und das für die weiteren Kultivierungen als Referenzsystem dient.

In Voruntersuchungen werden die Wirkungen von Wasserstoffperoxid auf das Zellwachstum und die Alkaloidproduktion sowie auf die gebildeten Produkte getestet. Des Weiteren wird überprüft, ob ein Einsatz von Katalysatoren zur schnelleren Spaltung des Peroxids notwendig erscheint. Die Übertragung der Ergebnisse auf den 2L-Bioreaktor beinhaltet die Entwicklung einer Regeleinheit für die optimale Wasserstoffperoxid-Zugabe in Abhängigkeit vom Sauerstoffverbrauch der Zellen.

In Schüttelkolbenkultivierungen werden zunächst verschiedene Substanzen, die einen positiven Effekt auf den Sauerstoffeintrag in Kultivierungsmedien besitzen können, auf ihren Einfluß auf die Zellen und die Alkaloidproduktion untersucht. Dabei sind die für eine Sauerstoffversorgung optimalen Konzentrationen herauszufinden. Diese Ergebnisse werden anschließend auf Kultivierungen im Bioreaktor übertragen.

Daneben soll zur Prozeßbeobachtung die Zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie bei Kultivierungen im Bioreaktor eingesetzt werden, um anhand charakteristischer Fluoreszenzbereiche Aussagen über den Zustand des Prozesses und den Verlauf der Alkaloidproduktion treffen zu können.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Geschichte des Mutterkorns

„Mutterkorn - vom Fluch zum Segen für die Menschheit“, diese kurze Überschrift eines Artikels von SCHMAUDER [1998] über die Geschichte des Mutterkorns verdeutlicht die einzigartige Entwicklung der Ergotalkaloide von einer Menschheitsplage hin zu einer pharmazeutisch vielseitig einsetzbaren und wertvollen Substanzklasse.

Das Mutterkorn ist das Sklerotium (Dauermycel) des phytopathogenen Pilzes *Claviceps purpurea*, das nach dem Infizieren von Getreide (vorwiegend Roggen) die Stelle des Getreidekorns einnimmt und im Gegensatz zu diesem dunkelviolet bis schwarz und wesentlich größer ist. Die in diesen Sklerotien enthaltenen Substanzen sind die Ergotalkaloide, die in früheren Zeiten Ursache für zahlreiche Krankheiten und Vergiftungserscheinungen großer Teile der Bevölkerung waren, nachdem diese sie über Nahrungsmittel wie Brot oder Brei aufgenommen hatten. Betroffen waren davon zumeist die ärmeren Bevölkerungsschichten, die auf die von den wohlhabenden Bauern verworfenen Getreidereste angewiesen waren.

Die vielleicht erste Epidemie der als Ergotismus, St. Antonius-Feuer oder Kriebel-Krankheit genannten Vergiftungserscheinungen brach 945 n.Chr. in Paris aus, bei der es 40.000 Todesopfer zu beklagen gab [REHACEK UND SAJDL, 1990]. In den folgenden Jahrhunderten wurden in der Literatur wiederholt Krankheitsbilder beschrieben, die den zwei Erscheinungsformen des Ergotismus entsprechen: Ergotismus convulsivus und Ergotismus gangraenosus. Letztere wurde auch als St. Antonius-Feuer bezeichnet, wobei heftige Schmerzen in den Gliedmaßen bedingt durch Durchblutungsstörungen auftreten, gefolgt vom nahezu völligen Absterben der Extremitäten. Der Ergotismus convulsivus (Kriebel-Krankheit) äußert sich in einer Nervenerkrankung mit anschließenden Konvulsionen der Muskulatur, die zu Muskelkrämpfen führen. Dabei verharren die Körperteile bewegungslos in abnormen Stellungen, was teilweise ebenfalls zum Tod führt. Diesen Krankheitsverlauf beschrieb Johann Taubes in seiner „Geschichte der Kriebel-Krankheit“ in den Jahren 1770/71 [SCHMAUDER, 1998]. Auch in diesem Jahrhundert gab es eine Epidemie, als im August 1951 im südfranzösischen Pont-Saint-Esprit mutterkornvergiftete Brote verkauft wurden, wodurch innerhalb weniger Tage über 200 Erkrankungen und einige Todesfälle hervorgerufen wurden [RÖMPP, 1995].

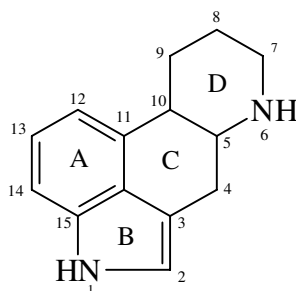
Neben diesen verheerenden Eigenschaften des Mutterkorns, steckt in diesem bei vorsichtiger Dosierung ein großer medizinischer Nutzen, der schon im Mittelalter von Adam Lonicer (1582) in seinem „Kreuterbuch“ oder von Johannes Thalius (1588) in „Silva Hercynia“ beschrieben wurde. Dabei fanden die Mutterkornpräparate vorwiegend Einsatz in der Geburtshilfe als Wehenmittel.

Ende des 19. Jh. gelang es Tanret, das erste kristalline Alkaloid (Ergotinin) zu isolieren. Das erste pharmazeutisch einsetzbare Alkaloid, das Ergotamin, wurde 1918 von Stoll isoliert und charakterisiert. Daran anknüpfend waren in den nächsten Jahrzehnten die Isolierung, Struk-

turaufklärung, chemische (Partial-)Synthese sowie pharmakologische Studien zahlreicher Ergotalkaloide Bestandteile intensiver Forschung. Mittlerweile finden die Ergotalkaloide Anwendung bei der Behandlung zahlreicher, unterschiedlicher Krankheiten (s. Kapitel 2.2.1) [KOBEL UND SANGLIER, 1986; FLIEGER ET AL., 1997; GRÖGER UND FLOSS, 1998].

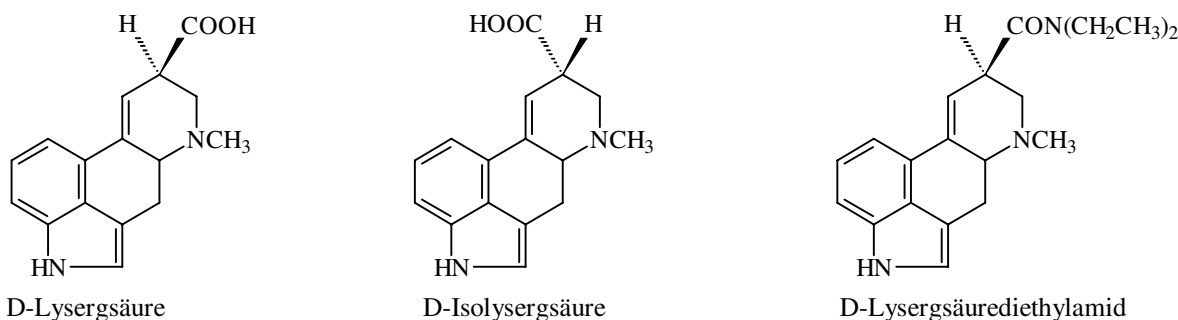
## 2.2 Ergotalkaloide

Die zu den Indolalkaloiden gehörenden Ergotalkaloide besitzen ein gemeinsames Strukturelement, das tetracyclische Ergolinringsystem. (Abb. 2-1). Die meisten natürlich vorkommenden Ergotalkaloide sind Derivate von 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ - oder - $\Delta^{9,10}$ -Ergolin, die zusätzlich häufig an Position 8 substituiert sind [GRÖGER UND FLOSS, 1998].



**Abbildung 2-1.**  
Strukturformel des tetracyclischen Ergolinringsystems.

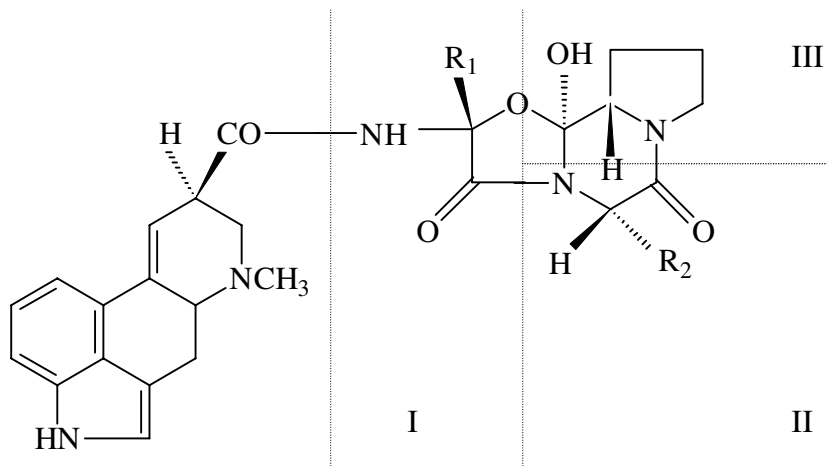
Ausgehend von den Substituenten an Position 8 werden die Alkaloide in zwei Hauptgruppen aufgeteilt, den Clavinalkaloiden und den Lysergsäurederivaten. Die Clavinalkaloide sind oftmals Hydroxy- bzw. Dehydroderivate des 6,8-Dimethylergolins, einige besitzen einen geöffneten D-Ring. Da diese Gruppe nur eine geringe pharmazeutische Rolle spielt, wird hier nicht näher auf sie eingegangen und auf ausführliche Literatur verwiesen [FLIEGER ET AL., 1997]. Abbildung 2-2 zeigt die beiden Stereoisomere der Lysergsäure. Während die Derivate der D-Lysergsäure (diese tragen die Endung -in, z.B. Ergotamin) hohe pharmazeutische Aktivitäten aufweisen, ist diese bei Isolysergsäurederivaten (Endung -inin, z.B. Ergotaminin) sehr gering.



**Abbildung 2-2.**  
Strukturformeln der Stereoisomere D-Lysergsäure und D-Isolysergsäure, sowie des Lysergsäurediethylamids.

Zu der Gruppe der Lysergsäurederivate gehören zum einen die sogenannten einfachen Derivate, deren Amidteil ein einfaches Alkylamid darstellt, wie beispielsweise das Ergometrin und der wohl populärste Vertreter dieser Substanzklasse, das von Hofmann 1938 hergestellte, se-

misynthetische Halluzinogen Lysergsäurediethylamid LSD [SCHMAUDER, 1998] (Abb. 2-2). Zum anderen stellen die Peptidderivate (Ergopeptine) eine wichtige Gruppe der Lysergsäurederivate dar. Die Grundstruktur bildet das Lysergsäuremolekül, das über eine Amidbindung mit einem cyclischen Tripeptid verbunden ist (Abb. 2-3).



**Abbildung 2-3.**

Schematische Darstellung des Aufbaus der Ergopeptine. I, II und III symbolisieren die am Aufbau des Tripeptids beteiligten Aminosäuren (Erläuterung siehe Text).

Der Tripeptidrest, der eine Cyclolstruktur besitzt, ist aus drei Aminosäuren aufgebaut, wobei bei allen natürlich vorkommenden Ergopeptinen Aminosäure III L-Prolin ist. Als Aminosäuren I und II können 6 verschiedene Aminosäuren in das Tripeptid eingebaut werden: Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Valin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure und Alanin.

**Tabelle 2-1.**

Schema des Tripeptidaufbaus und der sich daraus ergebenden Gruppen der Ergopeptide (aus KELLER, 1999).

	Ergotamin	Ergoxin	Ergotoxin
Position I	Alanin	$\alpha$ -Aminobuttersäure	Valin
Position II			
Phenylalanin	Ergotamin	Ergostin	Ergocristin
Leucin	$\alpha$ -Ergosin	$\alpha$ -Ergoptin	$\alpha$ -Ergokrypton
Isoleucin	$\beta$ -Ergosin	$\beta$ -Ergoptin *	$\beta$ -Ergokryptin
Valin	Ergovalin	Ergonin	Ergocornin
$\alpha$ -Aminobuttersäure	Ergobin	Ergobutin	Ergobutyryn

\* bisher noch nicht in der Natur gefunden

Je nach Zusammensetzung der Seitenkette lassen sich die Ergopeptide in drei Klassen einteilen, die in Tabelle 2-1 dargestellt sind.

Neben den Peptidalkaloiden existieren die sogenannten Ergopeptame, die sich nur dahingehend von den Ergopeptinen unterscheiden, daß der Tripeptidrest nicht L- sondern D-Prolin als Aminosäure III enthält. Dadurch besitzen Ergopeptame keine Cyclolstruktur. Für nähere Beschreibungen sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen [KOBEL UND SANGLIER, 1986; REHACEK UND SAJDL, 1990; FLIEGER ET AL., 1997; KELLER, 1999].

Eine neuere Gruppe natürlich vorkommender Derivate bilden die Ergotalkaloidglycoside. Die erste Substanz dieser Gruppe, Elymoclavin- $\beta$ -D-fructofuranosyl, wurde 1967 von Floss aus der Kulturbrühe eines *Claviceps*-Stammes isoliert [FLOSS ET AL., 1967]. Mit Hilfe chemischer und enzymatischer Methoden wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Substanzen synthetisiert, die teilweise vielversprechende physiologische Effekte erzielten [KREN, 1997].

Von den in der Natur gebildeten Ergotalkaloiden finden lediglich Ergometrin und Ergotamin Anwendung in der Pharmazie. Durch gezielte chemische Modifikation an den aus der Natur gewonnenen Substanzen lassen sich wirksamere Produkte gewinnen, wie beispielsweise Bromkryptin, Dihydroergotamin, Methylergometrin, Methysergid oder Dihydroergotoxin. Da nicht alle Ergotalkaloide das gleiche Wirkungsspektrum zeigen, können mit den semisynthetischen Derivaten gezielt einzelne Wirkungsqualitäten hervorgehoben werden [ESTLER, 1995].

Die Forschungen auf dem Gebiet der Ergotalkaloide mit dem Ziel, neue, pharmazeutisch wirksame Substanzen zu gewinnen, lassen sich in drei Felder aufteilen. Ein Feld ist die chemische (Total-)Synthese, die teilweise von natürlich vorkommenden Synthesebausteinen, wie etwa Tryptophan, ausgeht. In Anlehnung an die Struktur der Neurotransmitter (s. Kapitel 2.2.1) werden die tricyclischen Strukturen aufgebaut und variiert. Probleme bereitet es dabei, die gewünschte Stereospezifität im Molekül zu erlangen.

Ein anderer Bereich nimmt die in der Natur gebildeten Ergotalkaloide als Ausgangsmaterial und setzt diese z.B. mit Hilfe von Enzymen anderer Organismen um [KREN, 1991].

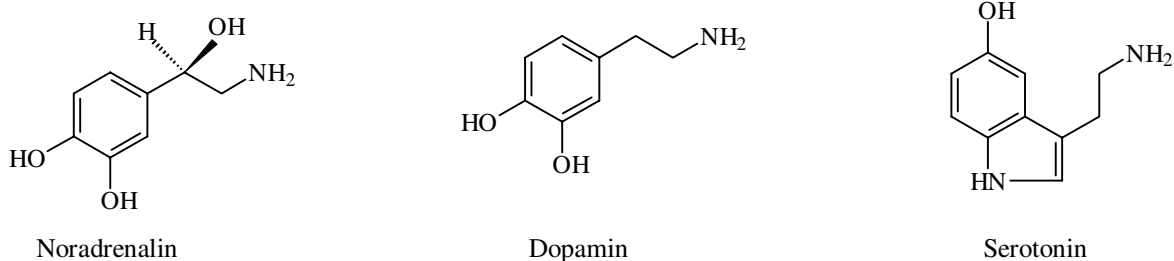
Der direkte Eingriff in die Biosynthese des Organismus durch gezielte Zufütterung von verschiedenen Substanzen zu *Claviceps* Kulturen ist eine weitere Methode, neue Strukturen zu erlangen. Schwierigkeiten in diesem Gebiet liegen darin, Stämme zu generieren, die zum einen die Substanzen aus dem Medium aufnehmen und einbauen und zum anderen die neuen Verbindungen in hohen Ausbeuten produzieren. Die Arbeiten in diesen unterschiedlichen Forschungsbereichen sind bei KREN [1991] und MUKHERJEE UND MENGE [im Druck] ausführlich dargestellt.

### 2.2.1 Pharmakologie

Aufgrund der großen Diversität ihrer Strukturen, besitzen die Ergotalkaloide ein sehr großes Wirkungsspektrum wie kaum eine andere Substanzklasse. Die Wirkung der Ergotalkaloide beeinflußt zum einen das zentrale Nervensystem und zum anderen die glatte Muskulatur der



Gebärmutter sowie der Blutgefäße. Die Basis für die unterschiedlichen Aktivitäten liegt in der strukturellen Analogie zwischen dem Ergolinringsystem und einigen Neurotransmittern (Abb. 2-4) [BERDE UND STÜRMER, 1978].



**Abbildung 2-4.**

Strukturformeln der Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin.

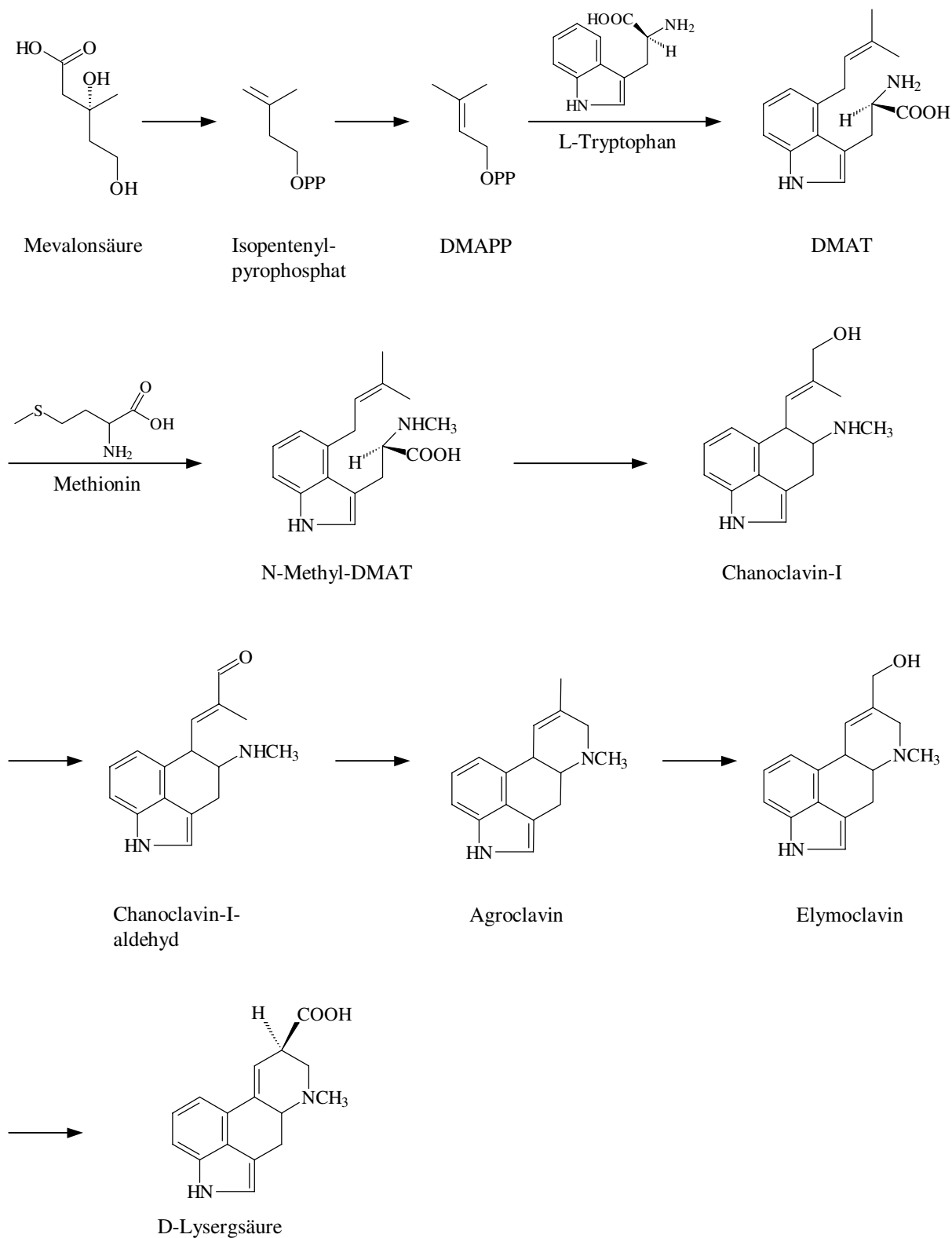
Verallgemeinernd läßt sich sagen, daß Clavinalkaloide und einfache Lysergsäureamid-Derivate hohe Affinitäten zu Serotonin- (5HT-) Rezeptoren besitzen, während sich Alkaloide des Ergopeptintyps durch hohe Affinitäten zu  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren auszeichnen. Lysergsäurediethylamid (LSD) und Methysergid wirken hingegen wie Serotoninantagonisten [ESTLER, 1995]. Aufgrund der Interferenz mit verschiedenen Rezeptoren und zellulären Mechanismen ist die Pharmakologie der Ergotalkaloide äußerst komplex. Bereits kleine Änderungen in der chemischen Struktur resultieren in unterschiedlichen biologischen Aktivitäten. So steigert beispielsweise die Bromierung von  $\alpha$ -Ergokryptin in Position 2 die Stimulierung zentraler Dopaminrezeptoren [GRÖGER UND FLOSS, 1998].

Die Bandbreite der Einsatzgebiete der Ergotalkaloide ist demzufolge sehr hoch und reicht von der Behandlung von Migräne, Basedowscher Krankheit, Hypertonie, Durchblutungsstörungen, prolactin- und wachstumshormonbedingten Krankheiten, Brust- und Prostatakrebs bis hin zum Einsatz zur Verbesserung der Symptomatik bei der Parkinson-Krankheit [KOBEL UND SANGLIER, 1986; EICH UND PERTZ, 1994; GRÖGER UND FLOSS, 1998]. Die antimikrobiellen und Antitumor-Eigenschaften, die bei einzelnen Substanzen gefunden worden sind, lassen auf neue, wirksame Präparate hoffen, deren Erforschung Bestandteil weiterer Untersuchungen ist.

### 2.2.2 Biosynthese

Der Hauptproduzent der Ergotalkaloide ist der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea*. In einigen Pilzen und höheren Pflanzen konnten ebenfalls Ergotalkaloide (hauptsächlich Clavinalkaloide) isoliert werden, sie spielen jedoch bei der großtechnischen Produktion der Substanzen keine Rolle [ESSER UND DÜVELL, 1984; REHACEK UND SAJDL, 1990].

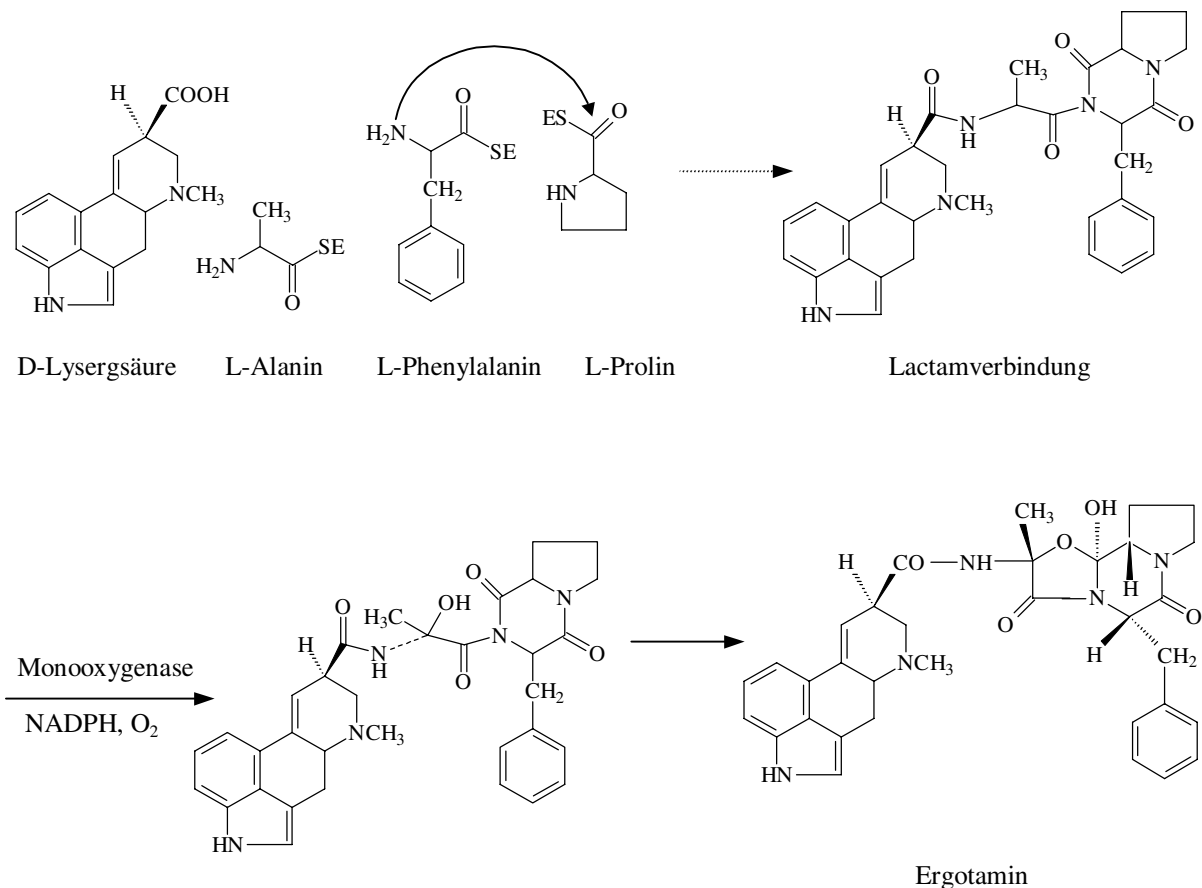
Die Biosynthese der Ergotalkaloide als Sekundärmetabolite in *Claviceps*-Stämmen ist Bestandteil zahlreicher Untersuchungen und ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. In Abbildung 2-5 ist der Biosyntheseweg bis zur Lysergsäure schematisch dargestellt.



**Abbildung 2-5.** Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von D-Lysergsäure [KELLER, 1999].

Die Vorläufersubstanzen für die Synthese des Ergolinringsystems sind L-Tryptophan und Mevalonsäure. Mevalonsäure wird zunächst zu Isopentenylpyrophosphat und dieses im Anschluß zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) umgewandelt. Die Reaktion mit Tryptophan zu Dimethylallyltryptophan (DMAT) durch die DMAT-Synthase wird als erster spezifischer Schritt der Alkaloidbiosynthese bezeichnet. Daran schließt sich die Methylierung der primären Aminogruppe an, wobei Methionin oder S-Adenosylmethionin als Methylendonatoren beschrieben werden. In einem bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Schritt wird nach Ringschluß das tricyclische Chanoclovin-I bzw. Chanoclovin-I-aldehyd gebildet.

Die Cyclisierung des D-Ringes ergibt das erste tetracyclische Alkaloid Agroclavin, welches zu Elymoclavin oxidiert wird. Sowohl Agroclavin als auch Elymoclavin werden von bestimmten *Claviceps*-Stämmen in hohen Konzentrationen gebildet. Eine weitere Oxidationsreaktion führt höchstwahrscheinlich über die Paspalsäure (dem Endprodukt von *Claviceps paspali*) zur Lysergsäure.



**Abbildung 2-6.**

Schematische Darstellung der Bildung eines Ergopeptinmoleküls (Ergotamin) aus Lysergsäure und den drei Aminosäuren (hier: L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Prolin) mit Hilfe einer multifunktionalen Peptidsynthase (E) [LOHMEYER UND TUDZYNSKI, 1997].

Die Bildung der Ergopeptide ist bis heute mechanistisch noch nicht geklärt. Die in den letzten Jahren erfolgreichen Isolierungen einzelner Enzyme und die Aufklärung einzelner Biosynthe-

seschritte durch Zufütterungsexperimente mit radioaktiv-markierter Lysergsäure bzw. Aminosäuren lassen folgenden Mechanismus wahrscheinlich erscheinen:

Die drei, das Tripeptid aufbauenden Aminosäuren stammen aus dem zelleigenen Aminosäurerepool. Sie werden zusammen mit der Lysergsäure mit Hilfe eines Multienzymkomplexes (multifunktionale Peptidsynthase) in die entsprechende Lactamverbindung umgesetzt. Dieser mögliche Mechanismus ist in Abbildung 2-6 am Beispiel des Ergotamins dargestellt.

Der letzte Schritt der Biosynthese, die Bildung der Cyclolstruktur durch Ringschluß, wird möglicherweise von einer unspezifischen Monooxygenase, die von NADPH und Cytochrom P450 abhängig ist, katalysiert [LOHMEYER UND TUDZYNSKI, 1997].

Bisher konnten einige an der Biosynthese beteiligte Enzyme isoliert und der Mechanismus der von ihnen katalysierten Reaktion oftmals geklärt werden. Zu ihnen gehören die Isopentenyl-Isomerase (Isopentenylpyrophosphat: Dimethylallylpyrophosphat Isomerase) und die DMAT-Synthase (Dimethyltransferase) als das Schlüsselenzym der Ergotalkaloidbiosynthese. Letzteres ist das am besten untersuchte Enzym und konnte 1992 von GEBLER UND POULTER gereinigt und charakterisiert werden. TSAI ET AL. gelang es 1995, das DMAT-Synthase Gen zu sequenzieren. Daneben sind die DMAT-N-Methyltransferase, die Chanoclavin-I-Cyclase und Clavin-Monooxygenasen bekannt. Die an dem Aufbau der Cyclolstruktur beteiligten Enzyme sind noch weitestgehend unbekannt. KELLER ET AL. [1988] konnten in einem zellfreien System eine nicht-ribosomale Synthese der vorletzten Stufe der Biosynthese, der Lactamverbindung, zeigen. Das dort eingesetzte, aus einem *Claviceps purpurea*-Stamm isolierte Enzym wird als multifunktionale Peptidsynthase beschrieben. Über die Aufklärung des Biosynthesewegs und die Charakterisierung der dort beteiligten Enzyme sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen [LOHMEYER UND TUDZYNSKI, 1997; GRÖGER UND FLOSS, 1998; KELLER, 1999].

## 2.3 *Claviceps purpurea*

*Claviceps* spp. gehören zu den Pyrenomyceten, die der Ordnung der Ascomyceten (Schlauchpilze) angehören. Die vielen verschiedenen Spezies lassen sich vereinfachend in zwei Gruppen unterteilen: *Claviceps purpurea* und *Claviceps fusiformis-paspali*. Letztere zeichnen sich durch braune oder graue Sklerotien aus und stellen in Bezug auf die Alkaloidproduktion die primitivere Form dar, da sie nur in der Lage sind, Clavinalkaloide oder einfache Lysergsäurederivate zu synthetisieren. *Claviceps purpurea* hingegen bilden dunkel-violette Sklerotien (s. Kapitel 2.3.1) und bilden in ihrem Sekundärmetabolismus Ergotalkaloide des Peptidtyps [KOBEL UND SANGLIER, 1986].

### 2.3.1 Entwicklungszyklus

*Claviceps purpurea* lebt als fakultativer Parasit auf Gräsern, vorwiegend Roggen. Zu dessen Blütezeit infizieren die Ascosporen des Pilzes die Fruchtknoten. Es bilden sich Hyphen, die in den Fruchtknoten eindringen und diesen durchwuchern, wobei das Wirtsgewebe zerstört wird. Es entsteht ein dichtes, weiches Mycel, an dessen Oberfläche (an den Hyphenenden) Konidi-

en entstehen (Sphacelia-Stadium). Gleichzeitig wird ein süßlicher Saft (Honigtau) abgesondert, der Insekten anlockt, die dann die Konidien auf nicht infizierte Nachbarpflanzen übertragen. Aus dem Mycel entsteht nach einiger Zeit ein hornartiges, dunkel-violettes bis schwarzes Sklerotium, das die Stelle des Roggenkorns einnimmt. Die Sklerotien fallen zur Zeit der Kornblüte ab, überwintern im Boden und keimen im Frühjahr wieder aus. Dabei wachsen Hyphen aus, an deren Ende sich langgestielte Stromata entwickeln, die die Perithezien mit den Asci enthalten. In den Asci befinden sich als Produkt des sexuellen Stadiums jeweils 8 fadenförmige Ascosporen [SCHLEGEL, 1992; MÜLLER UND LOEFFLER, 1992]. Bestandteile der Sklerotien sind über 30 % Fett und 0,01 – 1 % Alkaloide.

### 2.3.2 Parasitäre Kultivierung

Die parasitäre Kultivierung des Mutterkornpilzes begann in Ungarn, wo zunächst Roggensamen und Sklerotien gleichzeitig gesät wurden. In den 20er Jahren wurde die erste Ergotalkaloidproduktion auf Roggen im größeren Maßstab erfolgreich durchgeführt, wobei Suspensionen von Ascosporen und Konidien auf ein blühendes Roggenfeld gesprüht wurden. Da diese Methode sehr anfällig gegenüber Wind und Regen war, wurde von BÉKÉSY 1938 ein neues Verfahren entwickelt, wobei die Roggenpflanze mit einer Injektionsnadel mit einer Konidien-suspension infiziert wurde (Primärinfektion). Diesen Prototypen entwickelte die Fa. Sandoz (Basel) weiter, ebenso wie eine Erntemaschine für die Sklerotien. Die Hauptanbauggebiete lagen in früheren Jahren in der Schweiz (Sandoz), in Ungarn (Gedeon Richter), in der ehemaligen Tschechoslowakei (Spofa) und im früheren Jugoslawien (LEK, Ljubliana). Die mittleren Ausbeuten betragen ungefähr 200-500 kg Sklerotien/ ha [CRUEGER UND CRUEGER, 1989]. Die Alkaloide mußten anschließend aus den Sklerotien mit Hilfe von organischen Lösemitteln extrahiert werden, wobei die Ausbeuten bei ungefähr 0,8 % Produkt bezogen auf das Trockengewicht lagen [REHACEK, 1990].

Die parasitäre Kultivierung ist aus vielerlei Gründen problematisch. Die Sekundärinfektion über Insekten (z.B. Ausbleiben der Insekten oder Austrocknen des Honigtaus) und damit zusammenhängend die Ernte sind stark wetterabhängig, so daß der Alkaloidgehalt von Jahr zu Jahr unterschiedlich ist. Die Ernte ist sehr arbeitsintensiv, da die Sklerotien oftmals vor der Ernte zu Boden fallen und das Sieben teilweise Schwierigkeiten bereitet. Ebenso ist die Infektion benachbarter Felder ein großes Problem, so daß schon früh mit der Untersuchung und Entwicklung anderer Kultivierungsverfahren wie der Submerskultivierung begonnen wurde. Noch bis zum Jahr 1976 wurden 95 % der Weltjahresproduktion an Ergotalkaloiden durch parasitäre Kultivierung hergestellt [CRUEGER UND CRUEGER, 1989]. 1978 wurde diese Methode in der Schweiz eingestellt und später auch in anderen Ländern, so daß sie mittlerweile von der Submerskultur weitgehend verdrängt worden ist [ESSER UND DÜVELL, 1984].

Eine andere Kultivierungsmethode bietet die Oberflächenkultur, die von KYBAL UND SIKYTA [1986] mit *Claviceps* durchgeführt wurde.

Die Weltjahresproduktion an Peptidalkaloiden lag 1976 bereits bei 4.000 kg/a und an Lysergsäure bei 12.000 kg/a [FLOSS, 1976].

### 2.3.3 Kultivierung im Submersverfahren

Die ersten Erfolge in der Produktion von Ergotalkaloiden in Oberflächenkulturen verbuchte ABÉ Ende der vierziger Jahre in Japan. Ihm gelang kurze Zeit später der Durchbruch der Submerskultivierung durch die Isolierung von Clavinalkaloiden sowohl aus den Mycelien als auch aus der Kulturbrühe [REHACEK, 1990]. Obwohl die Clavinalkaloide keine praktische Anwendung fanden, zeigten die ersten Arbeiten, daß die Alkaloidproduktion *in vitro* möglich war; zugleich trugen sie einen erheblichen Anteil an der Aufklärung des Biosynthesewegs bei. Das pharmakologisch bedeutende Ergopeptid Ergotamin konnte zuerst 1953 von STOLL in saprophytischer Oberflächenkultivierung hergestellt werden [KOBEL UND SANGLIER, 1986]. Die Weiterentwicklung zur großtechnischen Produktion dieser Substanz wurde Mitte der sechziger Jahre zuerst von TONOLO [1966] (Isolierung von Ergotamin aus Schüttelkulturen) und von AMICI [1966] (Farmitalia) erfolgreich begonnen. Dabei erreichte AMICI Alkaloid-Ausbeuten von 1.100-1.500 mg/L, davon 85 % Ergotamin. Kurze Zeit später gelang die Isolierung von Ergotoxinen aus Submerskultivierungen. Die Probleme bei der Entwicklung und Anwendung dieser Kultivierungsmethode sind, daß sich die Alkaloide in den Zellen anreichern und nicht in das Medium abgegeben werden, so daß am Ende einer Fermentation der Zellaufschluß und die Extraktion der Alkaloide notwendig werden. Außerdem ist es äußerst schwierig, stabile *Claviceps*-Stämme zu finden, die nicht nach kurzer Zeit degenerieren. Die unterschiedlichen Methoden der Isolierung und Selektion der Stämme sowie eine Zusammenstellung alkaloidproduzierender Stämme findet sich bei SCHMAUDER [1996]. Somit lag und liegt bis heute ein besonderes Gewicht auf der Stammhaltung der Hochleistungsstämme.

Bei Submerskultivierungen von *Claviceps*-Stämmen treten zusätzlich folgende Probleme auf:

- Die lange Kultivierungszeit von 2-3 Wochen stellt hohe Anforderungen an den steriltechnischen Standard einer Anlage.
- Die Organismen reagieren stark auf kleine Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums, so daß auf eine strenge Einhaltung der Medienkomposition zu achten ist. Zugabe von z.B. Antischaummitteln kann je nach Stamm zu einer Einbuße in der Produktivität führen.
- Die Stämme sind im allgemeinen sehr empfindlich gegenüber mechanischer Belastung (Scherstreß), besitzen aber gleichzeitig einen hohen Sauerstoffbedarf (vgl. Kapitel 2.3.3.2), so daß eine Änderung von Rührergeschwindigkeit und/oder Begasung nicht beliebig erfolgen kann.

#### 2.3.3.1 Morphologie

Die morphologische Entwicklung des Mycels in Submerskulturen von *Claviceps purpurea* zeigt signifikante Unterschiede zwischen alkaloidbildenden und degenerierten Stämmen. So konnten bereits 1968 MANTLE UND TONOLO zeigen, daß das Mycel bei alkaloidbildenden

Stämmen aus filamentösen, dünnwandigen Hyphen (die Zellen enthalten einige Nuklei und Mitochondrien, kleine Vakuolen und Lipidtröpfchen machen 20 % des Volumens aus) in ein Stadium übergeht, das dem der parasitisch gewachsenen Sklerotiumzellen ähnelt: verkürzte, dickwandige Zellen, die eine höhere Anzahl an Nuklei sowie große Vakuolen und einen hohen Fettanteil besitzen. Diese Beobachtung trifft auf die meisten Produktionsstämme zu, während die unproduktiven diese Umwandlung nicht durchführen [REHACEK, 1983; KOBEL UND SANGLIER, 1986; DIDEK-BRUMEC ET AL., 1996]. Die Bildung sklerotischer Zellen kann durch Zugabe verschiedener Farbstoffe zum Kulturmedium (z.B. Methylenblau, Fluorescein) induziert werden. Des Weiteren läßt sich die Entwicklung durch bestimmte Medienkomponenten (Citronensäure, Ammoniumsulfat oder erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen) beeinflussen [REHACEK, 1991]. Untersuchungen haben gezeigt, daß die alkaloidproduzierenden Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch in ihrem Metabolismus den Sklerotienzellen ähneln müssen [DIDEK-BRUMEC ET AL., 1996]. So produzieren Hochleistungsstämme keine Konidien und sind in der Regel heterokaryotisch [SPALLA UND MARNATI, 1978]. SOCIC ET AL. [1985] konnten feststellen, daß der RNA-Gehalt in den Zellen zum Zeitpunkt der morphologischen Umwandlung rapide absinkt, während der DNA-Gehalt weiter ansteigt. Ein Vergleich der DNA-Gehalte von Hochleistungsstämmen mit Stämmen, die nur wenig Alkaloide produzieren, zeigt einen um das vierfache höheren Gehalt beim Hochleistungsstamm. Kleine Wachstumsraten führen zu erhöhter Ergopeptidproduktion, wie MILICIC ET AL. zeigen konnten, wobei die Autoren als Grund die mögliche Repression der an der Alkaloidproduktion beteiligten Enzyme bei schnellerem Wachstum angeben [DIDEK-BRUMEC ET AL., 1996].

### 2.3.3.2 Physiologie und Regulation der Ergotalkaloidproduktion

Für eine erfolgreiche Produktion der Ergotalkaloide in Submerskultur in hohen und gleichbleibenden Ausbeuten ist neben der Entwicklung und dem Einsatz eines Hochleistungsstammes eine optimale Medienzusammensetzung erforderlich. Folgende Faktoren können die Ergotalkaloidproduktion beeinflussen:

**Kohlenstoffquelle:** Für eine erfolgreiche Alkaloidproduktion werden langsam abbaubare, nicht hemmende Substanzen als Kohlenstoffquelle eingesetzt: Mannitol, Sorbitol und hauptsächlich Saccharose. Glucose als leicht verwertbare Kohlenstoffquelle ist zwar eine sehr gute Energiequelle für ein schnelles Zellwachstum, jedoch zeigt sie bei der Ergotalkaloidproduktion (und ebenso bei der Produktion anderer Sekundärmetabolite wie z.B. Penicillin) einen inhibitorischen Effekt.

Extrazelluläre Saccharose wird während der Kultivierung von *Claviceps purpurea* zunächst mittels  $\beta$ -D-Fruktofuranosidase umgesetzt (bei *Claviceps paspali* durch eine Endosucrase). Die Umsetzung der Saccharose resultiert in freier Glucose und Fructose, die hauptsächlich in Oligosacchariden eingebaut wird [KREN ET AL., 1984]. Die freigesetzte Glucose wird sofort verstoffwechselt oder in  $\beta$ -D-Glucanen eingebaut, die als weitere Nährstoffquellen dienen.

Glucane werden zum größten Teil zu Beginn der Kultivierung gebildet und zum späteren Zeitpunkt (in der Sklerotium-Phase) wieder metabolisiert.

Nachdem die Glucose verstoffwechselt worden ist, wird auch die Fructose metabolisiert. Jedoch hemmt freie Fructose das Zellwachstum. Die Oligosaccharide, die aus 70-80% Fructose bestehen, bleiben im Medium und dienen als Reservequelle. Sie werden erst gegen Ende der Kultivierung metabolisiert [REHACEK, 1991].

Saccharose (oder ein anderes Disaccharid) wird in hohen Konzentrationen von 200-300 g/L im Produktionsmedium eingesetzt, um so den von den Zellen für die Alkaloidbildung benötigten hohen osmotischen Druck (10-20 bar) zu erhalten [KOBEL UND SANGLIER, 1986]. Es wird davon ausgegangen, daß der hohe osmotische Druck für die morphologische Umwandlung der Zellen mitverantwortlich ist. Die hohen Zuckerkonzentrationen können teilweise durch Zugabe von Salzen (z.B. NaCl) ersetzt werden [PUC UND SOCIC, 1977].

**Carbonsäure:** Neben Saccharose als C-Quelle ist das Vorhandensein einer Säure aus dem Tricarbonsäure-Cyclus (TCC) oder einer entsprechenden Säure unabdingbare Voraussetzung für die Alkaloidproduktion. In der Regel werden Citronensäure, Bernsteinsäure, Malonsäure oder Oxalsäure eingesetzt. Ihr Einfluß auf die Alkaloidproduktion wird auf ihre steigernde Wirkung des TC-Cyclus zurückgeführt. Die genauen Mechanismen sind noch nicht bekannt. DIDEK-BRUMEC ET AL. [1996] verdeutlichen in ihrem Artikel die teils widersprüchlichen Ergebnisse. Während teilweise davon ausgegangen wird, daß ein Umschalten vom Tricarbonsäure-Cyclus zum Glyoxylsäure-Cyclus zu Beginn der Alkaloidproduktion stattfindet (was die Bereitstellung von Acetyl-CoA zur Folge hat) [UDVARDY, 1980], konnten DIDEK-BRUMEC ET AL. keine Enzymaktivität der am Glyoxylsäure-Cyclus beteiligten Enzyme und eine beständige Aktivität der am TCC involvierten Enzyme ausmachen. Ferner konnten sie feststellen, daß zu Beginn der Produktionsphase die Aktivität der Citrat-Synthase ebenso wie die der ATP-Citrat-Lyase in den Mitochondrien ein Maximum durchläuft. Die Autoren stellten die Hypothese auf, das Citrat könnte im Cytosol durch ATP-Citrat-Lyase in Acetyl-CoA umgewandelt werden, welches als ein wichtiger Ausgangsstoff für die Synthese von Mevalonsäure (als Precursor der Ergotalkaloide) und Fettsäuren gilt. Dadurch läßt sich die mit der Alkaloidsynthese einhergehende Synthese von Fettsäuren erklären.

Beide zugegebenen Kohlenstoffquellen werden von dem Organismus gleichzeitig, d.h. ohne Diauxie-Effekt metabolisiert [CRUEGER UND CRUEGER, 1989].

**Phosphat:** Anorganische Phosphatverbindungen spielen ebenfalls eine große Rolle in der Alkaloidsynthese, die bisher noch nicht vollständig erklärt werden konnte. Hohe Phosphatkonzentrationen im Medium zu Beginn der Kultivierung inhibieren die Produktion oder stoppen diese bei Phosphatzugabe unabhängig von der Kultivierungszeit [ROBBERS, 1978; LOHMEYER ET AL., 1990]. Die Alkaloidsynthese beginnt erst dann, wenn kein Phosphat mehr vorhanden ist. Da Zellen Phosphat als Energiequelle und zum Zellaufbau benötigen, ergibt sich ein für jeden Stamm unterschiedliches Optimum der Phosphatkonzentration. LOHMEYER ET AL. [1990] konnten zeigen, daß das Optimum der Phosphatkonzentration bei Immobilisie-



rung von *Claviceps purpurea* bei gleichen Kultivierungsbedingungen zu niedrigeren Werten verschoben wurde. Der hemmende Effekt des Phosphats wird darauf zurückgeführt, daß Phosphat zum einen Enzyme der Alkaloidsynthese (DMAT-Synthase, Chanoclavin-Cyclase) inhibiert und zum anderen Ergotalkaloid-abbauende Enzyme aktiviert [REHACEK, 1991]. Des weiteren hemmen hohe Phosphatkonzentrationen die Tryptophansynthese [UDVARDY, 1980].

**Tryptophan:** Tryptophan ist ein essentieller Ausgangsstoff für alle Ergotalkaloide und besitzt wichtige regulatorische Eigenschaften. Es kann zum einen die Alkaloidsynthese induzieren und zum anderen zu einer Erhöhung der Alkaloidausbeute führen [FLOSS AND MOTHE, 1964; VINING, 1970]. Die Zugabe von Tryptophanderivaten induziert ebenfalls die Synthese, wobei die zugesetzten Substanzen nicht metabolisiert werden [KRUPINSKI ET AL., 1976]. Die größte induzierende Wirkung der Aminosäure wird bei Zugabe zum Medium lange vor der einsetzenden Alkaloidsynthese erreicht [DIDEK-BRUMEC ET AL. 1996]. Weiterhin konnte der induzierende Effekt von Tryptophan auf die an der Ergolinringsynthese beteiligten Enzyme wie die DMAT-Synthase [KRUPINSKI ET AL., 1976] und die Chanoclavin-Cyclase [s. REHACEK, 1991] gezeigt werden. Die inhibierende Wirkung hoher Phosphatkonzentrationen kann durch die Zugabe von Tryptophan aufgehoben werden [ROBBERS ET AL., 1972].

**Stickstoffquelle:** Die von den meisten Stämmen bevorzugte Stickstoffquelle ist das Ammoniumsalz einer Carbonsäure. Teilweise können auch Aminosäuren wie Asparagin oder seltener Aspartam eingesetzt werden. Die Zugabe von komplexen Stoffen wie Pepton führte ebenfalls zu einer Steigerung der Alkaloidproduktion, jedoch ist dies sehr stark vom eingesetzten Stamm abhängig und kann gegebenenfalls eine Hemmung der Biosynthese bewirken [KOBEL UND SANGLIER, 1986]. Optimale Stickstoffkonzentrationen liegen zwischen 2,5-5,0 g/L. Daraus ist zu erkennen, daß aufgrund der hohen Zuckerkonzentrationen im Medium das Verhältnis C:N mit Werten zwischen 20-50 außergewöhnlich hoch liegt im Vergleich zu anderen Fermentationen (im Bereich um 20).

**pH-Wert, Temperatur:** Im allgemeinen erfolgt die Kultivierung im pH-Bereich zwischen 4,6-6,3 (Optimum: 5,2-5,8), in dem die Carbonsäuren schnell in die Zellen aufgenommen und metabolisiert werden können. Die meisten Stämme werden bei Temperaturen zwischen 20–30 °C (Optimum: 23-26 °C) kultiviert [SCHMAUDER, 1996].

**Inokulum:** Eine optimale Ergotalkaloidproduktion bedingt eine 10-20 %-ige (v/v) Vorkultur, die sich am Ende der Wachstumsphase befindet. Neben der Medienzusammensetzung, den Inkubationsbedingungen (z.B. Belüftungsrate) spielt das Alter des Inokulums eine entscheidende Rolle. In der Regel liegt die Anzuchtzeit zwischen 4-7 Tagen.

**Mineralstoffe:** Die meisten *Claviceps* Stämme benötigen für eine erfolgreiche Alkaloidsynthese die Metall-Ionen  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  sowie in geringen Konzentrationen teilweise auch  $Mg^{2+}$ .

**Aminosäuren:** Die Zufütterung mit Aminosäuren, die das Tripeptid der Ergopeptine aufbauen, ist nicht zwingend notwendig. Bei einzelnen Stämmen konnte jedoch gezeigt werden, daß durch Zugabe einer Aminosäure in das Medium die Produktion des Ergopeptins, das diese Säure im Tripeptid besitzt, gesteigert wurde, während die Produktion der anderen Ergopeptine



*Phase 2: Differenzierung*

Die bis zum 6. und 7. Tag reichende Phase ist durch eine verringerte Proliferation und lineares Wachstum gekennzeichnet. Die Zellen sind kürzer, besitzen verdickte Zellwände und die Hyphen agglomerieren zu Pellets. Die Ergotalkaloid-Synthese und parallel dazu die Lipidsynthese setzen ein, während die Atmung abnimmt.

*Phase 3: Akkumulation*

Bis zum 12. - 14. Tag hört die Proliferation auf. Die Biomasse nimmt allerdings weiter zu, was hauptsächlich durch die Anreicherung von Lipiden in den Vakuolen bedingt ist. Die Alkaloidsynthese läuft weiter.

*Phase 4: Lyse*

Nach ungefähr 16 Tagen beginnen die Zellen zu lysieren.

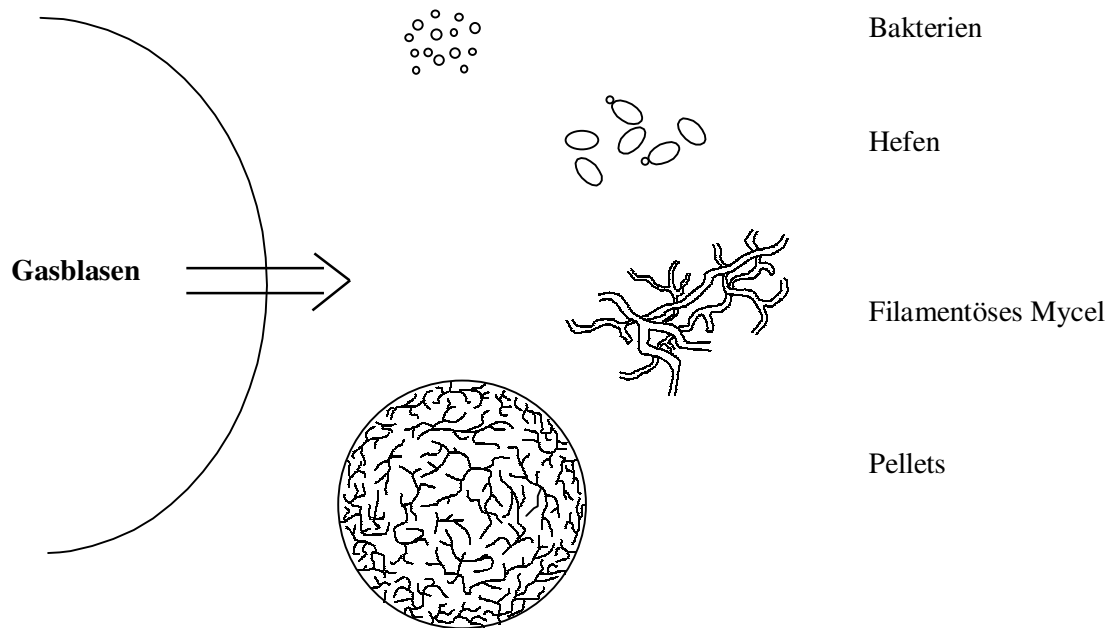
**2.4 Sauerstoffversorgung**

Mikroorganismen besitzen im allgemeinen einen wesentlich höheren Sauerstoffbedarf je Masseneinheit als andere Organismen [DELLWEG, 1987], so daß Sauerstoff in Fermentationen von Mikroorganismen eine entscheidende Rolle spielt. Daher muß der Sauerstoffeintrag in das Medium bei Kultivierungen in der gleichen Größenordnung liegen wie die Sauerstoffaufnahme. Für eine ausreichende Versorgung eines Organismus mit einem Stoff ist nicht nur die Aufnahme, sondern auch die Löslichkeit des Stoffes im Medium entscheidend darüber, ob eine ausreichende Versorgung des Organismus mit dem jeweiligen Stoff (wie z.B. Sauerstoff) gewährleistet ist. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser bzw. im Medium äußerst gering ist, muß dieser ständig während der Kultivierungen nachgeliefert werden. Die Sauerstofflöslichkeit in einer Lösung in Abhängigkeit vom Sauerstoff-Partialdruck wird über das Henry'sche Gesetz beschrieben [CRUEGER UND CRUEGER, 1989]:

$$C^* = \frac{P_0}{H} \quad \begin{array}{l} C^*: \text{O}_2\text{-Sättigungskonzentration} \\ P_0: \text{O}_2\text{-Partialdruck in der Gasphase} \\ H: \text{Henry Konstante} \end{array} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

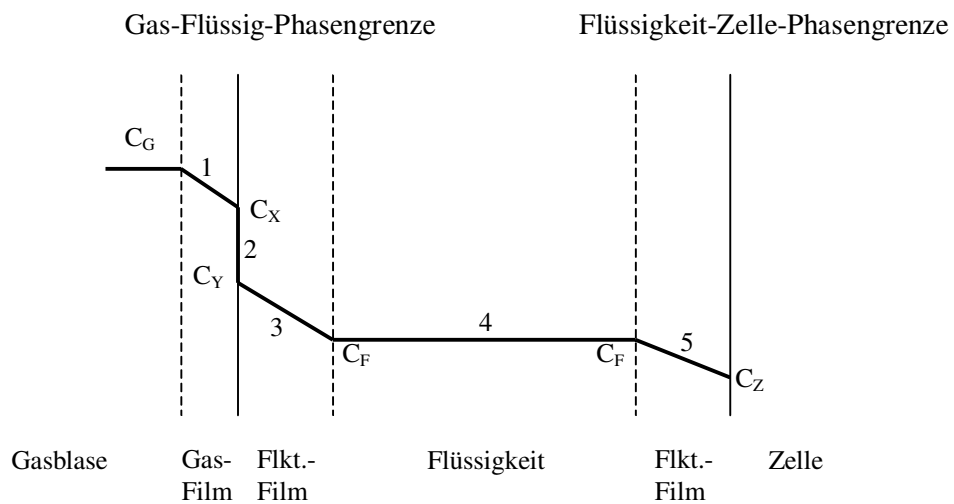
Bei 20 °C und 1 bar Luftdruck ( $p(\text{O}_2) = 0,209 \text{ bar}$ ) sind im Wasser  $2,88 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/L}$  bzw. 7,7 mg/L  $\text{O}_2$  gelöst.

Aufgrund der geringen Sauerstofflöslichkeit muß der Transport aus der Gasblase zu den einzelnen Zellen oder Pellets betrachtet werden (s. Abb. 2-7).

**Abbildung 2-7.**

Schematische Darstellung des Sauerstofftransports zu unterschiedlichen biologischen Systemen [REUSS, 1993].

Dieser Sauerstofftransport aus der Gasblase zu den einzelnen Zellen erfolgt durch Überwindung mehrerer Teilwiderstände, die in Abbildung 2-8 dargestellt sind [CRUEGER UND CRUEGER, 1989]:

**Abbildung 2-8.**

Schematische Darstellung der Teilwiderstände beim Sauerstofftransport aus der Gasblase in die Zelle [CRUEGER UND CRUEGER, 1989]. (Flkt.-Film: Flüssigkeitsfilm).

1. Widerstand innerhalb des Gasfilms zur Phasengrenzfläche
2. Durchdringen der Phasengrenzfläche
3. Transport von der Phasengrenzfläche in die Lösung
4. Bewegung innerhalb der Lösung
5. Transport an die Zelloberfläche.

Welcher dieser Widerstände bzw. dessen Überwindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Sauerstofftransport ist, hängt von der Struktur des biologischen Materials ab. So ist in den meisten Fällen bei Einzelzellen (Bakterien oder Hefen) der Widerstand in der Phasengrenzfläche Gas-Flüssigkeit geschwindigkeitsbestimmend, während es bei Zell-Pellets der Sauerstofftransport in das Zellagglomerat ist.

Der Übergang von Sauerstoff aus der Gas- in die flüssige Phase kann anhand der Zweifilm-Theorie erklärt werden [DELLWEG, 1987]. Danach wird davon ausgegangen, daß der Sauerstofftransport durch den Gas- und den Flüssigkeitsfilm nur durch Diffusion, im Kernbereich von Gas bzw. Flüssigkeit durch Konvektion stattfindet. Aufgrund der wesentlich größeren Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs in der Luft im Gegensatz zur Flüssigkeit kann der Widerstand der Gasphase vernachlässigt werden. Die treibende Kraft des Stoffübergangs stellt das Konzentrationsgefälle zwischen Gas- und flüssiger Phase dar, so daß der Massenstrom von Sauerstoff in das Medium mit Gleichung 2-2 beschrieben werden kann.

$$N_{O_2} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad \text{mit:} \quad (\text{Gl. 2-2})$$

$N_{O_2}$ : Volumenbezogener Massentransfer [ $\text{mM O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]  
 $k_L$ : Stoffübergangskoeffizient an der Phasengrenzfläche [ $\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ]  
 $a$ : spezifische Austauschfläche [ $\text{m}^2 \cdot \text{L}^{-1}$ ]  
 $C_L^*$ : Sättigungswert des gel. Gases an der Phasengrenzfläche [ $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ]  
 $C_L$ : Konzentration des gelösten Gases [ $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ]

Genaue mathematische Betrachtungen sind bei SCHÜGERL [1985] zu finden.

Der Term  $k_L a$  wird als volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient bezeichnet, der eine wichtige Kenngröße eines Reaktors für die Effizienz des Sauerstoffeintrags in das Medium ist. Er ist sowohl vom Reaktor-Design (Durchmesser, Rührleistung, Füllvolumen, Belüftungssystem und -rate) als auch von der Dichte, der Viskosität, der Zusammensetzung des Mediums und der Struktur der Mikroorganismen abhängig.

Falls das Zellwachstum sauerstofflimitiert ist, hängt die Wachstumsgeschwindigkeit von der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium ab. Unter Verwendung des Monod-Modells wird die spezifische Wachstumsrate definiert als:

$$Q_{O_2} = Q_m \frac{C_L}{K_O + C_L} \quad \text{mit:} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

$Q_{O_2}$ : spez.  $O_2$ -Aufnahmerate/TS [ $\text{mM O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]  
 $K_O$ : Monod-Konstante für Sauerstoff [ $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ]  
 $Q_m$ : spez. max. Aufnahmerate [ $\text{mM O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]

Die volumetrische Sauerstoffaufnahme  $[mM O_2 \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}]$  stellt das Produkt von  $Q_{O_2}$  und der atmenden Zellmasse  $X$  dar, die im Gleichgewichtszustand gleich der Sauerstofftransportrate ist:

$$Q_{O_2} X = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (\text{Gl. 2-4})$$

Während einer Kultivierung ist die Sauerstoffaufnahme keine Konstante. Die Sauerstoffaufnahme von Bakterien und mycelbildenden Mikroorganismen zeigen charakteristische Unterschiede auf [CRUEGER UND CRUEGER, 1989]. Während der exponentiellen Wachstumsphase sinkt der Gelöstsauerstoffgehalt und die Aufnahme steigt an. Erreicht der Gelöstsauerstoffgehalt seinen kritischen Wert, so bleibt bei einer Bakterienkultur die Aufnahme konstant, bis ein anderes Substrat limitierend wird. Im Falle einer Pilzkultivierung nimmt die Sauerstoffaufnahme bei  $O_2$ -Limitierung wieder ab, was auf die Viskositäts- bzw. Erhöhung der Mycelmasse zurückgeführt wird. Der kritische Sauerstoffgehalt im Medium bezeichnet die Konzentration, bei der noch ungehinderte Respiration möglich ist. Dieser Wert ist zum einen von den Mikroorganismen abhängig; bei verschiedenen Mikroorganismen liegen die Werte der kritischen Sauerstoffkonzentration zwischen 2-25 % des Sauerstoffsättigungswertes. Zum anderen zeigen die rheologischen Bedingungen des Mediums einen Einfluß. So ist die kritische Sauerstoffkonzentration in Newton'schen Lösungen (z.B. Bakterien- oder Hefekultivierungen) konstant, während sie in nicht-Newton'schen Lösungen von den Kultivierungsbedingungen beeinflußt wird [CRUEGER UND CRUEGER, 1986]. Newton'sche Lösungen zeichnen sich dadurch aus, daß die dynamische Viskosität (bei konstanter Temperatur) konstant ist. Bei Kultivierungen von Mikroorganismen ändert sich die Zusammensetzung des Mediums ständig, da Substrate verbraucht werden. Gleichzeitig nimmt die Mycelmasse zu und neue Stoffwechselprodukte werden in das Medium abgegeben. Im Falle von *Claviceps purpurea* führt die Bildung der Glucane etc. zu einer Erhöhung der Viskosität, wodurch sich die Medien wie nicht-Newton'sche Lösungen verhalten [REHACEK, 1990]. Die Energie, die aufgebracht werden muß, um eine bestimmte Sauerstofftransferrate bei Kultivierungen in nicht-Newton'schen Lösungen zu gewährleisten, ist wesentlich höher als bei Newton'schen Lösungen.

Ein Hauptproblem bei Kultivierungen von *Claviceps purpurea* im Submersverfahren besteht in der ausreichenden Sauerstoffversorgung der Zellen (s. Kapitel 2.3). Durch die hohe Scherstreßempfindlichkeit ist eine unbegrenzte Erhöhung der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate nicht möglich. Um die Sensibilität gegenüber mechanischer Belastung zu verringern, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen *Claviceps*-Stämme auf Polymermatrices immobilisiert. Dabei haben sich Immobilisierungsmethoden mit Calcium-Alginat als Polymermatrix durchgesetzt. KOPP UND REHM [1983] stellten bei ihren Versuchen mit einem *Claviceps purpurea*-Stamm, der hauptsächlich Clavinalkaloide und Ergometrin bildet, fest, daß eine Immobilisierung auf 8 %-igem Ca-Alginat zu einer Steigerung des Gesamtalkaloidgehaltes führte.

Gleichzeitig jedoch verschob sich das Substanzspektrum auf die Seite der Clavinalkaloide, wobei als Hauptprodukt das pharmakologisch unbedeutende Agroclavin erhalten wurde. Native Zellen hingegen konnten Agroclavin zu Elymoclavin oxidieren. Demzufolge scheint die Immobilisierung eine verringerte Sauerstoffdiffusion in die Pellets und damit eine Hemmung des oxidativen Enzymsystems zu bewirken.

In einer semikontinuierlichen Kultivierung zeigten immobilisierte Zellen eine höhere Langzeitstabilität als native Zellen [KOPP UND REHM, 1984].

Bei Immobilisierungen unterschiedlicher *Claviceps*-Stämme konnten morphologische Veränderungen zu arthrosporenartigen (gewebeartigen) Strukturen der parasitären Sklerotien beobachtet werden [KREN ET AL., 1987; PERTOT ET AL., 1988].

Da die meisten Stämme, die Ergopeptinalkaloide produzieren, diese nicht in das Medium ausschleusen, sondern intrazellulär speichern, ist die erfolgreiche Kultivierung immobilisierter Zellen schwieriger. LOHMEYER UND SANDER [1993] verwendeten daher eine Mutante eines *Claviceps purpurea*-Stammes, die hauptsächlich Ergotamin produziert und die Produkte in die Kulturbrühe ausschleust. In ihrer Arbeit verglichen die Autoren Kultivierungen nativer und immobilisierter Zellen in verschiedenen Reaktortypen. In Schüttelkulturen in Fernbachkolben ergaben native Zellen höhere Produktausbeuten (78 %) als immobilisierte, und zeigten gleichzeitig eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Kolbengröße oder der Schüttelgeschwindigkeit. Die Sauerstofftransferrate in den Fernbachkolben für die nativen Zellen lag zwischen 40-46 mmol L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (in Abhängigkeit von der Kolbengröße). Kultivierungen in einer Blasensäule und im Rührkesselreaktor ergaben für beide Systeme eine Minderung in der Ausbeute um etwa 30 %, wobei die Produktion der freien Zellen die der immobilisierten wieder deutlich übertraf (72 bzw. 118 %). Im Rührkesselreaktor konnte bei den freien Zellen ein höherer Sauerstoffbedarf als bei den Immobilisaten festgestellt werden. Als Ursache wird dabei die Produktion von Glucanen und die damit steigende Viskosität des Mediums der nativen Zellen genannt.

MERKEL [1996] verglich verschiedene Kultivierungssysteme für die Ergopeptidproduktion mit einem *Claviceps purpurea*-Stamm. Dabei ergaben Kultivierungen von nativen Zellen in einem Rührkesselreaktor höhere Ausbeuten als Kultivierungen immobilisierter Zellen in Rührkessel, Blasensäule oder Wirbelschicht (Labor- und Pilotanlage). Die Gründe dafür liegen in der geringen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen im Inneren des Pellets.

#### **2.4.1 Alternative Systeme zur Sauerstoffversorgung**

Da die Sauerstoffversorgung der Zellen in Kultivierungen die zentrale Rolle spielt, wurden seit Anfang der 80er Jahre neue Systeme entwickelt, um den Sauerstoffeintrag zu erhöhen. Eine konventionelle Methode stellt dabei die Begasung mit sauerstoffangereicherter Luft oder reinem Sauerstoff dar. ADLERCREUTZ UND MATTIASSON [1982] verwendeten Hämoglobin als Sauerstofftransportmolekül bei einer Kultivierung von immobilisierten *Gluconobacter oxydans*-Zellen und konnten dabei eine Zunahme des oxidierten Produktes (Dihydroxyaceton) mit steigendem Hämoglobingehalt beobachten. Allerdings zeigte das System einige Nachteile,

wie z.B. die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin, wodurch eine wiederholte Verwendung des Proteins erschwert wurde.

Die Zugabe von hohen Sojaöl-Konzentrationen (19 % v/v) während einer *Aerobacter aerogenes* Fermentation ergab eine Erhöhung des  $k_{La}$ -Wertes um den Faktor 1,85 [ROLS UND GOMA, 1991].

Aus der Frage, ob Sauerstoff in flüssiger Form zu einer Nährlösung zugegeben werden kann, um die  $O_2$ -Aufnahme zu erleichtern, entwickelte SCHLEGEL [1977] die Methode, Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) als Sauerstoffdonor einzusetzen.  $H_2O_2$  besitzt jedoch zelltoxische Eigenschaften, so daß die Mikroorganismen Katalasen oder Peroxidasen bilden, die das reaktive  $H_2O_2$  in Sauerstoff und Wasser umsetzen [SCHLEGEL, 1992]. Kultivierungen von *Alcaligenes eutrophus* mit unterschiedlichen  $H_2O_2$ -Konzentrationen ergaben, daß Konzentrationen bis 8 mM keinen Einfluß auf das Wachstum hatten, während 11 mM das Zellwachstum unterdrückten. Die Zugabe von Katalase in das Medium führte zu einer schnelleren Spaltung des  $H_2O_2$ , so daß in diesem System  $H_2O_2$ -Konzentrationen bis 1 M keine Auswirkungen auf das Zellwachstum zeigten. Nähere Untersuchungen ergaben, daß bei  $H_2O_2$ -Zugabe über einen längeren Zeitraum (8-16 h) und bei hohen Zelldichten (5-20 g TS/L) Zellschäden und somit geringeres Wachstum auftraten. Gleichzeitig konnte ein Einfluß auf die Morphologie der *A. eutrophus*-Zellen festgestellt werden [IBRAHIM UND SCHLEGEL, 1980a]. Trotz der Zugabe von Katalase in hohen Mengen, konnte die  $H_2O_2$ -Konzentration im Medium nicht auf ein kleineres Niveau gesenkt werden. Diese unvollständige Umsetzung scheint in der geringen Affinität des Enzyms zum Wasserstoffperoxid zu liegen. Ferner ist bei kontinuierlicher  $H_2O_2$ -Zugabe eine Inaktivierung des Enzyms zu beobachten, weshalb dem System immer wieder neue Enzymlösung während der Kultivierung zuzuführen ist [IBRAHIM UND SCHLEGEL, 1980b]. In weiteren Untersuchungen konnte eine Katalase aus *E. coli* K12 isoliert werden, die sich für das System Wasserstoffperoxid/Katalase wesentlich besser eignet als die zuvor verwendete Bovine Liver Katalase [NIES UND SCHLEGEL, 1984].

Die Sauerstoffversorgung durch Wasserstoffperoxid bei immobilisierten *Gluconobacter oxydans* Zellen zeigten HOLST ET AL. [1982]. Diese Zellen produzieren ausreichend Katalase, so daß eine Zufütterung nicht notwendig ist. Gleiches gilt für *Pseudomonas oleovorans* Gpol (TF4-1L) Zellen, die SONNLEITNER UND HAHNEMANN [1997] bei Versuchen zur Sauerstoffversorgung mit Wasserstoffperoxid verwendeten. Sie konnten mit den Parametern Gelöstsauerstoff ( $pO_2$ ) sowie Sauerstoffgehalt im Abgas eine  $H_2O_2$ -Regelung für die Kultivierung dieses Stammes etablieren.

Um die Sauerstoffversorgung immobilisierter *Claviceps purpurea* Zellen im Inneren der Pellets zu verbessern, entwickelte REISS [1990] ein System, in dem Katalase co-immobilisiert und Wasserstoffperoxid als zusätzliche Sauerstoffquelle zum Medium zugegeben wurde. Dadurch sollte Sauerstoff unmittelbar in Zellnähe freigesetzt und die Diffusionswege gering gehalten werden. Mit diesem System ließ sich die Alkaloidausbeute gegenüber der Kultivierung von Immobilisaten bei konventioneller Begasung im Rührkesselreaktor steigern.



Neben der teilweise instabilen Katalase können auch andere Katalysatoren (Aktivkohle, Manganoxide) zur Spaltung des Wasserstoffperoxids eingesetzt werden [DUVNJAK UND LILLY, 1976; CHO UND BAILEY, 1977].

Neben der Zugabe von Sauerstoff in Form von Wasserstoffperoxid kann die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der flüssigen Phase durch den Einsatz von bestimmten, organischen Lösemitteln erfolgen. In diesen Lösemitteln ist die Sauerstofflöslichkeit um ein Vielfaches höher als im Wasser bzw. Medium. Untersuchungen zeigten, daß Kohlenwasserstoffe wie Kerosin [MIMURA ET AL., 1969], Hexadecan [COTY ET AL., 1971] oder n-Pentadecan [MATSUMURA ET AL., 1972] als Additive in wäßrigen Systemen die Sauerstoffaufnahme erhöhen. Der Einsatz von Kohlenwasserstoff-Emulsionen (Mischung aus n-Tridecan bis n-Heptadecan) unterschiedlicher Konzentration bei Kultivierungen von *Aerobacter aerogenes* ergab einen Anstieg der Sauerstoffaufnahme mit zunehmender Lösemittelkonzentration. Dadurch konnten sowohl das Wachstum als auch die Produktion gesteigert werden [TORRIJOS, zitiert in ROLS UND GOMA, 1989]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Kultivierungen von *Penicillium chrysogenum* in Schüttelkolben und im 12,5 L-Reaktor bei Zugabe von n-Hexadecan zum Nährmedium [HO ET AL., 1990]. Der Einsatz von n-Octan und flüssigem Paraffin bei Kultivierungen verschiedener *Claviceps* Stämme (Produkte: Clavinalkaloide und einfache Lysergsäurederivate) führte in einigen Fällen zu einer Steigerung der Alkaloidproduktion [GIL'MANOV ET AL., 1996].

Perfluorierte Kohlenwasserstoffe (PFC) weisen ebenfalls hohe Löslichkeiten für Sauerstoff und andere Gase auf, die in Tabelle 2-2 vergleichend mit anderen Lösemitteln dargestellt sind. Daneben besitzen sie die folgenden Eigenschaften, die sie für eine Verwendung als Blutersatzstoffe auszeichnet:

- Chemische und biologische Inertheit
- Leicht sterilisierbar (autoklavierbar), da thermisch stabil
- Recycling-Fähigkeit

Demzufolge ist auch ihr Einsatz bei Kultivierungen von Mikroorganismen, die einen hohen Sauerstoffbedarf zeigen, getestet worden. Die perfluorierten Kohlenwasserstoffe werden dabei entweder rein oder als Emulsion mit einem Tensid (z.B. Pluronic F68) eingesetzt.

**Tabelle 2-2.**

Löslichkeiten [mM] einzelner Gase in perfluorierten Kohlenwasserstoffen und anderen Flüssigkeiten (25 °C, 1,013 bar) [MATTIASSON UND ADLERCREUTZ, 1987].

Lösemittel	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	CO	H <sub>2</sub>	He
Wasser	1,3	33,8	0,6	1,0	0,8	0,4
Ethanol	9,2	100,0	5,6	7,6	3,2	1,2
Aceton	10,5	230,9	6,7	9,6	3,7	1,3
CCl <sub>4</sub>	11,4	99,6	6,1	8,3	3,2	-
Benzol	8,4	100,3	4,6	6,9	2,7	0,8
F-Benzol	19,5	174,1	14,2	16,8	-	1,7
F-Butyltetrahydrofuran	21,9	78,5	13,6	-	-	-
F-Decalin	16,5	73,4	12,1	13,2	-	3,1
Bis-(F-butyl)-ethen	19,7	97,0	-	-	-	-

Erste Kultivierungen in 2-Phasen-Systemen mit perfluorierten Kohlenwasserstoffen wurden mit *Gluconobacter oxydans* durchgeführt, wobei Produktsteigerungen mit zunehmender Konzentration an Perfluorotributylamin beobachtet wurden [CHIBATA, in MATTIASSON UND ADLERCREUTZ, 1987]. Ebenso positiv beeinflusst wurden Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* und *Streptomyces*.

**Tabelle 2-3.**

Überblick über Kultivierungen von Mikroorganismen mit Einsatz von PFC [nach LOWE ET AL., 1998].

Mikroorganismus	PFC	Vol. [L]	Steigerungen von	Referenz
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	FC-40*	6,5	O <sub>2</sub> -Aufnahme und BTM	JUNKER ET AL., 1989
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	FC-43	3,0	BTM	YAMAMOTO ET AL., 1992
<i>Candida lipolytica</i>	FC-40*	6,5	O <sub>2</sub> -Aufnahme und BTM	JUNKER ET AL., 1989
<i>Escherichia coli</i>	FC-40*	2,0	O <sub>2</sub> -Transfer	McMILLAN ET AL., 1987
<i>Escherichia coli</i>	FC-40*	0,7/5,0	O <sub>2</sub> -Transfer	JU ET AL., 1991
	FC-77*	0,7/5,0		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FlutecPP6	2,0	O <sub>2</sub> -Transfer und BTM	ELIBOL, 1996
<i>Streptomyces coelicolor</i>	FlutecPP6*	0,5	BTM, Actinorhodinprod.	ELIBOL ET AL., 1995

\* Eingesetzt als Emulsion

Neben dem Einsatz von PFC in Schüttelkulturen oder Rührreaktoren sind von Verfahren berichtet worden, bei denen der Sauerstoff außerhalb des Reaktorraums der PFC-Phase zugeführt wurde. ADLERCREUTZ UND MATTIASSON [1982] verwendeten immobilisierte *Gluconobacter oxydans* Zellen in einem Festbettreaktor und führten durch den Reaktor eine Emulsion aus PFC, die vorher mit Sauerstoff angereichert wurde. DAMIANO UND WANG [1985] führten die Kultivierung von *Escherichia coli* mit Perfluoromethyldecalin in einem Sprühreaktor durch, wobei die PFC-Phase kontinuierlich dem Reaktor entzogen und mit Sauerstoff ange-

---

reichert wieder zugeführt wurde. Tabelle 2-3 zeigt einen Überblick über weitere Kultivierungen mit unterschiedlichen Mikroorganismus/PFC Systemen.

Perfluorierte Kohlenwasserstoffe werden nicht nur bei Pilz- oder Bakterienkultivierungen angewendet, sondern auch bei einigen Kultivierungen von tierischen und pflanzlichen Zellen, die bei LOWE ET AL. [1998] zusammengefaßt sind.

Mechanistische Betrachtungen über den Sauerstofftransport in Emulsionen mit organischen Lösemitteln sind in ROLS ET AL. [1990] zu finden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendeter Stamm

Der bei allen Kultivierungen dieser Arbeit eingesetzte Stamm ist *Claviceps purpurea* 1029 N5, eine Mutante des Stammes 1029, die durch chemische Mutagenese von Protoplasten mit Hilfe von NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) erhalten wurde [KELLER, 1983]. Die eingesetzte Mutante bildet über 500 mg/L Ergotalkaloide, dabei hauptsächlich Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin. Der größte Anteil der Produkte (ca. 60 %) wird in das Medium ausgeschieden [LOHMEYER ET AL., 1990].

Der Stamm wurde freundlicherweise von Herrn Dr. M. Lohmeyer (Institut für Mikrobiologie, Universität Münster) und Herrn PD Dr. U. Keller (Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, TU Berlin) zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.1 Stammhaltung

Der Mikroorganismus wird auf Agarplatten mit T2-Medium (s. Anhang) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gehalten, wobei nach 6 Monaten die Überimpfung auf frische Agarplatten erfolgt. Das T2-Medium enthält Asparagin, das das Wachstum der Pilze fördert, und anstelle von Hefeextrakt wird Nicotinsäureamid verwendet.

Zum Überimpfen des Stammes wird eine bewachsene Agarplatte langsam von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  schrittweise auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , auf  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und schließlich auf Raumtemperatur aufgetaut. Für die Stammhaltung werden frisch gegossene Agarplatten verwendet, deren Oberfläche noch feucht ist, da so ein gleichmäßiges Überimpfen möglich ist. Dazu wird ein ca.  $1\text{ cm}^2$  großes Mycelstück mit Hilfe einer Impföse von der Stammpatte entnommen und von Agarresten befreit. Dieses Stück wird auf die neue Agarplatte gegeben und vorsichtig auf der gesamten Oberfläche ausgestrichen. Die angeimpften Platten werden bei  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  für ca. 7 Tage in einem Brutschrank (Modell 200, Fa. Memmert) inkubiert, bis sich leicht rosafarbene, strukturierte Kolonien gebildet haben. Anschließend werden sie bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 3.1.2 Inokulum

Die Anzucht eines Inokulums erfolgt in zwei Stufen, da somit eine höhere Biomasse erhalten wird. Die Vorkulturen werden in 500 mL Erlenmeyerkolben mit jeweils 80 mL InOc-Medium (s. Anhang) kultiviert, wobei in diesem Medium nur 100 g/L Saccharose enthalten sind. Die Kolben werden für 20 min. bei  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  autoklaviert. Bei diesem Medium und beim Produktionsmedium kann die Sterilisation nicht bei  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  erfolgen, da durch den hohen Zuckergehalt im Medium verstärkt Maillardreaktionen ablaufen, die das Medium stark verändern. Üblicherweise werden die Nährsalzlösung und die Zuckerlösung getrennt autoklaviert und anschließend steril zusammengegeben. Dabei wird eine konzentrierte Zuckerlösung eingesetzt, damit beim Zusammengießen der Flüssigkeiten kein Verdünnungseffekt auftritt. In diesem

Fall ist diese Vorgehensweise nicht möglich, da die hier verwendeten Medien bereits sehr hohe Saccharose-Konzentrationen besitzen.

Für die erste Vorkultur wird eine Stammpatte schrittweise auf Raumtemperatur aufgetaut (s. Kapitel 3.1.1). Anschließend wird unter sterilen Bedingungen ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großes Mycelstück von der Platte mit einer Impföse entnommen, von Agarresten befreit, in einen sterilen Mörser gegeben und vorsichtig gemörsert. Die Mycelstücke werden in ca. 1 mL sterilem InOc-Medium suspendiert und diese Suspension vollständig in den Kolben mit InOc-Medium pipettiert. Diese Vorkultur wird bei 24 °C in einem abgedunkelten Rotationsschüttler (Certomat S mit Inkubationshaube HK, Fa. Braun, Melsungen) bei 200 rpm für 5 Tage inkubiert. Aus dieser Vorkultur werden dann 8 mL Zellsuspension steril in einen zweiten Kolben mit InOc-Medium überführt. Diese 2. Vorkultur wird unter denselben Bedingungen für 2-3 Tage inkubiert.

Zum Beimpfen der Hauptkultur wird der gesamte Kolbeninhalt der 2. Vorkultur in gewogene, sterile 30 mL Zentrifugenbecher gegeben und die Zellmasse bei 6000 rpm, 4 °C für 20 min. zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Fa. Braun). Der Überstand wird abdekantiert, die Zellen in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert und nochmals bei obigen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes wird das Feuchtgewicht bestimmt und anschließend eine 10 %-ige [g Feuchtgewicht/L Medium] Zellsuspension mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> hergestellt.

Für die Schüttelkolbenversuche werden jeweils 8 mL dieser Zellsuspension mit sterilen Pipetten in die Hauptkulturkolben überführt.

Bei den Fermentationen im Bioreaktor wird das benötigte Volumen dieser Zellsuspension in einen Animpfkolben (mit Animpfnadel) gegeben und der komplette Inhalt zum Animpfen verwendet.

## **3.2 Voruntersuchungen in Schüttelkolbenkultivierungen**

Sämtliche Schüttelkolbenkultivierungen werden in 500 mL Erlenmeyerkolben durchgeführt, die mit Zellstoffstopfen verschlossen sind. Die Kolben sind vor dem Animpfen mit 80 mL T25-Medium gefüllt, Abweichungen hiervon sind bei den einzelnen Versuchsdurchführungen angegeben. Alle Kolben werden bei 105 °C für 20 min. autoklaviert (s. Kapitel 3.1.2). Jeder Kolben wird mit 8 mL einer 10 %-igen Zellsuspension beimpft. Die Kultivierungen werden in einem verdunkelten Rotationsschüttler (Certomat S mit Inkubationshaube HK, Fa. Braun, Melsungen) bei 24 °C und 200 rpm ohne pH-Wert-Regelung durchgeführt.

Alle aus den Kolben entnommenen Proben werden unverzüglich nach der Probenahme zur Abtrennung der Biomasse filtriert (s. Kapitel 3.6.2) und der Überstand bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.2.1 Untersuchungen des Einflusses von Antischaummitteln**

Es werden die drei Antischaummittel Desmophen 3900 (Fa. Bayer), Paraffinöl und Silicon (Fa. Wacker) in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen (s. Tabelle 3-1) eingesetzt. Die Antischaummittel werden vor dem Autoklavieren zum Medium gegeben.

**Tabelle 3-1.**

Ansätze der Kultivierungen mit Zusatz von Antischaummitteln [BOEHL, 1998].

Antischaummittel	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Konzentration [% v/v]	Abkürzung
-	-	-	Referenz
Desmophen 3900	24	0,03	Des 0.03
Desmophen 3900	80	0,1	Des 0.1
Desmophen 3900	240	0,3	Des 0.3
Paraffin	24	0,03	Para 0.03
Paraffin	80	0,1	Para 0.1
Paraffin	240	0,3	Para 0.3
Silicon	24	0,03	Sil 0.03
Silicon	80	0,1	Sil 0.1
Silicon	240	0,3	Sil 0.3

Kurz nach dem Animpfen wird die erste Probe (5 mL) entnommen, die 2. Probenahme erfolgt am 4.Tag, die weiteren jeweils im Abstand von 2 Tagen.

### 3.2.2 Test auf Toxizität von Wasserstoffperoxid

Zu drei verschiedenen Schüttelkulturen werden in regelmäßigen Abständen unterschiedliche Volumina an steriltrierter (0,45  $\mu\text{m}$  Filter) 3 %-iger Wasserstoffperoxidlösung unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die 1. Zugabe erfolgt am 6. Kultivierungstag und wird dann täglich durchgeführt. In Tabelle 3-2 sind die verschiedenen, zugeführten Konzentrationen aufgelistet.

**Tabelle 3-2.**

Verschiedene Kultivierungsansätze mit Zugabe von Wasserstoffperoxid [BOEHL, 1998].

Volumen $\text{H}_2\text{O}_2$ [ $\mu\text{L}$ ]	$\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Medium [mM/L]	Abkürzung
-	0	Referenz
10	0,1	Wa 0.1
50	0,5	Wa 0.5
100	1,0	Wa 1.0

Die erste Probe (5 mL) wird kurz nach Animpfen der Kolben entnommen. Vom 5. bis zum 12. Kultivierungstag wird täglich eine Probe gezogen; die letzte Probenahme erfolgt am 15. Tag.

### 3.2.3 Test auf Toxizität von Mangandioxid

Zu dem Hauptkulturmedium von drei verschiedenen Kolben wird Mangandioxid in unterschiedlichen Konzentrationen vor dem Autoklavieren hinzugefügt (s. Tabelle 3-3).

Die erste Probenahme (5 mL) wird direkt nach dem Animpfen durchgeführt, die weiteren ab dem 5. Tag im Abstand von 2 Tagen.

**Tabelle 3-3.**

Verschiedene Kultivierungsansätze mit Zugabe von Mangandioxid [BOEHL, 1998].

Menge MnO <sub>2</sub> [mg]	MnO <sub>2</sub> -Konzentration [g/L]	Abkürzung
-	0	Referenz
0,1	8	Mn 0.1
0,5	40	Mn 0.5
1,0	80	Mn 1.0

### 3.2.4 Kultivierungen unter Zusatz von Katalysatoren und Wasserstoffperoxid-Zugabe

In jeweils zwei Schüttelkolben werden unterschiedliche Konzentrationen der beiden Katalysatoren MnO<sub>2</sub> und Katalase vorgelegt (s. Tabelle 3-4). Dabei wird MnO<sub>2</sub> bereits vor dem Autoklavieren dem Medium zugefügt. Die Katalaselösungen werden direkt vor dem Animpfen frisch angesetzt und dem Medium sterilfiltriert (0,45 µm Filter) zugegeben. Dieses wird alle zwei Tage wiederholt. Während der Kultivierung werden zu diesen vier Kolben, sowie zu einem weiteren ohne Katalysator-Zusatz täglich 100 µL einer frisch hergestellten, sterilfiltrierten (0,45 µm Filter), 3 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zugegeben.

**Tabelle 3-4.**

Ansätze der Schüttelkulturen mit Zusatz von verschiedenen Katalysatoren [BOEHL, 1998].

Katalysator	Abkürzung
-	Referenz
-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0,1 g/L MnO <sub>2</sub>	MnO <sub>2</sub> 0,1
1,0 g/L MnO <sub>2</sub>	MnO <sub>2</sub> 1,0
1 mg Katalase gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O	Ka 1
2 mg Katalase gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O	Ka 2

Direkt nach dem Beimpfen der Kolben wird die erste Probenahme (5 mL) durchgeführt. Ab dem 4. Tag werden im Abstand von 2 Tagen die weiteren Proben gezogen.

### 3.2.5 Kultivierungen mit Zugabe von Sojaöl

In zwei Versuchsreihen werden zum T25-Medium vor dem Autoklavieren unterschiedliche Mengen Sojaöl gegeben (s. Tabelle 3-5). In jeder Reihe wird ebenfalls eine Referenzkultivierung ohne Sojaöl-Zugabe durchgeführt.

Während der Kultivierung erfolgen 5 Probenahmen, bei denen jeweils 5 mL Probelösung entnommen werden.

**Tabelle 3-5.**  
Unterschiedliche Kultivierungsansätze mit Sojaöl-Zugabe.

Versuchsreihe	Eingesetzte Sojaöl-Menge [mL]	Sojaöl-Konzentration [% v/v]
1	16	16,7
2	8	9,1
2	4	4,8

### 3.2.6 Kultivierungen mit Zusatz von Kohlenwasserstoffen

Der Zusatz der vier Kohlenwasserstoffe Hexan, Nonan, Dekan und Toluol wird in zwei verschiedenen Versuchsreihen durchgeführt.

Versuchsreihe 1: Zu jedem Kolben werden unmittelbar vor dem Animpfen 20 mL [16,7 % (v/v)] des jeweiligen Lösemittels sterilfiltriert (0,45 µm Filter) zugegeben. Die erste Probenahme (10 mL) erfolgt unmittelbar nach dem Beimpfen der Kolben. Zwischen dem 3. bis 13. Tag werden weitere 8 Proben à 10 mL gezogen.

Versuchsreihe 2: Vor dem Beginn der Kultivierung werden 20 mL [16,7 % (v/v)] Hexan, Nonan bzw. Dekan sterilfiltriert (0,45 µm Filter) und dem Medium zugefügt. Ab dem 2. Tag werden täglich jeweils 1 mL des Lösemittels steril zu den Kultivierungen gegeben. Am 11., 12. und 14. Tag werden jeweils 5 mL Probe entnommen.

Vor dem Filtrieren der entnommenen Kultivierungsproben wird die organische Phase mit einer Pasteurpipette von der Zellsuspension abgetrennt.

### 3.2.7 Kultivierungen mit Zusatz von Hostinert 216

Es werden verschiedene Ansätze mit Zugabe des perfluorierten Kohlenwasserstoffs Hostinert 216 (s. Anhang) durchgeführt, um den gesamten Konzentrationsbereich abzudecken.

In allen drei Versuchsreihen wird der perfluorierte Kohlenwasserstoff vor dem Autoklavieren zum Medium gegeben. In den Versuchsreihen 1 und 2 werden jeweils 80 mL T25-Medium vorgelegt und die jeweilige Menge Hostinert hinzugegeben, so daß das Endvolumen in den Kolben unterschiedlich groß ist (s. Tabelle 3-7). In Versuchsreihe 3 liegen die Kolbenvolumina jeweils bei 200 mL, demzufolge sind unterschiedliche Mediumsmengen vorhanden.

Die Kolben werden 18 bis 20 Tage lang inkubiert. Während des gesamten Kultivierungszeitraums werden Proben entnommen, wobei darauf geachtet wird, daß die Probe ausschließlich Zellsuspension und keine organische Phase enthält. Die Probenvolumina in den Versuchsreihen 1 und 2 betragen 5 mL, in der Reihe 3 nur 3 mL aufgrund des teilweise geringen Mediumvolumens in den Kolben mit höherem Hostinert-Anteil. In der 3. Versuchsreihe werden zusätzlich die gleichen Volumenanteile Hostinert aus den Kolben entnommen, damit das Verhältnis Medium/Hostinert im Laufe der Kultivierung gleichbleibend ist.



Vor der Probenfiltration werden eventuell mit entnommene Hostinert-Reste mit Hilfe einer Pasteurpipette von der Kulturbrühe entfernt.

**Tabelle 3-7.**

Übersicht über die verschiedenen Versuchsreihen mit Zusatz von unterschiedlichen Mengen an Hostinert 216.

<b>Versuchsreihe 1</b>			
<b>Hostinert-Konzentrationen</b> [% v/v]	<b>Zugesetzte Hostinert- Menge [mL]</b>	<b>Volumen T25-Medium [mL]</b>	<b>Gesamtvolumen [mL]</b>
0	0	80	80
9,1	8	80	88
23,1	24	80	104
37,5	48	80	128
44,4	64	80	144
50	80	80	160
<b>Versuchsreihe 2</b>			
0	0	80	80
16,7	16	80	96
28,6	32	80	112
37,5	48	80	128
44,4	64	80	144
50	80	80	160
<b>Versuchsreihe 3</b>			
0	0	200	200
10	20	180	200
20	40	160	200
30	60	140	200
40	80	120	200
50	100	100	200
60	120	80	200
70	140	60	200
80	160	40	200

### 3.3 Kultivierungen im Bioreaktor

Die Kultivierungen werden in einem 2L-Biostat B Reaktor (Fa. Braun, Melsungen) durchgeführt. Anstelle des handelsüblichen Glasgefäßes besitzt diese Einheit ein 2L Arbeitsvolumen fassendes Edelstahlgefäß, dessen Dimensionen denen des Glaselementes entsprechen. Dieser Reaktor ist eine Anfertigung der institutseigenen Feinmechanik-Werkstatt. Als Deckel wird der Originaldeckel des Glasgefäßes verwendet. Der doppelwandige Edelstahlreaktor wird mit Wasser temperiert. Standardmäßig ist der Reaktor mit einem 3-Scheibenrührer ausgestattet, der jedoch bei den meisten Kultivierungen gegen Paddelrührer ausgetauscht wird (s. Tabelle 3-8).

Der Biostat B ist mit einer digitalen Meß- und Regeleinheit (DCU) versehen, die über ihren Hostanschluß mit einer Workstation (Vax-Station) verbunden ist. Die Datenaufnahme, Prozeßsteuerung und -regelung erfolgt über das sogenannte RISP-System (**R**eal **T**ime **I**ntegrating **S**oftware **P**latform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover). Die alle 10 Sekunden aufgenommenen Meßwerte werden über einen Zeitraum von 1 Minute gemittelt und gespeichert. Der Verlauf der einzelnen Parameter wird während der Kultivierung graphisch dargestellt. Neben der reinen Meßdatenaufnahme können mit diesem System Betriebsparameter (z.B. OTR, CPR oder RQ) on-line berechnet werden. Ferner können durch einfache Programmierung die Regelung eines Kultivierungsprozesses den jeweiligen Gegebenheiten angepaßt werden (z.B. Zudosierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, s. Kapitel 3.5). Abbildung 3-1 zeigt den schematischen Aufbau der Reaktoreinheit.

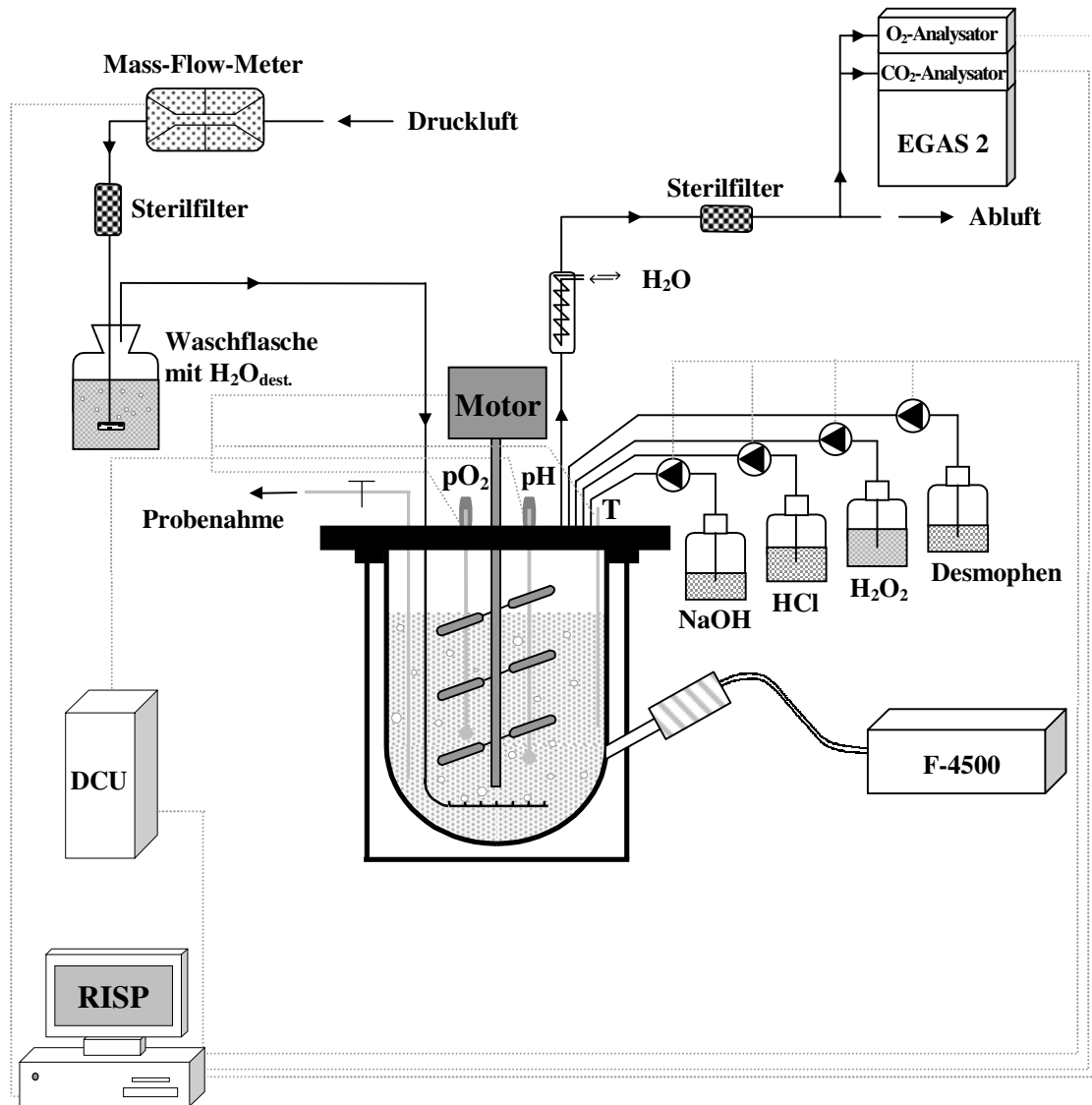
Der Reaktor ist mit einem Temperaturfühler (Pt-100), einer pH- sowie einer Sauerstoffelektrode (beide Fa. Mettler-Toledo) zur Prozeßüberwachung ausgestattet. Des weiteren ist ein 2D-Fluoreszenzspektrometer (F-4500, Fa. Hitachi) angeschlossen (s. Kapitel 3.4).

Über ein Mass-Flow-Meter (Mass-Flow-Controller 5851, 0-30 L/min, Fa. Brooks) und dem angeschlossenen Controller (Modell 5876, Fa. Brose) wird die Druckluftbegasung (0,5-5 vvm) eingestellt. Die Druckluft wird über einen Sterilfilter in eine mit sterilem Wasser gefüllte Waschflasche geleitet. Dieses dient der Luftbefeuchtung, um mögliche Flüssigkeitsverluste durch mit der Luft ausgetragenes Medium im Laufe der Kultivierung zu minimieren. Die Luft wird durch einen Begasungsring (unterhalb des Rührers) in das Medium eingeleitet. Der Abgasstrom führt über einen Verteiler (Mux-Control 100, Fa. Braun, Melsungen) in das Abgasanalysesystem EGAS 2 (Fa. Hartmann&Braun), das mit einem kombinierten CO<sub>2</sub>-/O<sub>2</sub>-Analysator (URAS 14 + O<sub>2</sub>) ausgerüstet ist. Diese Abgasdaten werden ebenfalls vom RISP-System aufgenommen.

Der pH-Wert wird während der Kultivierung durch automatische Zudosierung von steriler 4 %-iger HCl- bzw. 10 %-iger NaOH-Lösung konstant bei pH 5,2 gehalten. Wahlweise kann eine Flasche mit sterilem Antischaummittel und/oder eine Flasche mit Wasserstoffperoxidlösung angeschlossen werden.

Der Reaktor wird vor jeder Kultivierung mit 1,8 L aufkonzentriertem Produktionsmedium befüllt. (Dieses ist so konzentriert, daß nach Zugabe von 200 mL wäßriger Zellsuspension die Anfangskonzentration des Mediums erhalten wird). Änderungen im Mediumvolumen bei einzelnen Kultivierungen sind in Tabelle 3-8 aufgeführt. Der Reaktor sowie alle angeschlossenen Gefäße werden für 30 min bei 105 °C autoklaviert. Die Sauerstoffelektrode wird extern in einem mit Leitungswasser gefüllten Gefäß autoklaviert und anschließend erst in den Reaktor eingebaut, wodurch das Kontaminationsrisiko erhöht wird. Dieses ist jedoch notwendig, da die Elektrode nach dem Autoklavieren in dem stark konzentrierten Medium nicht kalibriert werden kann. Die Elektrode wird nach dem Polarisieren kalibriert, wobei der 0 %-Wert durch Begasung mit Stickstoff und der 100 %-Wert durch Begasung mit Druckluft bei 5 vvm (450 rpm) festgelegt werden.

Das sterilisierte Medium wird für 24 h mit 0,5 vvm Druckluft bei 24 °C und 200 rpm begast. Anschließend wird eine Probe aus dem Reaktor entnommen und unter dem Mikroskop auf mögliche Kontaminationen untersucht. Erst nach dem Sterilttest wird der Reaktor mit einer 10 %-igen Zellsuspension angeimpft (s. Kapitel 3.1.2).



**Abbildung 3-1.**  
Schematischer Aufbau des verwendeten Biostat B Reaktorsystems.

Die Bedingungen für die unterschiedlichen Kultivierungen sind in Tabelle 3-8 zusammengestellt, wobei alle Fermentationen bei 24 °C und pH 5,2 durchgeführt werden. Zu Beginn jeder Fermentation werden Begasungsraten von 0,5 vvm und Rührerdrehzahlen von 250 rpm eingestellt, die im weiteren Verlauf einer Kultivierung individuell verändert werden (s. Kapitel 4). Bei allen Kultivierungen im Biostat B werden in Intervallen von 24 Stunden ca. 5-10 mL Kulturbrühe entnommen, filtriert und der Überstand bis zur weiteren Analytik bei -20 °C ein-

gefroren. Aus den Kulturproben von Fermentationen im 2-Phasen-System muß vor der Filtration mit Hilfe von Pasteurpipetten die organische Phase abgetrennt werden.

**Tabelle 3-8.**

Übersicht über die Kultivierungsbedingungen der verschiedenen Kultivierungen im Biostat B Reaktor.

Kultivierung	Rührer	Antischaummittel	System der Sauerstoffversorgung	Medium [mL]	Zusätze
F1	2 SR	Nein	ausschließlich Druckluft	2000	-
F2	2 PR	Nein	ausschließlich Druckluft	2000	-
R1	3 PR	Ja	ausschließlich Druckluft	2000	-
R2	3 PR	Ja	ausschließlich Druckluft	2000	-
H1	2 PR	Nein	3 %-iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	2000	0,1 g/L MnO <sub>2</sub>
H2	3 PR	Ja	3 %-iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	2000	0,1 g/L MnO <sub>2</sub>
H3	3 PR	Ja	10 %-iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	2000	0,1 g/L MnO <sub>2</sub>
PFC1	3 PR	Ja	2-Phasen PFC/Medium <sup>2</sup>	1600	400 mL (20 %) PFC
PFC2	3 PR	Ja	2-Phasen PFC/Medium <sup>2</sup>	1600	400 mL (20 %) PFC
PFC3	3 PR	Ja	2-Phasen PFC/Medium <sup>2</sup>	1800	200 mL (10 %) PFC
PFC4	3 PR	Ja	2-Phasen PFC/Medium <sup>2</sup>	1200	800 mL (40 %) PFC

SR: Scheibenrührer, PD: Paddelrührer, PFC: perfluorierte Kohlenwasserstoffe (Hostinert 216)

<sup>1</sup>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe unterstützend zur Druckluftbegasung; <sup>2</sup>: Begasung erfolgt weiterhin über Druckluft

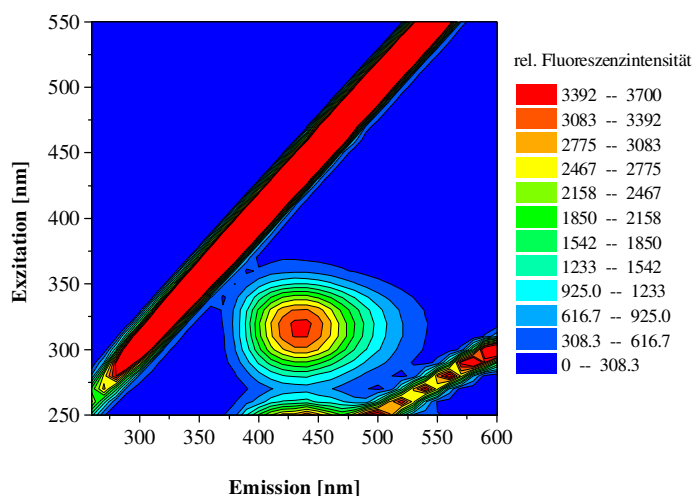
### 3.4 2D-Fluoreszenzspektrometrie

Optische Sensoren werden aufgrund der Möglichkeit zur Durchführung kontinuierlicher, nicht invasiver Messungen vermehrt zur Prozeßbeobachtung und -kontrolle eingesetzt [SCHEPER, 1991]. Durch Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen lassen sich fluoreszierende Substanzen detektieren, wobei sich die einzelnen Substanzen in ihrer Anregungs- und Fluoreszenz-Wellenlänge unterscheiden. Dieses Phänomen wird zur Prozeßbeobachtung bei Kultivierungen ausgenutzt, um beispielsweise biogene Fluorophore wie NADH zu erfassen und darüber eine Aussage über den aktuellen Zustand der Zellen treffen zu können.

In dieser Arbeit wird das Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500 (Fa. Hitachi, Japan) verwendet. Dieses besitzt einen Gittermonochromator mit wählbarer Spaltbreite, so daß die Wellenlängen von Exzitation und Emission unabhängig voneinander eingestellt werden können. An dieses Fluoreszenzspektrometer kann ein zweiarmiger Lichtleiter angeschlossen werden, wodurch die Beobachtung in einem weiten Bereich von Anregungs- und Emissionswellenlänge (2D-Fluoreszenzspektrometrie) möglich ist. Der Lichtwellenleiter ist über einen Standardstutzen direkt an den Reaktor angeschlossen, wobei er durch eine Quarzglasscheibe vom Innenraum des Reaktors getrennt ist. Somit kann eine Messung der relativen Kulturfluoreszenz in situ und ohne Kontaminationsrisiko durchgeführt werden. Ausführliche Darstellungen des theoretischen Hintergrundes und der Meßanordnungen sind bei MAROSE [1999]

dargestellt. Die Messungen der Kulturfluoreszenz in dieser Arbeit sind in Zusammenarbeit mit MAROSE [1999] und BOEHL [1999] durchgeführt worden.

Bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie werden bei verschiedenen äquidistanten Anregungswellenlängen Emissionsspektren aufgenommen, wodurch die Erfassung des gesamten Anregungs- und Emissionsbereiches erfolgt. Die aufgenommenen Spektren werden als Kontur-Plot mit Höhenlinien (ähnlich einer topographischen Karte) dargestellt. Dabei werden die Exzitationswellenlänge gegen die Emissionswellenlänge aufgetragen. Die Höhenlinien bzw. Farben kennzeichnen Bereiche der gleichen relativen Fluoreszenzintensität (RFI). In Abbildung 3-2 ist das Spektrum des reinen Ergotamins (Ergotamintartrat in MeOH/HCl) dargestellt.

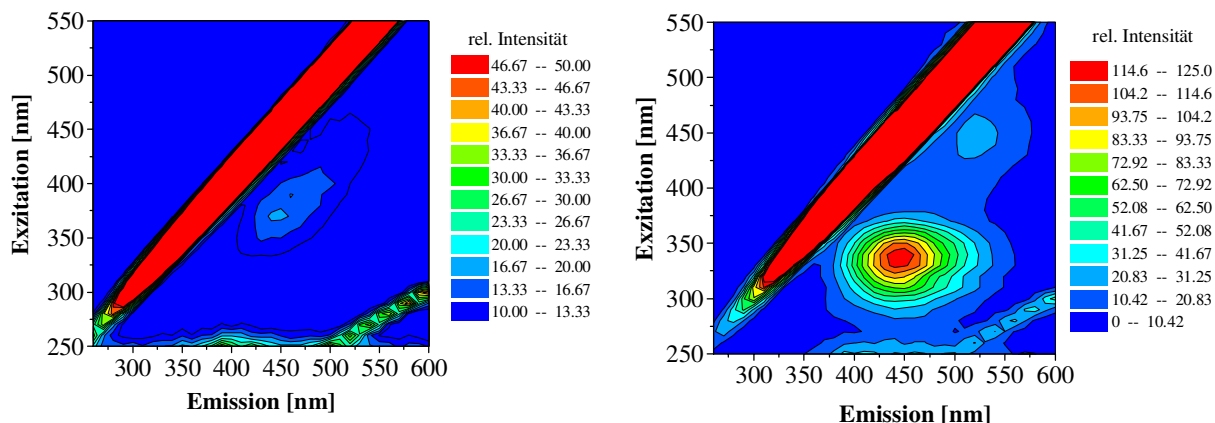


**Abbildung 3-2.**

2D-Fluoreszenzspektrum des reinen Ergotamintartrats ( $6,25 \cdot 10^{-4}$  mg/mL).

Die Diagonale stellt die für 2D-Fluoreszenzspektren typische Rayleigh-Streuung bei gleicher Exzitations- und Emissionswellenlänge dar. Die Fluoreszenz des Ergotamins ist als Peak zu erkennen, dessen Intensitätsmaximum bei dem Wellenlängenpaar Ex 320 / Em 440 nm liegt. Die beiden von *Claviceps purpurea* 1029 N5 produzierten Alkaloide Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin lassen sich unter den gewählten Bedingungen fluoreszenzspektroskopisch nicht unterscheiden.

Abbildung 3-3 zeigt zwei 2D-Fluoreszenzspektren, die zu Beginn bzw. während einer *Claviceps purpurea* Kultivierung aufgenommen wurden. In der linken Abbildung ist die Eigenfluoreszenz des Mediums erkennbar. In der rechten Graphik sind neben einem Peak im Bereich des Wellenlängenpaares des Produkts weitere Intensitätsmaxima zu sehen. Daher werden zur Prozeßbeobachtung feste Wellenlängenpaare ausgewählt, die Aussagen über die Produktkonzentration oder die Biomasse geben können. Charakteristische Wellenlängenpaare bilden die Bereiche mit den Bezeichnungen „Streulicht“ (Ex. 480-550/Em. 470-560), „Alkaloide“ (Ex. 310-360/Em. 400-500) und „Flavine“ (Ex. 430-460/Em. 500-540). Die Fluoreszenzintensitäten dieser Bereiche werden mit den off-line ermittelten Daten der Biomasse und des Gesamtalkaloidgehaltes korreliert.



**Abbildung 3-3.**  
2D-Fluoreszenzspektren am Anfang (links) und während (rechts) einer *Claviceps purpurea* Kultivierung.

Für die on-line Messungen der Kulturfluoreszenz mit dem F-4500 (Hitachi) werden die in Tabelle 3-9 angegebenen Einstellungen gewählt.

**Tabelle 3-9.**  
Einstellungen des Spektralphotometers F-4500 für die on-line Messungen.

Parameter	Einstellungen
Exzitationswellenlänge	270-500 nm
Emissionswellenlänge	290-600 nm
Schrittweite der Exzitations-/Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
Exzitations-Slit / Emissions-Slit	10 nm / 20 nm
Photomultiplierspannung	700 Volt
Scan-Geschwindigkeit	30.000 nm/s
Aufnahmefrequenz	alle 5 bzw. 15 min.

### 3.4.1 Off-line Messungen

Die off-line Messungen der Kultivierungsproben werden in Mikroküvetten aus Quarzglas (10 · 5 mm) durchgeführt. Dabei werden die Küvetten quer zum Anregungslicht in das Spektrometer eingesetzt. Die Kultivierungsproben werden insgesamt 1:1.000 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt und die Fluoreszenz unter den in Tabelle 3-10 angegebenen Bedingungen gemessen.

**Tabelle 3-10.**

Einstellungen des Spektralphotometers F-4500 für die Küvettenmessungen.

Parameter	Einstellungen
Exzitationswellenlänge	250-500 nm
Emissionswellenlänge	260-600 nm
Schrittweite der Exzitations-/Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
Exzitations-Slit / Emissions-Slit	10 nm / 20 nm
Photomultiplierspannung	700 Volt
Scan-Geschwindigkeit	12.000 nm/s

### 3.5 Prozeßregelung der Wasserstoffperoxid-Zugabe

In drei in dieser Arbeit vorgestellten Fermentationen im Rührkesselreaktor wird die konventionelle Sauerstoffversorgung durch die Zufütterung von Wasserstoffperoxid unterstützt (s. Kapitel 4.6.3). Für die Zugabe der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen wird ein Regler realisiert und in das RISP-System eingebunden. Diese Regelung muß den jeweiligen Bedingungen im Reaktor angepaßt werden. Da sie teilweise auf empirischen Daten beruht, ist eine ständige Verbesserung des Reglers in den ersten Kultivierungen notwendig.

Diese Regelung ist mit Hilfe von Dr. Michael Dors, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, entwickelt worden.

Die Arbeitsweise des Reglers beruht darauf, daß aus den aktuellen  $\text{O}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Meßwerten der Abgasanalytik und der Begasungsrate der momentane Sauerstoffverbrauch berechnet wird. Dazu wird zuvor in einem Experiment mit konventioneller Sauerstoffversorgung die geschätzte maximale Sauerstoffeintragsrate mit Hilfe der Abgasdaten und der eingestellten Begasungsraten ermittelt. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen, der nicht allein über die konventionelle Begasung ausgeglichen werden kann, soll durch eine kontinuierliche Zugabe von Wasserstoffperoxid gedeckt werden. Für den Fall, daß die Abgasmessung oder die Begasung aufgrund technischer Störungen ausfallen sollten, wird ein zweiter Regler implementiert, der die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe im Notfall ausschließlich aus den Gelöstsauerstoffdaten ermittelt.

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe soll so erfolgen, daß der Gelöstsauerstoffgehalt im Bereich zwischen 30-45 % liegt, damit keine Sauerstofflimitierung auftritt. Ein Unterschreiten des gegebenen Minimums soll dabei auf jeden Fall vermieden werden.

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugaberate wird aus den Abgasdaten ermittelt, wobei zunächst aus den  $\text{CO}_2$ - bzw.  $\text{O}_2$ -Werten und der Begasungsrate die  $\text{CO}_2$ -Produktions- (CPR) und die  $\text{O}_2$ -Verbrauchsraten (OUR) ermittelt werden [BELLGARDT, 1984].

$$CPR := -Q_M \cdot M_{CO_2} \cdot \left( x_{CO_2}^E - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{CO_2}^A \right) \quad (\text{Gl.3-1})$$

$$OUR := Q_M \cdot M_{O_2} \cdot \left( x_{O_2}^E - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{O_2}^A \right) \quad (\text{Gl. 3-2})$$

mit:

$Q_M$ : Molare, auf das Flüssigphasenvolumen bezogene Begasungsrate [ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]

$M_{CO_2}$ : Molekulargewicht  $CO_2$  [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

$x^E, x^A$ : Molenbruch eines Stoffes am Reaktoreingang (E) bzw. -ausgang (A)

Aus der Sauerstoffverbrauchsrate kann die Zugaberate berechnet werden. Da bei den verwendeten Abgasanalysatoren der  $CO_2$ -Analysator kleinere Meßwertfehler aufweist, wird die  $O_2$ -Verbrauchsrate aus dem CPR-Wert ermittelt unter der Annahme, daß  $CPR = OUR$ .

Dabei muß berücksichtigt werden, daß nur der Anteil an Sauerstoff in Form von  $H_2O_2$  zugegeben werden soll, der nicht von der herkömmlichen Begasung gedeckt wird. Die  $H_2O_2$ -Zugaberate ergibt sich somit wie folgt:

$$H_2O_2 - Rate_{Abgas} := \frac{CPR - O_2 Rate_{Luft}}{c_{H_2O_2}} \quad (\text{Gl. 3-3})$$

mit:

$O_2 Rate_{Luft}$ : über die Begasung eingebrachte  $O_2$ -Konzentration [ $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ ]

$c_{H_2O_2}$ : molare Konzentration der  $H_2O_2$ -Lösung [ $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ]

Die  $H_2O_2$ - $Rate_{Abgas}$  enthält einen Verstärkungsfaktor, der empirisch im Laufe der Kultivierung angepaßt wird. Für die Zudosierung muß diese  $H_2O_2$ -Zugaberate in die Pumpleistung umgerechnet werden.

Des weiteren werden die folgenden Definitionen aufgestellt:

$$Ra := pO_{2,max} - pO_{2,min} \quad (\text{Gl. 3-4})$$

$$Rd := pO_{2,max} - pO_{2,akt} \quad (\text{Gl. 3-5})$$

$$LF := Rd / Ra \quad (\text{Gl. 3-6})$$

mit:

$pO_{2,max}$ : Höchstgrenze  $pO_2 = 45 \%$

$pO_{2,min}$ : Tiefstgrenze  $pO_2 = 30 \%$

$pO_{2,akt}$ : Aktueller  $pO_2$ -Wert

LF: Leistungsfaktor

Je nachdem, in welchem Bereich der aktuelle  $pO_2$ -Wert liegt, erfolgt eine unterschiedliche Gewichtung der Zugaberate, so daß in den einzelnen Bereichen folgende Bedingungen gelten:



- $pO_{2,max} \leq pO_{2,akt.} \Rightarrow$  Keine  $H_2O_2$ -Zugabe
- $pO_{2,max} > pO_{2,akt.} > pO_{2,min.} \Rightarrow$  Zugaberate:  $= H_2O_2\text{-Rate}_{Abgas} / (LF \cdot 2)$  (2: empirischer Faktor)
- $pO_{2,akt.} \leq pO_{2,min.} \Rightarrow$  Zugaberate:  $= H_2O_2\text{-Rate}_{Abgas} / 1,5$  (1,5: empirischer Faktor)

Neben dem Anteil, der aus den Verbrauchsraten ermittelt wird, wird ein proportionaler Anteil der Zugaberate berechnet, der beim Unterschreiten des  $pO_2$ -Minimums (30 %) eingreift. Diese Ausgleichsrate ergibt sich aus der Differenz des aktuellen  $pO_2$ -Wertes zum gegebenen  $pO_2$ -Minimum, der  $O_2$ -Sättigungskonzentration im Medium und dem Reaktorvolumen nach folgender Gleichung:

$$pO_{2,Ausgleichsrate} := \left(0,3 - \frac{pO_2}{100}\right) \cdot c_{O_2,Sättigung} \cdot V_R \quad (\text{Gl. 3-7})$$

mit:

$pO_2$ :	aktuelle Gelöstsauerstoffkonzentration
$c_{O_2,Sättigung}$ :	$O_2$ -Sättigungskonzentration im Medium (0,22 mM $\cdot L^{-1}$ bei 24 °C)
$V_R$ :	Reaktorvolumen (2L)

Um auf die Veränderungen im System einzugehen und Überdosierungen zu vermeiden, soll die Zugabe erst nach einer (empirischen) Totzeit  $t_{tot}$  erfolgen, so daß sich für die proportionale Zugaberate folgende Gleichung ergibt:

$$H_2O_2 - Rate_{Prop.} := \frac{pO_{2,Ausgleichsrate} \cdot (-1)}{c_{H_2O_2} \cdot t_{tot}} \quad (\text{Gl. 3-8})$$

Die Addition der beiden Anteile liefert die gesamte  $H_2O_2$ -Zugaberate, die anschließend in die entsprechende Pumpleistung umgerechnet werden muß:

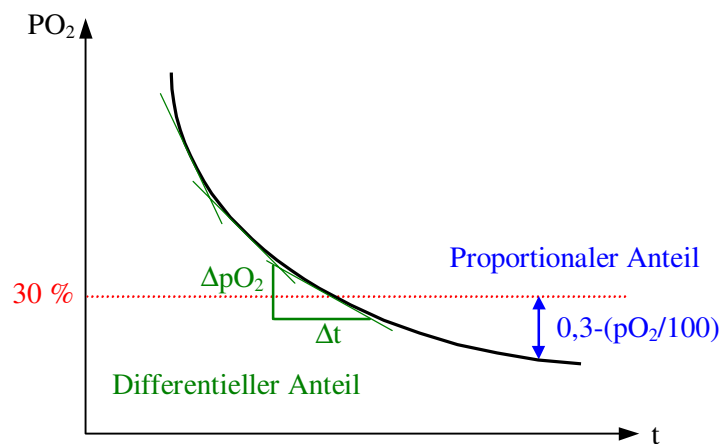
$$H_2O_2\text{-Rate} := H_2O_2\text{-Rate}_{Abgas} + H_2O_2\text{-Rate}_{Prop.} \quad (\text{Gl. 3-9})$$

Für den Fall, daß die Abgasanalysatoren aufgrund eines technischen Defektes ausfallen bzw. keine sinnvollen (d.h. von den Erfahrungswerten stark differierende) Meßwerte ergeben oder die Begasung (bedingt z.B. durch Abspringen eines Schlauches) ausfällt, soll ein Sicherheitsmechanismus eingebaut werden. Dadurch soll eine ausreichende Sauerstoffversorgung bis zum Beheben der Fehlerquellen sichergestellt werden.

Die Aktivierung dieses „Notfallreglers“, der nur die Werte des Gelöstsauerstoffgehaltes berücksichtigt, erfolgt, wenn der  $CO_2$ -Wert im Abgas größer 1,0 oder die Begasungsrate kleiner 0,5 vvm ist. Im Gegensatz zu dem eigentlichen Hauptregler reagiert dieser „Notfallregler“ erst bei Unterschreitung des gesetzten  $pO_2$ -Minimums. Dadurch wird der  $pO_2$  nicht in einem bestimmten Bereich gehalten, sondern fällt zunächst unterhalb des gesetzten Minimums, bevor

die Zudosierung erfolgt. Steigt der  $pO_2$  daraufhin wieder an und liegt oberhalb des Grenzwertes, setzt die Zugabe sofort wieder aus.

Dieser Regler besteht aus einem differentiellen und einem proportionalen Anteil, wobei letzterer wieder die Differenz des  $pO_2$ -Wertes zum Minimum berücksichtigt und aus den Gleichungen 3-7 und 3-8 berechnet wird. Die differentielle Zugaberate ergibt sich aus der Sauerstoffverbrauchsrate, die zum Zeitpunkt der Grenzwertunterschreitung vorliegt. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 3-4 die beiden verschiedenen Anteile an der Zugaberate schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-4.**

Schematische Darstellung der proportionalen und differentiellen Anteile des „Notfallreglers“.

Zunächst wird die aktuelle Sauerstoffdefizitrate aus der Steigung der  $pO_2$ -Kurve ( $O_2$ -Verbrauchsrate), der  $O_2$ -Sättigungskonzentration im Medium und dem Reaktorvolumen berechnet. Die gemessenen  $pO_2$ -Werte müssen dafür gefiltert werden, um die Schwankungen der alle zwei Minuten aufgenommenen Meßwerte auszugleichen (Methoden: Moving Average und Moving Median). Es ergibt sich für die Sauerstoffdefizitrate folgende Gleichung:

$$O_{2,Defizitrate} := \frac{\Delta pO_2}{100 \cdot \Delta t} \cdot c_{O_2,Sättigung} \cdot V_R \quad (\text{Gl. 3-10})$$

mit:

$\Delta pO_2/\Delta t$ :	Sauerstoffverbrauchsrate
$c_{O_2,Sättigung}$ :	$O_2$ -Sättigungskonzentration im Medium (0,22 mM · L <sup>-1</sup> bei 24 °C)
$V_R$ :	Reaktorvolumen (2L)

In diese Defizitrate wird zusätzlich ein (empirischer) Verstärkungsfaktor einbezogen. Er dient zum Ausgleich von Totzeiten, die durch Verzögerungen bei der Signalübertragung auftreten, und anderen Faktoren, die durch die Messung nicht zugänglich sind. Aus dieser Rate kann die differentielle  $H_2O_2$ -Zugaberate wie folgt berechnet werden:

$$H_2O_2 - Rate_{Not.} := \frac{O_{2,Defizitrate} \cdot (-1)}{C_{H_2O_2}} \quad (\text{Gl. 3-11})$$

mit:

$C_{H_2O_2}$ : molare Konzentration der  $H_2O_2$ -Lösung [ $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ ]

Diese Zugaberate wird in die entsprechende Pumpleistung umgerechnet.

Aus Gleichung 3-9 ergibt sich wiederum die gesamte Wasserstoffperoxid-Zugaberate.

Bevor der (Haupt-) Regler in einer Kultivierung angewendet werden kann, muß zunächst der „Notfallregler“ etabliert werden. Dazu werden zwei Kultivierungen durchgeführt, bei denen die eingesetzte Wasserstoffperoxidlösung eine Konzentration von 3 % aufweist. Das  $pO_2$ -Minimum wird zunächst auf 25 % und in der zweiten Kultivierung auf 30 % gesetzt.

Die Anwendung des Hauptreglers erfolgt in einer Kultivierung, bei der eine 10 %-ige  $H_2O_2$ -Lösung zugegeben wird.

Die Zugabe der Wasserstoffperoxidlösung stellt eine Schwierigkeit dar, weil die zur Biostat B Einheit zugehörige Pumpe nur Flüssigkeitsvolumen ab 0,8 mL/min. fördern kann. Demzufolge müssen die berechneten Volumina addiert werden, bis eine Menge von 0,8 mL/min. erreicht ist. Dieses kann zu Verzögerungen in der Zugabe gerade zu Beginn führen.

Der hier vorgestellte Regler für die Wasserstoffperoxidzugabe ist an das in dieser Arbeit verwendete Reaktorsystem angepaßt. Durch die einzelnen Verstärkungsfaktoren ist die Zugabe für dieses System optimiert worden, was jedoch nicht zwangsläufig auf andere Reaktorsysteme übertragbar ist.

## 3.6 Off-line Analytik

### 3.6.1 Morphologische Betrachtungen

Für den Sterilttest vor einer Kultivierung im Bioreaktor wird eine lichtmikroskopische Untersuchung (Mikroskop BH-2, Fa. Olympus) einer Probe durchgeführt. Ebenso werden während des gesamten Kultivierungsverlaufs Proben auf mögliche Kontaminationen und morphologische Veränderungen des Organismus untersucht.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von *Claviceps purpurea* werden mit einem Inversen Forschungsmikroskop (Olympus IX-50) durchgeführt, das mit einem achromatischen Objektiv (20-fache Vergrößerung, Numerische Appertur 0,4) ausgestattet ist. An das Mikroskop ist eine CCD-Kamera (JAI-M50) für die Bildaufnahme (512 x 512 Pixel, 256 Graustufen) angeschlossen. Die Gesamtvergrößerung liegt mit dieser Anordnung bei etwa 400.

### 3.6.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Abtrennung der Biomasse vom Medium wird das gesamte Probenvolumen mit einer Absaugeeinrichtung unter Wasserstrahlpumpenvakuum filtriert. Dazu werden vorher gewogene Cellulose-Acetat-Filter mit einem Porendurchmesser von  $0,45\ \mu\text{m}$  ( $\varnothing\ 47\ \text{mm}$ , Fa. Sartorius) verwendet. Der Filterkuchen wird mit dem gleichen Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen, so daß das Filtrat 1:2 verdünnt wird. Die Filter werden bis zur Gewichtskonstanz bei  $75\ ^\circ\text{C}$  getrocknet, anschließend gewogen und die Biotrockenmasse über die Gewichts Differenz bestimmt.

### 3.6.3 Bestimmung des extrazellulären Proteingehaltes

Zur Bestimmung des extrazellulären Proteingehaltes in den Kultivierungsproben wird der kommerzielle Proteintest *DC Protein Assay*<sup>®</sup> (Fa. BIORAD) eingesetzt, der eine Variante des LOWRY-Tests ist. Der Test basiert auf einer zweistufigen Farbreaktion zwischen den Proteinen, einer alkalischen Kupfertartratlösung und dem Folinreagenz. Dabei wird zunächst das zweiwertige Kupfer durch die Aminosäuren der Proteine zur einwertigen Oxidationsstufe reduziert. Im zweiten Schritt findet die eigentliche Farbreaktion statt, wobei das Folinreagenz durch das einwertige Kupfer reduziert wird und somit Verbindungen mit charakteristischer blauer Farbe entstehen.

Aufgrund des hohen Proteingehaltes der Kultivierungsproben müssen diese vor der Durchführung des Tests verdünnt werden. Dazu werden die Proben der Schüttelkolbenkultivierungen insgesamt 1:5, die der Reaktorfermentationen 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  verdünnt.

Der Test wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Zunächst werden  $20\ \mu\text{L}$  Probe vorgelegt und anschließend  $25\ \mu\text{L}$  Reagenz A zugegeben. Nach Zugabe von  $200\ \mu\text{L}$  Reagenz B werden die Lösungen gut durchgemischt. Nach 15 min. Inkubation wird die Extinktion bei  $620\ \text{nm}$  mit einem Immunoreader NJ-2000 (Fa. Intermed) gemessen. (Die Zusammensetzungen der Reagenzien finden sich im Anhang).

Aus einer kommerziellen Rinderserumalbumin(BSA)-Lösung ( $2\ \text{mg/L}$ , Fa. Pierce) werden 5 BSA-Konzentrationen im Bereich zwischen  $0,2\text{-}1,0\ \text{mg/L}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  zur Aufstellung einer Kalibrationsgeraden hergestellt. Zum Blindwertabgleich wird  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  eingesetzt.

Alle Proben werden einer Doppelbestimmung unterzogen.

### 3.6.4 Bestimmung des Zuckergehaltes

Die Bestimmung des Zuckergehaltes erfolgt mit Hilfe der Ionenausschluß-Chromatographie. Das verwendete HPLC-System sowie die Chromatographie-Bedingungen befinden sich im Anhang.

Vor der Messung müssen die Proben zunächst entproteiniert werden. Dazu werden  $300\ \mu\text{L}$  Probe mit  $300\ \mu\text{L}$  einer kommerziellen Perchlorsäure/Perchlorat-Lösung (Fa. Merck) versetzt, durchgemischt und für 24 h im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend werden die Proben bei

14.000 rpm für 10 min. (Tischzentrifuge 5415, Fa. Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Für die Hydrolyse der Saccharose in Glucose und Fructose werden 300  $\mu\text{L}$  dieses Überstandes mit 300  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und für 3 h bei 80 °C und 500 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min.) wird der Überstand in Probenflaschen gefüllt und bis zur Injektion in die HPLC-Anlage im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.6.5 Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes erfolgt nach der Methode von van Urk, die von MICHELON UND KELLEHER [1963] modifiziert wurde. Dabei reagieren die Indolderivate mit dem Reagenz para-Dimethylaminobenzaldehyd und werden in einem zweiten Schritt durch Natriumnitrit oxidiert, wobei ein blauer Farbstoffkomplex entsteht.

700  $\mu\text{L}$  der filtrierten Probe werden mit 700  $\mu\text{L}$  Reagenz 1 (s. Anhang) vermischt und 60 min. in der Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Extinktion ( $E_1$ ) dieser Lösung in einer Quarzglasküvette (10 mm Schichtdicke) mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (UVIKON 922, Fa. Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Zu 1 mL dieser Lösung werden 25  $\mu\text{L}$  Reagenz 2 (s. Anhang) gegeben, durchmischt und die Extinktion ( $E_2$ ) wie oben bestimmt.

Von einer Kultivierungsprobe werden 3 Verdünnungen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  hergestellt und jede Lösung wie oben beschrieben behandelt. Die Differenz der Extinktionswerte ( $E_2 - E_1$ ) ergibt für jede Verdünnung den Extinktionswert  $E_p$ . Aus den  $E_p$ -Werten der drei Verdünnungen wird mittels linearer Regression die Steigung  $\Delta E_p$  berechnet. Die Gesamtalkaloidkonzentration ergibt sich aus der Division von  $\Delta E_p$  durch die Steigung der Kalibrationsgeraden  $\Delta E_K$ . Dieses Verfahren wird angewendet, um die möglichen Fehler der photometrischen Bestimmung zu minimieren [LOHMEYER ET AL., 1990].

Zur Aufstellung einer Kalibrationsgeraden werden aus einer Ergotamintartrat-Stammlösung (gelöst in saurer MeOH-Lösung) 7 Verdünnungen im Konzentrationsbereich 5-100  $\mu\text{g/mL}$  hergestellt und wie oben beschrieben behandelt. Aus den erhaltenen Werten wird eine Kalibrationskurve aufgestellt.

#### 3.6.5.1 Untersuchung des Einflusses von Hostinert 216 auf die Ergotalkaloide

Es werden drei 100 mL-Erlenmeyerkolben (mit Schraubverschluß und Schikanen) mit jeweils 32 mL T25-Produktionsmedium und 8 mL Hostinert 216 (20 % (v/v)) versehen und bei 105 °C für 20 min. autoklaviert. Anschließend werden 2,4 mL einer Ergotamintartrat-Stammlösung (0,5 mg/mL) zu jedem Kolben gegeben, so daß ein Alkaloidgehalt von 34,9 mg/L vorliegt. Die Kolben werden bei 24 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 24 h werden aus den Kolben Proben entnommen und auf ihren Gesamtalkaloidgehalt überprüft.

### 3.6.6 Bestimmung der Ergotamin- und $\alpha$ -Ergokryptingehalte

Für die Bestimmung der Konzentrationen der beiden Hauptprodukte müssen die Kultivierungsüberstände extrahiert werden, bevor sie mittels HPLC analysiert werden können. Die

Arbeiten müssen aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Substanzen lichtgeschützt durchgeführt werden.

Für die Extraktion werden 5 mL des membranfiltrierten Überstandes in einem 50 mL-Scheidetrichter mit einer Spatelspitze NaCl und einem Tropfen Ammoniak (32 %) versetzt. (Diese Reagenzien sorgen für die Schwächung der Hydrathülle der Alkaloide bzw. für die Deprotonierung der Aminogruppe im D-Ring, was die Löslichkeit der Alkaloide in apolaren Lösemitteln erhöht). Diese Lösung wird dreimal mit jeweils 10 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden in einem Spitzkolben am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 35 °C bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 500 µL Acetonitril aufgenommen, gelöst und in Probenflaschen gefüllt.

Die Trennung und Detektion der Ergotalkaloide erfolgt nach dem Reversed-Phase-Prinzip. Das verwendete HPLC-System sowie die chromatographischen Bedingungen sind im Anhang dargestellt.

#### 3.6.6.1 Untersuchungen zum Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Ergotalkaloide

Für diese Untersuchungen werden wäßrige Lösungen von Ergotamintartrat (245 mg/L) und  $\alpha$ -Ergokryptin (235 mg/L) eingesetzt. Von jeder Substanz werden jeweils 20 mL der Lösungen in zwei 100 mL-Erlenmeyerkolben gegeben. Diese Lösungen werden in der ersten Versuchsreihe mit 18,75 µL, in der zweiten mit 112,5 µL einer 3 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung versetzt, so daß in den Kolben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 1 mmol/L bzw. 6 mmol/L vorliegen. Die Kolben werden während des gesamten Analysenzeitraums in einem verdunkelten Rotationsschüttler (Certomat R mit Inkubationshaube H, Fa. Braun, Melsungen) bei 100 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Aus den Kolben werden unmittelbar nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe (90 s) Proben gezogen und diese unverzüglich mittels HPLC analysiert. Es werden weitere Proben in den ersten drei Stunden, die letzten Proben 24 h nach Zugabe entnommen und analysiert.

#### 3.6.6.2 Bestimmung der Wiederfindungsrate der Ergotalkaloide bei der Extraktion

Für diese Versuchsreihe werden Stammlösungen von Ergotamintartrat (0,921 mg/mL Ergotamin) und  $\alpha$ -Ergokryptin (0,79 mg/mL) eingesetzt. In 5 mL autoklaviertes (105 °C, 20 min.) T25-Produktionsmedium werden 500 µL einer Alkaloid-Stammlösung gegeben. Dabei wird jeweils nur eine Substanz pro Kolben eingesetzt, um mögliche, durch die Extraktion auftretende Zersetzungsprodukte den Ausgangssubstanzen zuordnen zu können. Diese Lösungen werden nach Zugabe von NaCl und Ammoniak, wie in Kapitel 3.6.6 beschrieben, extrahiert. Für jedes Alkaloid werden fünf Versuchsansätze durchgeführt und die Proben in Doppelbestimmung mittels HPLC analysiert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate bei der Extraktion von Kultivierungsproben

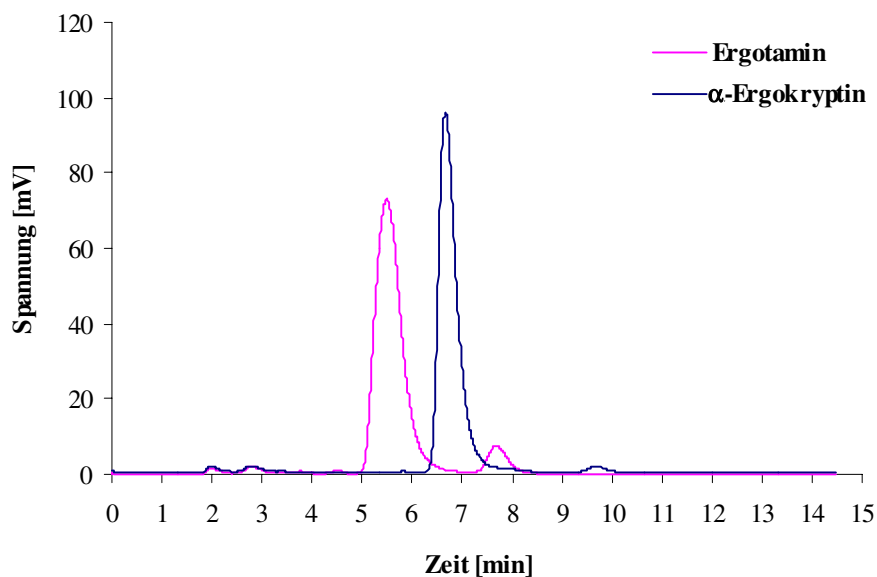
Um die bei einer Extraktion auftretenden Meßfehler weitestgehend auszuschließen, wird in vielen Fällen mit internen Standards gearbeitet. Dadurch können die Analytkonzentrationen quantifiziert werden.

Das in der Literatur bei der Extraktion der Kultivierungsproben von *Claviceps* Fermentationen als interner Standard verwendete Xylol [REISS, 1990] kann mit dem in dieser Arbeit benutzten HPLC-System nicht detektiert werden. Das Alkaloid Coffein läßt sich zwar problemlos unter den gegebenen Bedingungen als Reinsubstanz bestimmen und von den Ergotalkaloiden trennen, allerdings zersetzt es sich unter den alkalischen Extraktionsbedingungen. Als Folge sind verschiedene Zersetzungsprodukte detektierbar [Daten nicht gezeigt].

Um dennoch eine Aussage über die Qualität der Extraktion treffen zu können, werden die Wiederfindungsraten der beiden Ergotalkaloide Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin bei der Extraktion bestimmt. Dazu wird autoklaviertes T25-Medium verwendet, um zumindest die am Anfang einer Kultivierung vorliegenden Bedingungen zu simulieren. Auf die Medienänderung im Laufe der Kultivierung kann jedoch nicht eingegangen werden. Für jedes Alkaloid werden fünf Ansätze extrahiert und die Proben mittels HPLC zweimal vermessen. Zu den wäßrigen Medien wird zu Beginn der Extraktion NaCl gegeben, um die Hydrathülle der Alkaloide zu zerstören. Des weiteren wird das Medium mit  $\text{NH}_3$  alkalisiert, da somit die Löslichkeit der Alkaloide in apolaren Lösemitteln erhöht wird.

Die in den Ansätzen eingestellten Konzentrationen der Alkaloide betragen für Ergotamin 0,921 mg/mL und für  $\alpha$ -Ergokryptin 0,79 mg/mL.

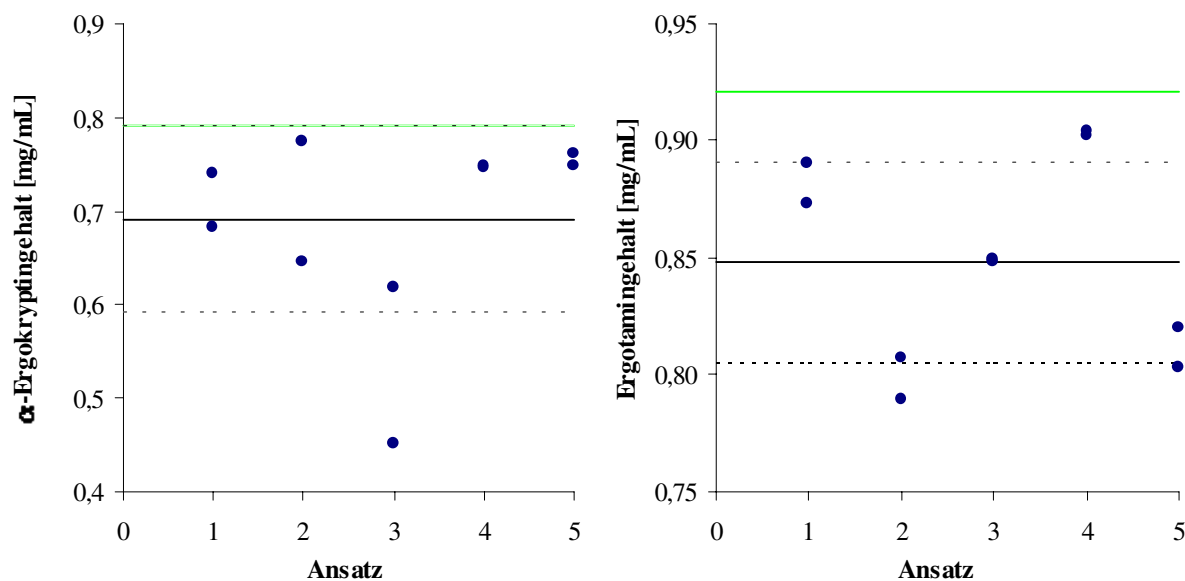
In Abbildung 4-1 sind die Chromatographieverläufe einer Ergotamin- und einer  $\alpha$ -Ergokryptin-Probe übereinandergelegt dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die beiden Alkaloide nahezu basisliniengetrennt detektiert werden können. In beiden Verläufen ist neben dem Hauptpeak des jeweiligen Alkaloids ( $t_R(\text{Ergotamin}) = 5,5 \text{ min.}$ ;  $t_R(\alpha\text{-Ergokryptin}) = 6,7 \text{ min.}$ ) ein zusätzlicher Peak zu erkennen. Ihre Retentionszeiten liegen in der Ergotamin-Probe bei  $t_R = 7,7 \text{ min.}$ , in der  $\alpha$ -Ergokryptin-Probe bei  $t_R = 9,7 \text{ min.}$ . Bei beiden Proben werden zusätzliche Peaks zwischen der 2.-5. Minute detektiert. Diese zusätzlichen Peaks weisen auf Zersetzungsprodukte bzw. auf Isomerisierungen der Standardsubstanzen hin, die z.B. durch Lichteinfluß auftreten können [BETHKE ET AL., 1976]. Dabei können u.a. Ergotaminin, Aci-Ergotamin sowie Aci-Ergotaminin entstehen. Dies verdeutlicht, daß die Extraktionen möglichst unter Lichtausschluß durchgeführt werden sollten.



**Abbildung 4-1.**

Übereinandergelagte Chromatogramme der extrahierten Ergotalkaloidproben (Bedingungen s. Kapitel 3.6.6).

Wie sehr die Bildung dieser Zersetzungsprodukte die Wiederfindungsrate der beiden Alkaloide beeinflusst, kann aus Abbildung 4-2 entnommen werden, in der die nach der Extraktion ermittelten Konzentrationen von  $\alpha$ -Ergokryptin bzw. Ergotamin aufgetragen sind.



**Abbildung 4-2.**

Bestimmung der Wiederfindungen bei der Extraktion  $\alpha$ -Ergokryptin- (links) und Ergotamin- (rechts) haltigen Proben. — Sollwert, — Mittelwert, ..... Standardabweichung.

Bei der Extraktion von  $\alpha$ -Ergokryptin liegt die mittlere Wiederfindung bei 87,5 %, die Standardabweichung beträgt 12,6 %. Die mittlere Wiederfindung bei der Extraktion der Ergotamin-Proben ist mit 92,1 % höher, die Standardabweichung beträgt hier nur 4,6 %.



Die hier vorliegenden Wiederfindungen liegen mit durchschnittlich 87,5 % bzw. 92,1 % deutlich über der von LOHMEYER [1990] für dieses Extraktionsverfahren angegebenen Ausbeute von 60 %. Obwohl beide Alkaloide teilweise isomerisieren oder sich zersetzen, sind die Extraktionsraten sehr hoch. Die Präzision der Ergotaminextraktion ist mit 4,6 % als sehr gut zu bezeichnen. Damit kann diese Methode zur Aufbereitung der Kultivierungsproben verwendet werden. Die analysierten Konzentrationen der Kultivierungsproben müssen mit einem Faktor multipliziert werden, der sich aus den mittleren Wiederfindungsraten berechnen läßt. Für die Ergotamin-Werte lautet der Faktor 1,085, für die  $\alpha$ -Ergokryptin-Gehalte 1,143.

## 4.2 Kultivierungen von *Claviceps purpurea* in Schüttelkolben unter Zusatz verschiedener Antischaummittel

Aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs und der dadurch bedingten hohen Begasungsrate bzw. Rührerdrehzahl bei Kultivierungen von *Claviceps purpurea* im Bioreaktor ist eine starke Schaumentwicklung zu beobachten. Die Zellen werden dabei teilweise durch Flotation aus dem Medium getragen, so daß sie bevorzugt an der Reaktorwand wachsen und dadurch der Analytik nicht mehr zugänglich sind (s. Kapitel 4.6.1). Um dieses zu verhindern, ist der Einsatz von Antischaummitteln sinnvoll. Da der Pilz jedoch sehr empfindlich gegenüber Änderungen in der Mediumkomposition reagiert [KOBEL UND SANGLIER, 1986], muß für jeden Stamm das optimale Antischaummittel gesucht werden. Dabei sollten das Zellwachstum und die Alkaloidproduktion nicht beeinträchtigt werden.

In dieser Versuchsreihe werden die drei Antischaummittel Desmophen 3900, Silicon sowie Paraffin, die häufig in Kultivierungen eingesetzt werden, getestet. Diese werden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugefügt. Ausführliche Betrachtungen der Ergebnisse sind bei BOEHL [1998] zu finden.

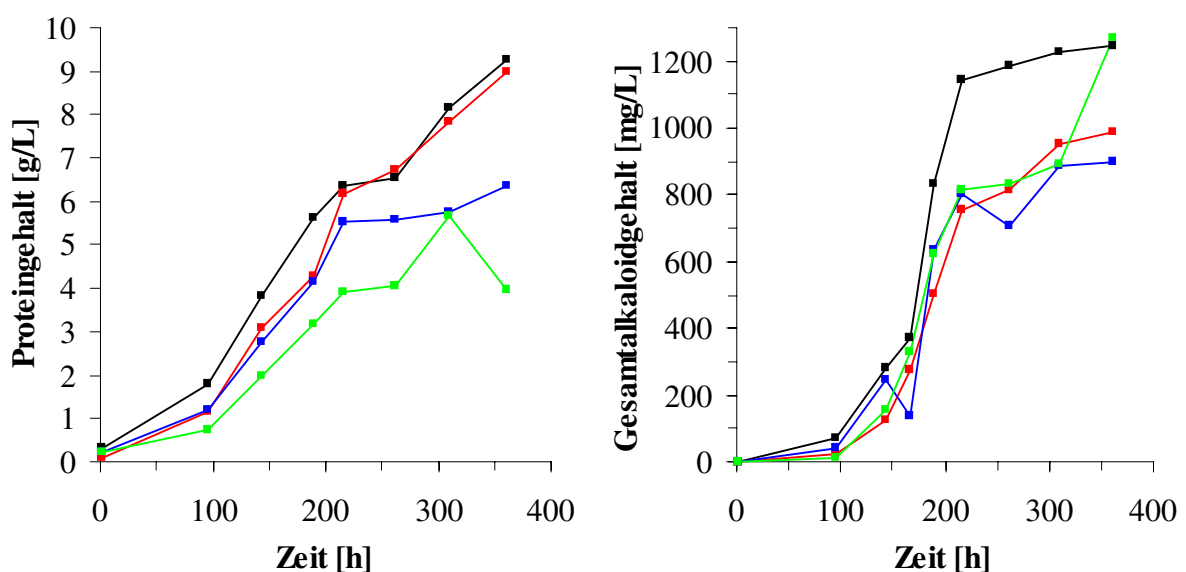


Abbildung 4-3.

Protein- und Gesamtalkaloidkonzentrationen bei Zugabe von 0,3 % (v/v) Antischaummittel.

—■— Referenz, —■— Desmophen, —■— Paraffin, —■— Silicon.

Exemplarisch sind in Abbildung 4-3 die Proteinkonzentrationen und Gesamtalkaloidgehalte für die drei Antischaummittel bei einer Konzentration von 0,3 % (v/v) dargestellt. Während sich die Biotrockenmassen der verschiedenen Kulturen nicht signifikant voneinander unterscheiden (Daten nicht gezeigt), sind deutliche Unterschiede in den Proteingehalten zwischen den Kulturen mit Antischaummittel und der Referenz zu erkennen. Die Kultur mit Desmophen zeigt mit 9,0 g/L einen ähnlichen Proteingehalt auf wie die Referenz (9,3 g/L), wohingegen am Ende der Kultivierung die Ansätze mit Paraffin und Silicon nur 6,4 bzw. 4,0 g/L aufweisen. Die Verläufe des Gesamtalkaloidgehaltes liegen bei den drei Zusätzen deutlich unterhalb der Referenz, lediglich der letzte Wert im Silicon-Ansatz liegt im Bereich der Referenz. Ein konzentrationsabhängiger Einfluß auf die Biotrockenmasse bzw. die Proteinproduktion ist bei allen drei Antischaummitteln nicht erkennbar, da alle Werte ähnliche Verläufe und Konzentrationen aufweisen. Im Fall der Alkaloidproduktion sind jedoch Unterschiede erkennbar. In Tabelle 4-1 sind sowohl der Gesamtalkaloidgehalt sowie die Ergotamin- und  $\alpha$ -Ergokryptin-Konzentrationen aller Proben vom 13. Kultivierungstag aufgeführt.

**Tabelle 4-1.**

Vergleiche der Gesamtalkaloid-, Ergotamin- und  $\alpha$ -Ergokryptin-Konzentrationen am 13. Kultivierungstag bei Kultivierungen unter Zusatz von Antischaummitteln (Abkürzungen s. Kapitel 3.2.1).

Ansatz	Gesamtalkaloid- gehalt [mg/L]	Ergotamingehalt [mg/L]	$\alpha$ -Ergokryptingehalt [mg/L]
Referenz	1227	94	13
Des 0,03	823	116	13
Des 0,1	918	124	11
Des 0,3	950	115	9
Para 0,03	1016	114	14
Para 0,1	928	76	11
Para 0,3	886	96	12
Sil 0,03	1012	60	10
Sil 0,1	1130	71	11
Sil 0,3	895	86	9

Ähnlich wie bei REISS [1990], die die Antischaummittel Paraffin, Silicon und Olivenöl auf ihren Einfluß bei einer *Claviceps* Kultivierung untersuchte, ist der Gesamtalkaloidgehalt in allen Ansätzen mit Antischaummitteln geringer als der Referenzwert. Obwohl Desmophen die geringsten Gesamtalkaloidkonzentrationen hervorruft, liegen die Ergotaminkonzentrationen höher als die der Referenz. Zwar bedingt der Einsatz von Desmophen im Schüttelkolben eine geringere Gesamtalkaloidproduktion, da jedoch das Hauptprodukt Ergotamin der wichtigste Faktor ist, und durch die hohe Schaumentwicklung in Kultivierungen ohne Antischaummittel die Produktausbeuten stark erniedrigt werden, scheint der Einsatz dieser Substanz in Rührkesselfermentationen sinnvoll. Dabei sollten allerdings nur geringe Desmophenkonzentrationen verwendet werden.

### 4.3 Voruntersuchungen zur Sauerstoffversorgung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Bevor ein System zur Sauerstoffversorgung mit Wasserstoffperoxid aufgebaut werden kann, muß zunächst untersucht werden, ob und in wieweit diese Substanz zum einen die Mikroorganismen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkt als Zellgift) und zum anderen die Produkte beeinflusst. Zudem wird untersucht, ob der Einsatz von Katalysatoren zur schnelleren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung notwendig ist. Diese Voruntersuchungen sind in Zusammenarbeit mit BOEHL [1998] durchgeführt worden.

#### 4.3.1 Untersuchungen zum Einfluß von Wasserstoffperoxid auf die Ergotalkaloide

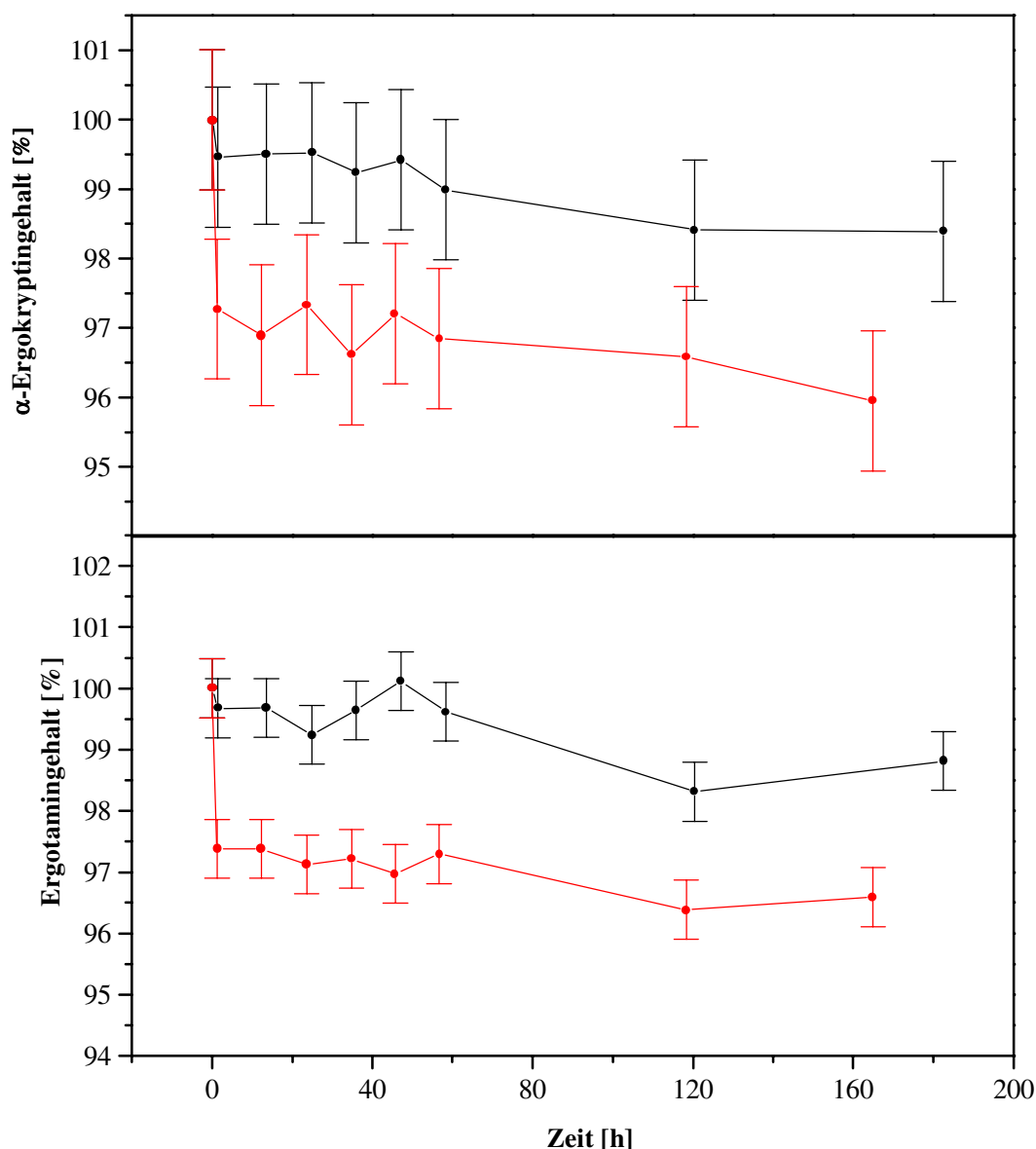
Wasserstoffperoxid wirkt sowohl in saurer als auch in alkalischer Lösung gegenüber vielen Verbindungen oxidierend. Daher könnte es bei Zugabe zu Kultivierungen von *Claviceps purpurea* die Produktausbeute durch Reaktionen mit den funktionellen Gruppen der Alkaloide vermindern. REISS [1990] stellte bei Untersuchungen des Einflusses von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das Alkaloid Ergometrin fest, daß bereits nach 15 Sekunden Einwirkzeit hohe Alkaloidverluste auftreten. In ihrer Untersuchung zeigten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen kleiner 0,1 mM/L keine Wirkungen auf die Substanzen. Beim Einsatz von 0,5 mM/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnten jedoch 7,7 % und bei einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 5 mM/L bereits 29,3 % nach 15 Sekunden nicht mehr nachgewiesen werden.

Demzufolge wird der Einfluß von Wasserstoffperoxid auf Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin untersucht. Dabei werden wäßrige Lösungen der Alkaloide mit Konzentrationen von 245 mg/L (Ergotamin) und 235 mg/L ( $\alpha$ -Ergokryptin) verwendet.

In Abbildung 4-4 sind die prozentualen Alkaloidabnahmen in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen dargestellt. Eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 1 mM/L führt nach 2 Stunden bei den Alkaloiden zu einer Abnahme von 1,2 % (Ergotamin) bzw. 1,6 % ( $\alpha$ -Ergokryptin). Deutlichere Änderungen treten jedoch bei der 6 mM/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung auf, wo bei beiden Alkaloiden innerhalb der ersten 90 s ein großer Abfall zu verzeichnen ist (Ergotamin: 2,4 %,  $\alpha$ -Ergokryptin: 2,7 %). Nach 2 Stunden sind Verluste von insgesamt 3,6 % Ergotamin und 3,4 %  $\alpha$ -Ergokryptin zu beobachten. Nach 24 Stunden sind keine weiteren Abnahmen festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Zwar sind die von REISS [1990] beobachteten, hohen Verluste nicht ermittelt worden, dennoch ist für die Anwendung von Wasserstoffperoxid als Sauerstoffquelle der Einsatz von Katalysatoren zu empfehlen. Dadurch kann die Spaltung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schneller erfolgen, was besonders wichtig ist, da in den ersten Sekunden nach der Zugabe die Alkaloidkonzentrationen gefallen sind.

Dieser Versuch zeigt außerdem, daß die Zugabe von hohen Konzentrationen Wasserstoffperoxid zu größeren Verlusten führt. Für einen Einsatz bei Kultivierungen bedeutet dies, daß die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> so erfolgen muß, daß auch nur kurzzeitig hohe Konzentrationen im Medium vermieden werden müssen.



**Abbildung 4-4.**

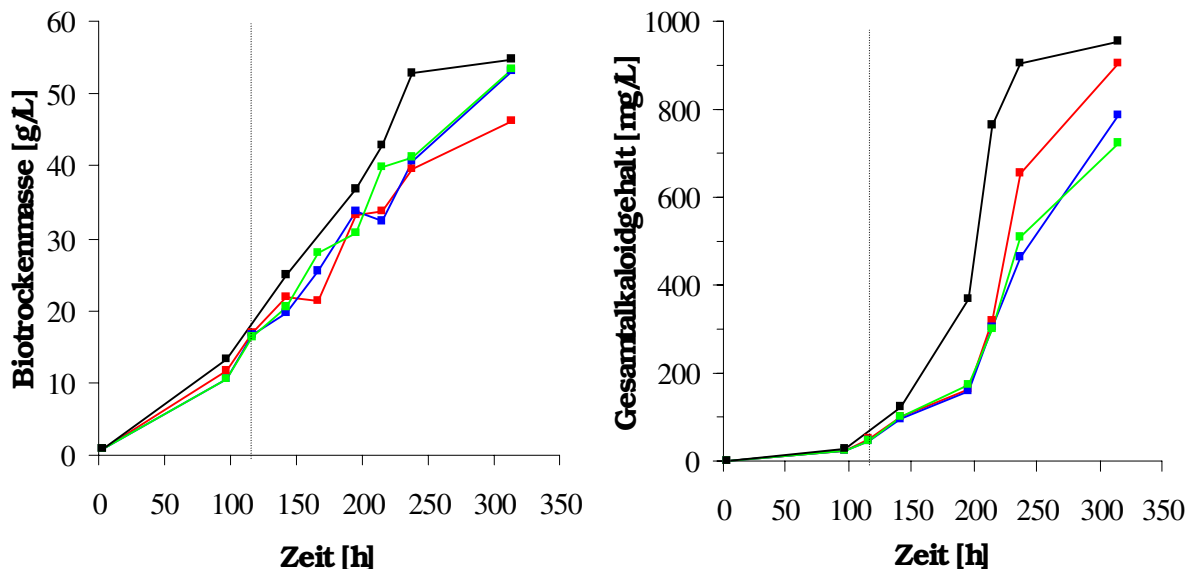
Prozentuale Abnahme des Ergotamin- bzw. α-Ergokryptingehaltes bei Zugabe verschiedener H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen [BOEHL, 1998]. —■— 1 mM/L, —■— 6 mM/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Die Fehlerbalken kennzeichnen die absoluten Fehler der chromatographischen Bestimmung.

#### 4.3.2 Einfluß von Wasserstoffperoxid auf Kultivierungen von *Claviceps purpurea*

Die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Mikroorganismen wird in Schüttelkulturen des Pilzes untersucht. Dazu werden ab Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (ab dem 6. Tag) täglich unterschiedliche Volumina einer 3 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu den Kulturen gegeben, so daß verschiedene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Kolben vorliegen.

Aus den zeitlichen Verläufen der Biotrockenmassen, die in Abbildung 4-5 dargestellt sind, ist keine toxische Wirkung des Wasserstoffperoxids innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches zu erkennen.



**Abbildung 4-5.**

Zugabe von Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen zu Kultivierungen von *Claviceps purpurea*. Darstellung der zeitlichen Verläufe von Biotrockenmasse und Gesamtalkaloidgehalt. ..... Beginn der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe, —■— Referenz, —■— 0,1 mM/L, —■— 0,5 mM/L, —■— 1,0 mM/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Die Werte für die Kolben mit Peroxid-Zugabe liegen zwar größtenteils unterhalb des Referenzwertes, wobei allerdings keine Abnahme der Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zu erkennen ist. Die hier nicht gezeigten Proteingehalte weisen in allen Kolben bis zum 9. Tag ähnliche Konzentrationen auf. Am Ende der Kultivierung liegen die Proteingehalte in den Kolben mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe zwischen 5,9 –7,4 g/L, während im Referenzkolben 8,7 g/L erreicht wird. Die Konzentrationen an Ergotalkaloiden zeigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängige Tendenzen. Während der Alkaloidgehalt im Referenzkolben ab dem 4. Tag bis zum 10. Tag stark ansteigt und eine Endkonzentration von 954 mg/L erreicht, nehmen die Konzentrationen in den anderen drei Kolben nur langsam zu. Ab dem 9. Tag ist hier eine verstärkte Zunahme zu verzeichnen, die Endkonzentrationen liegen mit 903 (0,1 mM/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 785 (0,5 mM/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bzw. 722 g/L (1,0 mM/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) teilweise deutlich unterhalb der Referenz.

Einen deutlichen Einfluß auf die Ergotaminausbeute zeigen die Ergebnisse der extrahierten Proben vom Kultivierungsende, die in Tabelle 4-2 aufgeführt sind.

**Tabelle 4-2.**

Ergotamin- und  $\alpha$ -Ergokryptin-Konzentrationen am Ende der Kultivierung.

Kolben	Ergotamin [mg/L]	[%]	$\alpha$ -Ergokryptin [mg/L]	[%]
Referenz	71,6	100	14,6	100
0,1 mM/L $\text{H}_2\text{O}_2$	14,8	20,6	11,9	81,5
0,5 mM/L $\text{H}_2\text{O}_2$	16,5	23,0	7,8	53,4
1,0 mM/L $\text{H}_2\text{O}_2$	16,1	22,5	6,4	43,8

Demnach erreichen alle Kolben mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zufütterung im Vergleich zur Referenz nur noch 21-23 % der Ergotaminkonzentrationen. Die  $\alpha$ -Ergokryptin-Konzentrationen sind ebenfalls deutlich erniedrigt, wobei hier wiederum eine Abnahme in Abhängigkeit der zugesetzten Peroxidmenge zu beobachten ist (44-82 %).

Durch die Zufütterung von Wasserstoffperoxid wird der Stoffwechsel von *Claviceps purpurea* negativ beeinflusst. Zwar wirkt es sich kaum auf die Biotrockenmasse aus, dafür sind sowohl die Proteingehalte als auch die Ergotalkaloidkonzentrationen stark reduziert. Ob letzteres durch direktes Einwirken des Peroxids auf die Alkaloide oder durch die Beeinflussung des Stoffwechsels bedingt ist, bleibt unklar. Allerdings haben die Voruntersuchungen gezeigt, daß der Alkaloidverlust durch Einwirkung des Peroxids auf die Ergotalkaloide prozentual wesentlich geringer ist als die in den Schüttelkulturen ermittelte Konzentrationsabnahme der Produkte (s. Kapitel 4.3.1).

SCHLEGEL [1977], IBRAHIM UND SCHLEGEL [1980] und HOLST ET AL. [1982] beschrieben zelltoxische Effekte von Wasserstoffperoxid bei Kultivierungen verschiedener Mikroorganismen. Ähnliche Einflüsse haben sich in diesen Experimenten zwar nicht auf die Biomassekonzentration, dafür jedoch auf die Stoffwechselaktivität und die Produktivität der Zellen ausgewirkt. Weiterhin muß bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, daß die Zugabe des Peroxids in diesen Experimenten nur einmal täglich, also nicht kontinuierlich stattgefunden hat.

REISS [1990] ermittelte bei dem von ihr verwendeten *Claviceps purpurea* Stamm eine Erniedrigung der Atmungsaktivität um 33 % bei Zugabe einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 mM/L. Ähnliche Versuche von BOEHL [1998] mit dem in dieser Arbeit verwendeten *Claviceps* Stamm und Zugabe einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 1 mM/L zeigten entsprechende Abnahmen der Atmungsaktivität.

Aus diesen Gründen sollte bei allen weiteren Versuchen mit geringen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid gearbeitet und zugleich Katalysatoren eingesetzt werden, die eine schnelle Spaltung des Peroxids garantieren.

### 4.3.3 Voruntersuchungen für den Einsatz der Katalysatoren

Da Wasserstoffperoxid sowohl den Stoffwechsel des Pilzes als auch die Alkaloidausbeute negativ beeinflusst, ist der Einsatz geeigneter Katalysatoren sinnvoll. Demzufolge werden zwei Substanzen ausgewählt und auf ihre Katalysator-Eigenschaften hin untersucht. Zum einen wird als Katalysator biologischen Ursprungs Katalase und als anorganischer Katalysator Braunstein MnO<sub>2</sub> eingesetzt.

Zur Bestimmung der optimalen Enzymmenge zur schnellen Spaltung des Peroxids sind unterschiedliche Katalase-Konzentrationen im stickstoffgesättigten Medium eingestellt und die Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Konzentration

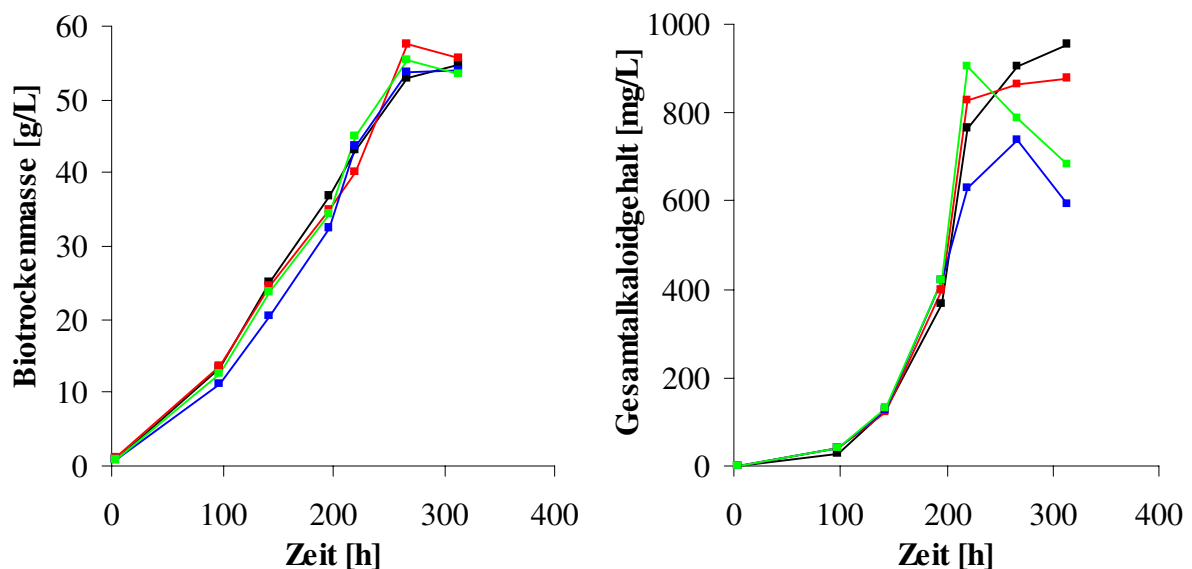
im Medium: 0,8 mM/L) gemessen worden. Dabei zeigt sich, daß die Katalase-Konzentration mindestens 25 mg/L (50.000-125.000 units) betragen sollte.

Der bei Kultivierungen von *Claviceps purpurea* eingestellte pH-Wert des Mediums liegt mit 5,2 nicht im pH-Optimum der Katalase (pH 7-11). Da ihre Aktivität außerdem von der Temperatur und den Medienzusammensetzungen abhängt, ist die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit im Medium untersucht worden. Die Katalase weist dabei schon nach 24 Stunden Aktivitätsverluste auf, so daß das Enzym bei Kultivierungen täglich neu zugegeben werden muß, um eine schnelle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung zu gewährleisten. Ähnliche Ergebnisse lieferten IBRAHIM UND SCHLEGEL [1980b], die in ihrem System aufgrund hoher Aktivitätsverluste ebenfalls häufig neue Enzymlösung zuführen mußten.

Um mit dem Katalysator Braunstein vergleichbare Zersetzungsgeschwindigkeiten wie bei einem Einsatz von Katalase zu erhalten, sind verschiedene MnO<sub>2</sub>-Konzentrationen in stickstoffgesättigtem Medium eingestellt und Wasserstoffperoxid (Anfangskonzentration 0,5 mM/L) zugegeben worden. Dabei ergibt eine MnO<sub>2</sub>-Konzentration von 1,0 g/L die höchste und in der Größenordnung der Katalase liegende Zersetzungsgeschwindigkeit.

#### 4.3.4 Untersuchungen zum Einfluß von MnO<sub>2</sub> auf *Claviceps purpurea*

Da *Claviceps purpurea* sehr empfindlich auf Veränderungen der Medienzusammensetzung reagieren kann, muß überprüft werden, inwieweit die Zugabe von Braunstein als Katalysator das Wachstum und die Ergotalkaloidproduktion beeinflusst. Dazu werden Kultivierungen des Pilzes in Schüttelkulturen unter Zusatz unterschiedlicher MnO<sub>2</sub>-Konzentrationen durchgeführt.



**Abbildung 4-6.**

Verläufe der Biotrockenmasse und des Gesamtalkaloidgehaltes bei Kultivierungen mit unterschiedlichen MnO<sub>2</sub>-Konzentrationen [BOEHL, 1998]. —■— Referenz, —■— 0,1 g/L, —■— 0,5 g/L, —■— 1,0 g/L MnO<sub>2</sub>.

Aus den in Abbildung 4-6 dargestellten Verläufen der Biotrockenmassen ist zu erkennen, daß selbst die hohe  $\text{MnO}_2$ -Konzentration von 1,0 g/L keinen Einfluß auf das Pilzwachstum ausübt. Am Ende der Kultivierung liegen die Werte aller Kultivierungen im Bereich zwischen 53,5-55,5 g/L. Die hier nicht gezeigten Werte der Proteinkonzentrationen weisen am Kultivierungsende Unterschiede auf. Alle Kulturen mit Braunstein erreichen geringere Proteingehalte im Vergleich zu der Referenz (8,7 g/L). Die Kulturen besitzen daher nur 70-87 % der Proteinkonzentration der Referenz, wobei allerdings keine  $\text{MnO}_2$  konzentrationsabhängige Tendenz erkennbar ist. Auch die Gesamtalkaloidgehalte der  $\text{MnO}_2$ -haltigen Kulturen liegen unterhalb der Referenz, wiederum jedoch unabhängig von der Braunstein-Konzentration. Während im Referenzansatz am letzten Kultivierungstag 954 mg/L Alkaloide vorliegen, sind in den Kolben mit 0,1 g/L  $\text{MnO}_2$  nur 878 mg/L ( $\cong$  92 %), mit 0,5 g/L 591 mg/L ( $\cong$  62 %) und mit 1,0 g/L 684 mg/L ( $\cong$  72 %) Ergotalkaloide vorhanden. Die Analysen der extrahierten Proben des Kultivierungsüberstandes bestätigen diese Konzentrationsabnahme für beide Alkaloide, Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin [BOEHL, 1998].

Somit wird die Alkaloidproduktion durch die Zugabe von Braunstein verringert. Die Ursache dafür kann in einer Beeinflussung der Mikroorganismen oder im direkten Einfluß auf die Alkaloide liegen. Aus diesem Grund ist abzuwägen, in welchem Konzentrationsbereich dieser Katalysator bei Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe eingesetzt werden sollte. Zwar sind hohe Konzentrationen von 1,0 g/L für eine schnelle Spaltung des Peroxids notwendig, gleichzeitig können zu hohe Mengen die Produktausbeute verringern. Daher empfiehlt es sich, Braunstein in einer Konzentration von 0,1 g/L einzusetzen.

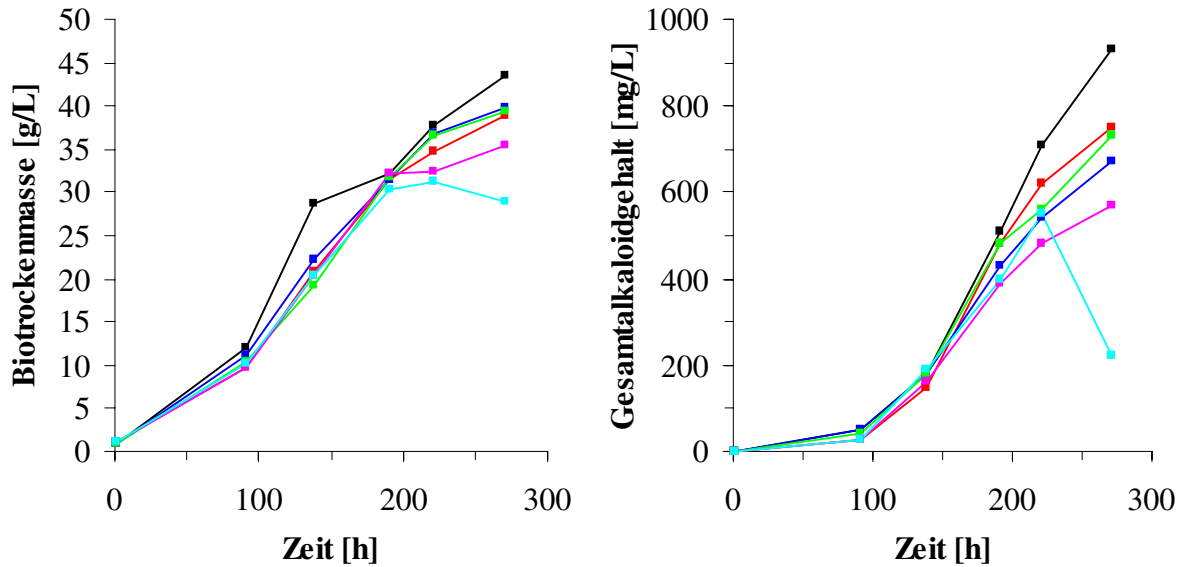
#### **4.3.5 Schüttelkolbenkultivierungen von *Claviceps purpurea* mit Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_2$ und Katalysatoren**

Bevor Wasserstoffperoxid bei Kultivierungen im Bioreaktor als zusätzliche Sauerstoffquelle eingesetzt werden kann, werden in Schüttelkolben die beiden Katalysatoren (in zwei Konzentrationen) verwendet. Neben einer Referenzkultur wird ferner ein Kolben angesetzt, der keinen Katalysator enthält, dem jedoch auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt wird. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe erfolgt täglich. Die Katalase wird jeden Tag frisch zum Medium gegeben.

Aus Abbildung 4-7 ist zu erkennen, daß die Biotrockenmassen in allen Ansätzen ähnliche Verläufe zeigen. Einzige Ausnahme bildet der Ansatz Ka 2, in dem höchstwahrscheinlich eine Kontamination vorliegt. Größere Unterschiede treten bei den Gesamtalkaloidgehalten auf, wobei alle Ansätze mit Peroxidzugabe unterhalb der Referenz liegen. Dabei differieren die Ansätze mit  $\text{MnO}_2$  bzw. ohne Katalysator nur geringfügig voneinander. Die Kolben mit Katalase erreichen deutlich geringere Gehalte am 11. Tag, was bei Ka 2 an der Kontamination liegen könnte. Ka 1 zeigt nur 61 % Ausbeute im Vergleich zur Referenz.

Die Daten verdeutlichen, daß die Zugabe von Wasserstoffperoxid einzig auf die Produktbildung und nicht auf das Zellwachstum wirkt.





**Abbildung 4-7.**

Kultivierungen unter Zusatz von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Katalase und MnO<sub>2</sub>. —■— Referenz, —■— H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, —■— MnO<sub>2</sub> 0,1, —■— MnO<sub>2</sub> 1,0, —■— Ka 1, —■— Ka 2 (Abkürzungen s. Kapitel 3.2.4).

Eine Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat in den Schüttelkulturen keine Steigerung der Alkaloidbildung bewirkt. Dies kann damit erklärt werden, daß in diesem System bedingt durch ein günstiges Verhältnis von Flüssigkeitsoberfläche zu –volumen bereits eine ausreichende Sauerstoffversorgung vorliegt. Untersuchungen von LOHMEYER UND SANDER [1993] zeigten, daß geringere Flüssigkeitsvolumina in Schüttelkolben zu einer erhöhten Alkaloidproduktion führen. Aufgrund der großen Oberfläche bei einem Volumen von 80 mL im 500 mL Erlenmeyerkolben ist der Phasenübergang des Sauerstoffs erheblich erhöht, was in hohen Produktivitäten resultiert. Demnach scheint die Sauerstoffversorgung in diesem Schüttelkolbensystem bereits optimal zu sein und kann durch eine tägliche Zugabe von Wasserstoffperoxid nicht gesteigert werden.

Im Bioreaktor liegen jedoch andere Verhältnisse vor, da dort andere Volumen/Oberfläche Verhältnisse vorhanden sind. Die Luftzufuhr erfolgt dabei nicht ausschließlich über die Flüssigkeitsoberfläche, sondern durch direkte Begasung des Mediums mit Druckluft, wobei die Schwierigkeiten im Sauerstofftransport von der Gas- zur flüssigen Phase liegen. Ein Einsatz des Systems H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Katalysator im Bioreaktor ist sinnvoll und vielversprechend, da hier der Sauerstoff bereits in der flüssigen Phase vorliegt und somit der Phasenübergang Gas/Flüssigkeit entfällt.

Weiterhin ist zu bedenken, daß die Peroxidzugabe in diesem Versuch nur einmal täglich stattgefunden hat. Beim Einsatz im Reaktor hingegen ist über einen längeren Zeitraum mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zufütterung zu rechnen, um den hohen Sauerstoffbedarf zu decken. Daher ist dort der Einsatz eines Katalysators auf jeden Fall zu empfehlen.

Mangandioxid als Katalysator zeigt gegenüber Katalase deutliche Vorteile, die nicht durch die Produktausbeuten, sondern durch die einfachere Handhabung zu erklären sind. Im Gegensatz

zur Katalase kann es direkt mit dem Medium autoklaviert werden und bleibt während der gesamten Kultivierung stabil. Katalase muß dem Medium ständig steril zugeführt werden, wodurch zum einen erhebliche Kosten verursacht werden und zum anderen ein hohes Kontaminationsrisiko entsteht. Aus diesem Grund wird in den Kultivierungen im Bioreaktor mit dem System  $\text{MnO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  gearbeitet.

#### 4.4 Kultivierungen in Schüttelkolben unter Zusatz von Sojaöl

ROLS UND GOMA [1991] setzten bei Kultivierungen von *Aerobacter aerogenes* Sojaöl in Konzentrationen bis 19 % (v/v) ein, wodurch der  $k_{\text{LA}}$ -Wert um den Faktor 1,85 erhöht wurde. Andererseits können hohe Sojaölkonzentrationen in der Antibiotikaproduktion zu einem Abfall des  $k_{\text{LA}}$ -Wertes führen.

Die in zwei Versuchsreihen eingesetzten Sojaölkonzentrationen liegen im Bereich zwischen 4,8-16,7 % (v/v). In Abbildung 4-8 sind die Biotrockenmassen und die Gesamtalkaloidgehalte in Abhängigkeit von der Zeit für die beiden Versuchsreihen dargestellt. In der ersten Versuchsreihe wird bei Einsatz von 16,7 % (v/v) Sojaöl eine um 74 % höhere Biotrockenmasse gegenüber Referenz 1 ermittelt. Ähnliche Resultate sind in der Versuchsreihe 2 bei einer Sojaölkonzentration von 9,1 % zu erkennen, bei der eine Erhöhung der Biotrockenmasse gegenüber Referenz 2 um 41 % vorliegt. Lediglich der Kolben mit der geringsten Sojaölkonzentration von 4,8 % zeigt gegenüber Referenz 2 eine um 5,4 % erniedrigte Biomasse. Diese Ergebnisse werden durch die Methode der Ermittlung der Biotrockenmasse beeinflusst, da sich das Sojaöl beim Filtrieren als Film über die Zellmasse legt, nicht ausgespült werden kann und somit für die Erhöhung der Biomasse sorgt. Daher ist auch eine Abhängigkeit der Steigerung der Biotrockenmasse von der eingesetzten Sojaölkonzentration erkennbar.

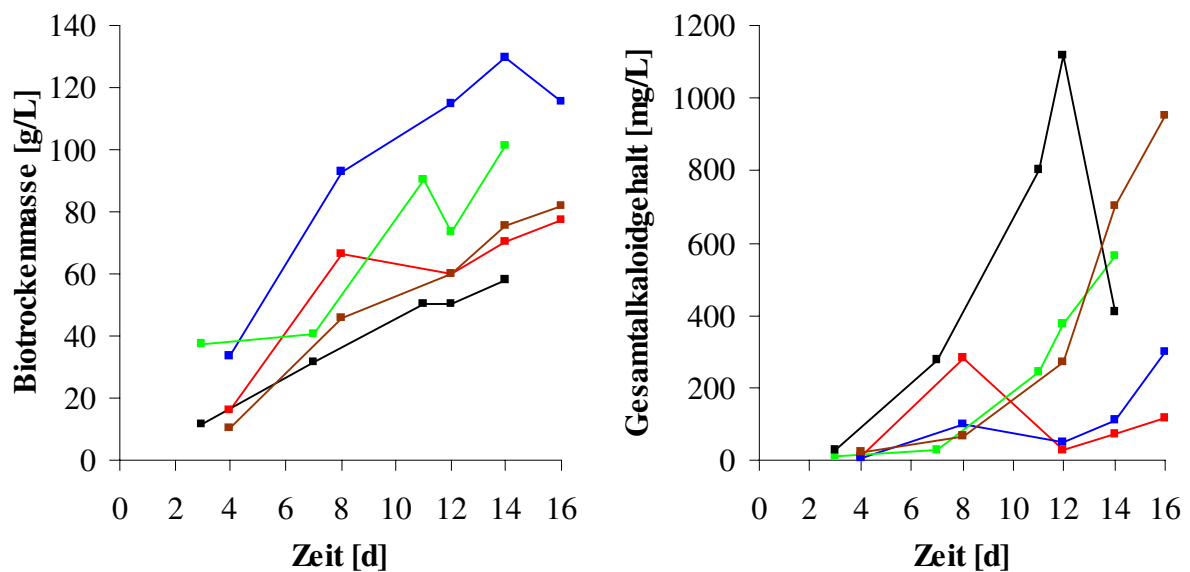


Abbildung 4-8.

Kultivierungen unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Sojaöl. —■— Referenz 1, —■— Referenz 2, —■— 4,8 % (v/v) Sojaöl (2), —■— 9,1 % (v/v) Sojaöl (2), —■— 16,7 % (v/v) Sojaöl (1).

Im Gegensatz dazu liegen in beiden Versuchsreihen die Gesamtalkaloidgehalte deutlich unterhalb der jeweiligen Referenzkultivierung. So wird bei Zusatz von 4,8 % Sojaöl am letzten Kultivierungstag nur 12 % des in der Referenz 2 ermittelten Alkaloidgehalts erreicht. In den anderen Kolben mit Sojaölzusatz sind nur 31 % der Alkaloidkonzentration (bei 9,1 % Sojaöl, 16. Kultivierungstag) bzw. 34 % (bei 16,7 % Sojaöl, 12. Kultivierungstag) im Vergleich zur jeweiligen Referenz detektierbar.

Der Einsatz von Sojaöl in Kultivierungen von *Claviceps purpurea* ist aufgrund der dargestellten Ergebnisse nicht sinnvoll, da bereits in Schüttelkolbenkultivierungen negative Einflüsse auf die Alkaloidproduktion festzustellen sind.

## 4.5 Voruntersuchungen zu Kultivierungen im 2-Phasen-System

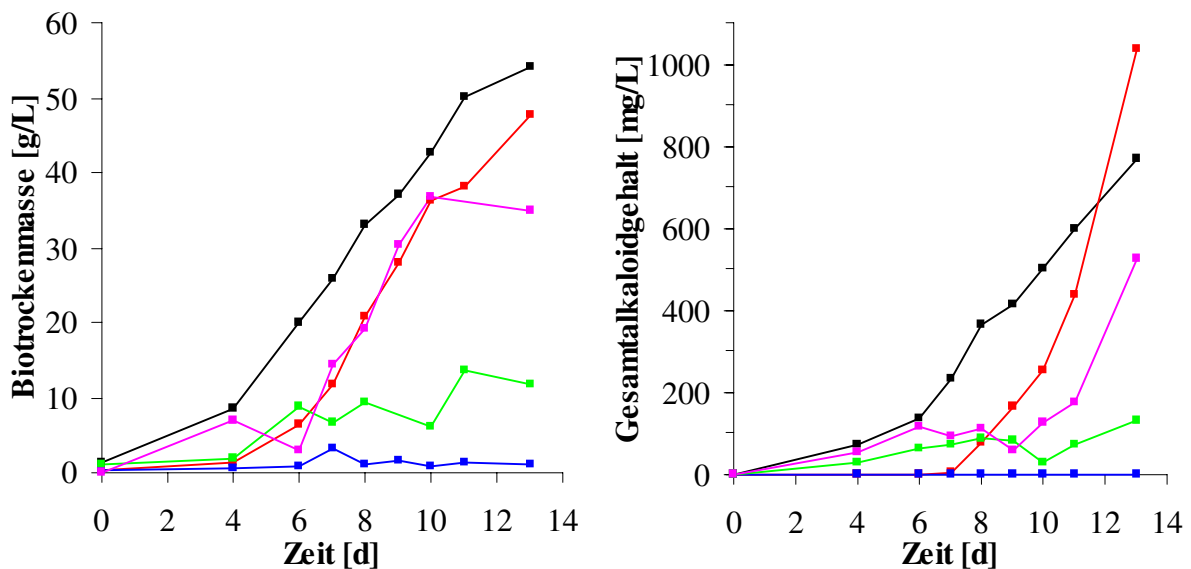
Als weitere Möglichkeit, die Sauerstoffzufuhr im Kultivierungsmedium zu erhöhen, bietet sich der Einsatz von organischen Lösemitteln an, deren Sauerstofflöslichkeit höher ist als die von Wasser bzw. Medium (s. Kapitel 2.4.1) [MATTIASSON UND ADLERCREUTZ, 1987]. Die Grundidee ist daher, durch Zugabe verschiedener organischer Lösemittel zum Kultivierungsmedium einen höheren Sauerstoffeintrag in das Medium zu erhalten. Demzufolge werden zum einen Kohlenwasserstoffe und zum anderen perfluorierte Kohlenwasserstoffe auf ihren Einfluß auf *Claviceps purpurea* und deren Produktbildung untersucht.

### 4.5.1 Einsatz verschiedener Kohlenwasserstoffe in Schüttelkolbenkultivierungen

Die in der Literatur beschriebenen Einsätze verschiedener Kohlenwasserstoffe in Kultivierungen unterschiedlicher Mikroorganismen führte in vielen Fällen zu einer Erhöhung der Sauerstofftransferrate. Bei Kultivierungen z.B. von *Aerobacter aerogenes* Zellen führte die durch Zugabe von Kohlenwasserstoffen erhöhte Sauerstofftransferrate zu höherem Zellwachstum und höherer Produktivität [ROLS UND GOMA, 1989]. Die Zugabe von 20 % (v/v) n-Oktan zu verschiedenen, Clavinalkaloide produzierenden *Claviceps* Stämmen ergab in einigen Fällen einen positiven Einfluß auf die Produktbildung. So konnten teilweise höhere spezifische Produktausbeuten ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Alkaloide /  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Biotrockenmasse) erzielt werden [GIL'MANOV ET AL., 1996].

In dieser Arbeit werden daher 4 verschiedene Kohlenwasserstoffe (Hexan, Nonan, Dekan, Toluol) in Konzentrationen von 16,7 % (v/v) hinsichtlich ihrer Wirkung auf *Claviceps purpurea* untersucht. Dabei werden die Lösemittel jeweils nur zu Beginn des Versuches dem Medium zugefügt. Die Verläufe der Biotrockenmassen bzw. der Gesamtalkaloidgehalte der verschiedenen Ansätze sind in Abbildung 4-9 zu sehen. Sowohl Toluol als auch Nonan zeigen einen toxischen bzw. stark inhibierenden Einfluß auf das Wachstum des eingesetzten *Claviceps* Stamms. Folglich ist im Ansatz mit Toluol kein Alkaloidgehalt detektierbar, im Kolben mit Nonan-Zusatz ist die Alkaloidkonzentration mit 132 mg/L äußerst gering. Die Verläufe der Biotrockenmassen bei Zusatz von Hexan und Dekan weisen eine längere Adaptionsphase

auf als die Referenz. Im Gegensatz zur Referenz, die sich am 4. Tag bereits am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase befindet, fängt diese bei den beiden Kulturen mit Lösemittelzusatz erst ab dem 6./7. Tag an. Dabei erreichen am Ende der Kultivierung die Ansätze sowohl mit Hexan (47,9 g/L) als auch mit Dekan (34,9 g/L) nicht den Biotrockenmassegehalt der Referenz (54,3 g/L). In diesen beiden Kulturen ist ebenfalls ein verzögerter Anstieg der Alkaloidkonzentration erkennbar. Während im Referenzkolben bereits nach 4 Tagen Alkaloide nachzuweisen sind, ist im Hexanansatz erst ab dem 7. Tag ein nachweisbarer Alkaloidgehalt vorhanden. Im Kolben mit Zusatz von Dekan liegt der Alkaloidgehalt zwischen dem 4. bis 10. Tag auf niedrigem Niveau, bevor er ab dem 11. Tag stark zunimmt. Am letzten Kultivierungstag beträgt der Gesamtalkaloidgehalt im Referenzkolben 767 mg/L, wohingegen im Kolben mit Dekan nur 528 mg/L Alkaloide vorliegen. Der Ansatz mit Hexan zeigt am letzten Tag zwar einen deutlich über der Referenz liegenden Wert auf, der jedoch als Ausreißer bedingt durch eine fehlerhafte Analytik angesehen werden muß.



**Abbildung 4-9.**

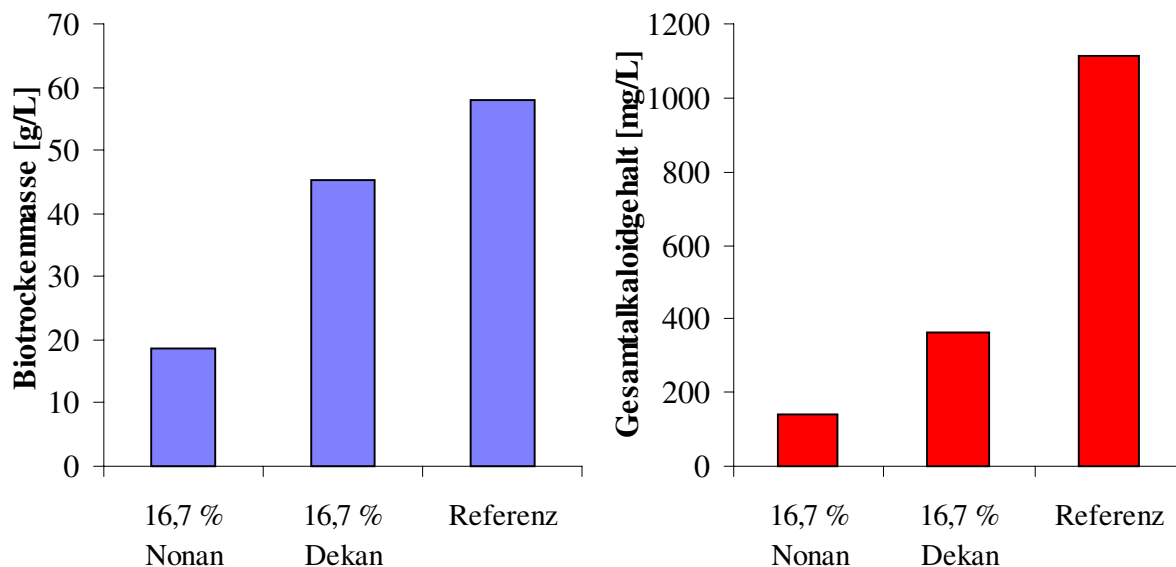
Verläufe der Biotrockenmassen und Gesamtalkaloidgehalte bei *Claviceps* Kultivierungen im Schüttelkolben unter Zusatz von 16,7 % (v/v) eines organischen Lösemittels.

—■— Referenz, —■— Hexan, —■— Toluol, —■— Nonan, —■— Dekan.

Als Ursache des verspäteten Wachstums und der damit verbundenen verzögerten Alkaloidproduktion läßt sich die Tatsache anführen, daß die Lösemittel nach einigen Tagen zum großen Teil verdampft sind und somit keinen Einfluß auf den Mikroorganismus mehr ausüben können. Da jedoch zur Erhöhung des Sauerstoffeintrags in das Medium das Vorhandensein der organischen Phase notwendig ist, werden in einer zweiten Versuchsreihe zu den einzelnen Kolben täglich 1 mL des jeweiligen Lösemittels (Hexan, Nonan, Dekan) zusätzlich zugegeben, um die Lösemittelkonzentration konstant zu halten.

Dabei zeigt sich, daß im Kolben mit Hexan-Zugabe kein Zellwachstum und somit auch keine Alkaloidproduktion zu beobachten sind (Daten nicht gezeigt). In den Schüttelkolben mit Nonan und Dekan sind nach zwölf Kultivierungstagen im Gegensatz zur Referenzkultur deut-

lich geringere Biotrockenmassen und Alkaloidkonzentrationen vorhanden (siehe Abbildung 4-10).



**Abbildung 4-10.**

Biotrockenmassen und Gesamtalkaloidgehalte am 12. Kultivierungstag bei Kultivierungen mit täglicher Löse-mittelzugabe.

Der Ansatz mit Nonan weist lediglich 32 % der Biotrockenmasse und 13 % der Alkaloidkonzentration im Vergleich zur Referenzkultur auf. Auch bei Zusatz von Dekan werden nur 78 % der Biotrockenmasse und 32 % des Gesamtalkaloidgehaltes erhalten.

Die von GIL'MANOV ET AL. [1996] ermittelten Steigerungen in der Produktausbeute bei *Claviceps*-Stämmen bei Zugabe von n-Oktan sind in diesen Versuchsreihen mit keinem Löse-mittel erzielt worden.

Aufgrund der geringen Ausbeuten und teilweise inhibitorischen Effekte auf das Zellwachstum eignen sich die hier getesteten Lösemittel nicht für einen Einsatz in Kultivierungen von *Claviceps purpurea* im Bioreaktor.

#### 4.5.2 Einsatz von perfluorierten Kohlenwasserstoffen in Schüttelkulturen

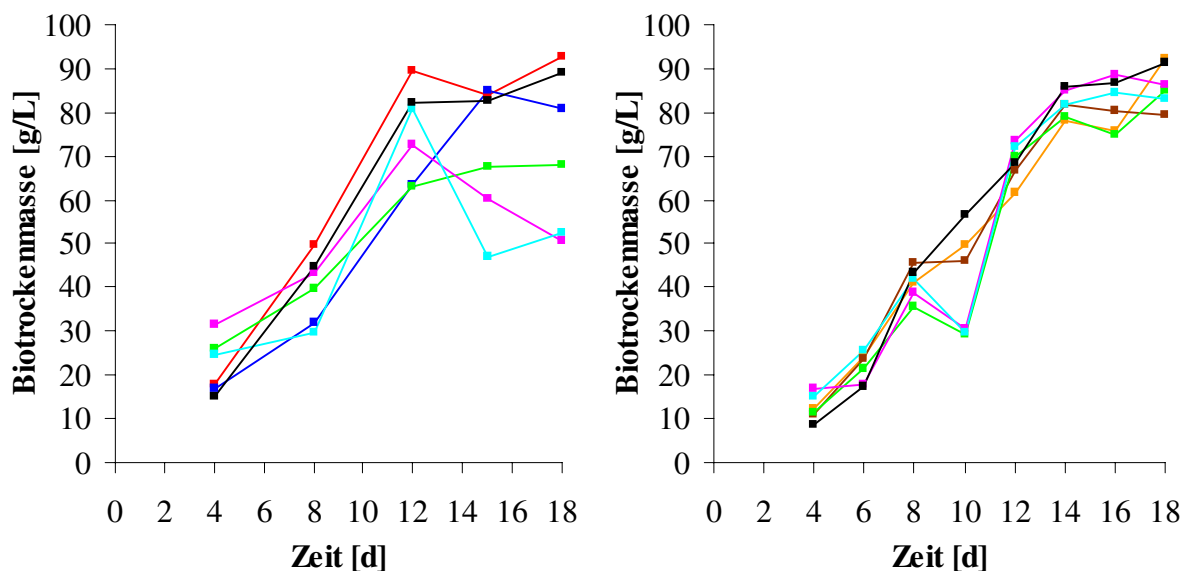
Perfluorierte Kohlenwasserstoffe (PFC) zeichnen sich durch eine noch höhere Sauerstofflöslichkeit als aliphatische Kohlenwasserstoffe aus. Des weiteren besitzen sie den Vorteil, daß sie chemisch und biologisch inert sind, so daß sie nicht als zusätzliche Kohlenstoffquelle dienen. Im Gegensatz zu den aliphatischen Kohlenwasserstoffen besitzen sie in der Regel einen hohen Dampf- und Siedepunkt, weshalb sie sich zum einen nicht verflüchtigen und zum anderen autoklavierbar und dadurch leichter zu handhaben sind. Aus diesen Gründen wurden perfluorierte Kohlenwasserstoffe in Fermentationen von verschiedenen Mikroorganismen eingesetzt, wobei in vielen Fällen positive Resultate erzielt wurden (siehe Kapitel 2.4.1).

Die Kultivierung von *Claviceps purpurea* in einem 2-Phasen-System mit Zusatz von PFC ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Den einzigen Ansatzpunkt liefert die Untersuchung

von MERKEL [1996], der einen *Claviceps* Stamm in einer abgasfreien Fermentationsanlage einsetzte. Dabei wurde ein perfluorierter Kohlenwasserstoff sauerstoffgesättigt von oben auf das Kultivierungsmedium getropft, im unteren Bereich des Kessels gesammelt und dem Medium entzogen. Allerdings waren die Kultivierungen in diesem System nicht erfolgreich, da nur hyphenartige Zellstrukturen erhalten wurden und die Produktausbeute äußerst gering war.

In dieser Arbeit werden daher zunächst in Schüttelkulturen verschiedene Konzentrationen des perfluorierten Kohlenwasserstoffs Hostinert 216 im 2-Phasen-System Medium/PFC eingestellt und der Einfluß auf die Mikroorganismen und die Produktausbeute untersucht. Dabei werden zunächst zwei Versuchsreihen durchgeführt, in denen das Volumen des Mediums wie in den anderen Kultivierungen 80 mL beträgt. Durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen Hostinert 216 werden Konzentrationen von 0-50 % (v/v) eingestellt, wobei sich die Gesamtvolumina in den Kolben unterscheiden. In der dritten Versuchsreihe mit Hostinert Konzentrationen zwischen 10-80 % (v/v) wird das Gesamtvolumen in allen Kolben auf 200 mL gesetzt, so daß in diesen Ansätzen unterschiedliche Mediumvolumina vorliegen.

Die erhaltenen Biotrockenmassen der ersten und zweiten Versuchsreihe sind in Abbildung 4-11 zu sehen. Beide Referenzkulturen erreichen nach 18 Tagen Biotrockenmassen von 89 bzw. 91 g/L. Während in der ersten Versuchsreihe die Biotrockenmassen in den Kolben mit Hostinert Konzentrationen über 23 % (v/v) deutlich geringere Werte aufweisen, sind in der zweiten Reihe keine wesentlichen Unterschiede zur Referenz erkennbar.



**Abbildung 4-11.**

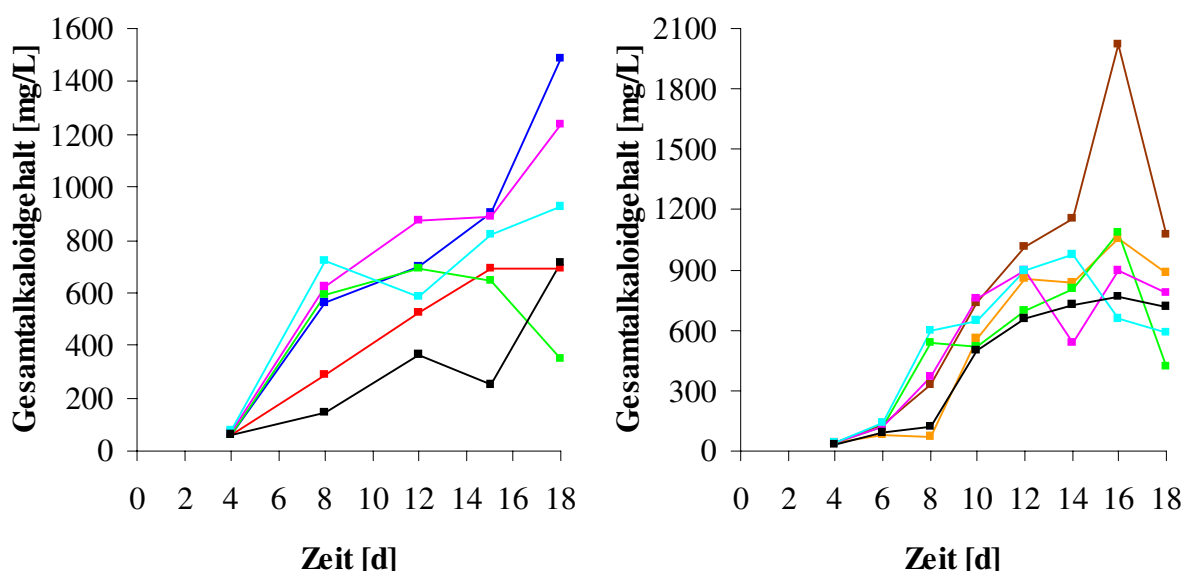
Kultivierungen im 2-Phasen-System mit Zusatz unterschiedlicher Hostinert 216 Konzentrationen. Darstellung der Biotrockenmassen der ersten (links) und der zweiten (rechts) Versuchsreihe. —■— Referenz, —■— 9 % (v/v), —■— 17 % (v/v), —■— 23 % (v/v), —■— 29 % (v/v), —■— 38 % (v/v), —■— 44 % (v/v), —■— 50 % (v/v) PFC.

Die auftretenden Unterschiede sind bedingt durch die Probenahme bzw. durch die Bestimmungsmethode. Bei der Probenahme mit Pipetten ist es nicht immer möglich, die genaue

Zellkonzentration zu ermitteln, da die Zellen teilweise pelletieren und dadurch Schwankungen im Zellmassegehalt auftreten können. Des Weiteren können durch die Membranfiltration Mediumsbestandteile an dem Filterkuchen hängen bleiben und das Ergebnis verfälschen. Daher weist diese Bestimmungsmethode einen höheren Fehler auf.

Um einen inhibierenden Effekt des Hostinerts auf die Zellen auszuschließen, werden die hier nicht dargestellten, extrazellulären Proteinkonzentrationen miteinander verglichen. Dabei werden in beiden Versuchsreihen in den Referenzkolben jeweils 5,0 g/L detektiert. Die Proteinkonzentrationen in den PFC-haltigen Kulturen liegen im Bereich zwischen 5-6 g/L, wobei keine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten ist. Eine Hemmung des Wachstums oder des Stoffwechsels durch Hostinert ist demnach nicht zu erkennen.

Die für die Beurteilung der Produktivität wesentliche Größe, der Gesamtalkaloidgehalt, ist für beide Versuchsreihen in Abbildung 4-12 gezeigt.



**Abbildung 4-12.**

Kultivierungen im 2-Phasen-System mit Zusatz unterschiedlicher Hostinert 216 Konzentrationen. Darstellung der Alkaloidgehalte der ersten (links) und der zweiten (rechts) Versuchsreihe. —■— Referenz, —■— 9 % (v/v), —■— 17 % (v/v), —■— 23 % (v/v), —■— 29 % (v/v), —■— 38 % (v/v), —■— 44 % (v/v), —■— 50 % (v/v) PFC.

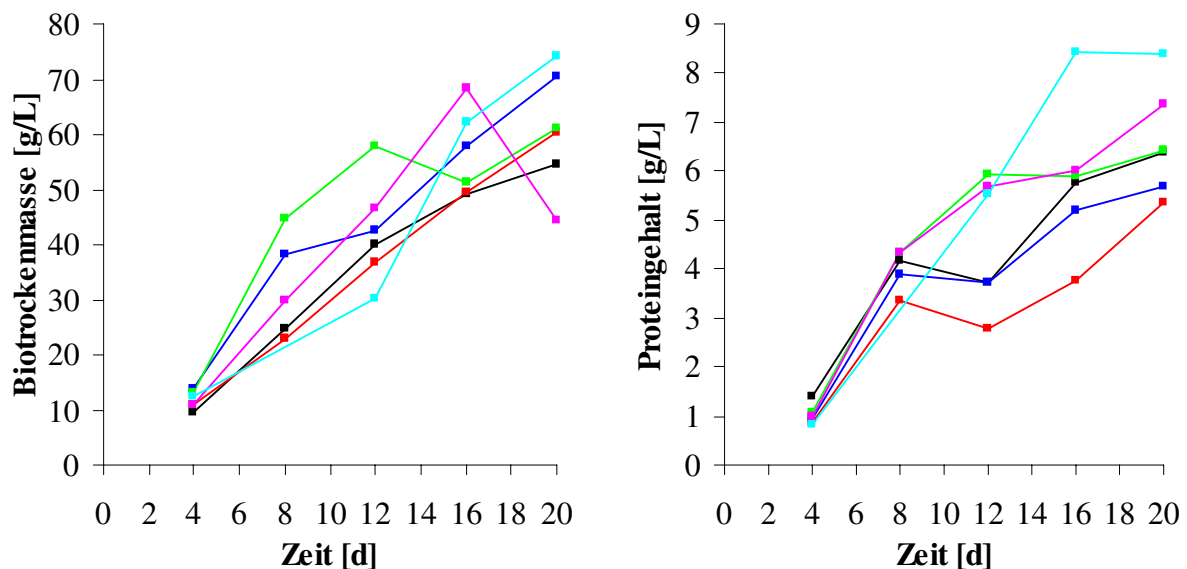
In beiden Versuchsreihen werden nach 18 Kultivierungstagen in den Referenzkolben 709 bzw. 717 mg/L Ergotalkaloide ermittelt. Für alle Ansätze mit Hostinert-Zusatz werden zum Teil deutlich höhere Alkaloidkonzentrationen nachgewiesen. Während in der ersten Versuchsreihe keine Konzentrationsabhängigkeit der Produktion erkennbar ist, liegen in der zweiten Versuchsreihe am 16. Kultivierungstag in den Kolben mit 17, 29 und 38 % (v/v) die höchsten Alkaloidkonzentrationen (> 1000 mg/L) vor. Dabei ist der Wert im Kolben mit 29 % (v/v) PFC ungewöhnlich hoch, so daß dort ein Meßfehler zu vermuten ist. Dennoch ist die Alkaloidkonzentration in diesem Kolben am 14. und 18. Kultivierungstag am höchsten, so daß der Wert des 16. Tages zwar in seiner absoluten Konzentration angezweifelt werden kann, die Tendenz jedoch eindeutig belegbar ist. Auch bei Zusatz von 44 % PFC ist mit 896 mg/L noch

eine um 17 % höhere Alkaloidkonzentration im Medium vorhanden, allerdings ist dieser Wert schon deutlich geringer als in den Kolben mit geringerer PFC-Menge. Im Kolben mit 50 % (v/v) Hostinert ist eine um 15 % geringere Produktmenge im Vergleich zur Referenz vorhanden. Durch die kürzere Probenfolge der zweiten Versuchsreihe ist dort zu erkennen, daß sowohl in der Referenz als auch in den meisten anderen Kulturen die maximale Alkaloidkonzentration am 16. Kultivierungstag vorliegt. Die Ausnahme bildet die Kultur mit 50 % (v/v) Hostinert, in der bereits nach 14 Tagen die höchste Produktkonzentration vorhanden ist.

In diesen beiden Kultivierungsreihen läßt sich eine deutliche Steigerung der Alkaloidproduktion durch Zugabe von Hostinert 216 erkennen. Da die Versuchsergebnisse in beiden Reihen jedoch bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit unterschiedlich sind, werden in einer weiteren Untersuchung Hostinert Konzentrationen zwischen 10-80 % (v/v) eingesetzt. Außerdem wird hierbei in allen Kolben das gleiche Gesamtvolumen (200 mL) eingestellt.

Im Verlaufe der Kultivierungen ist zu beobachten, daß bei Hostinert-Konzentrationen zwischen 60-80 % (v/v) die Mycelien größere Pellets bilden, die teilweise so schwer sind, daß sie sich am Boden absetzen. Gleichzeitig ist mit höherem Hostinert-Anteil eine stärkere Verfärbung des Mediums von gelb nach braun zu erkennen.

Um eine bessere Übersicht zu erhalten, sind in Abbildung 4-13 die Verläufe von Biotrockenmasse und des Proteingehaltes nur für einige ausgewählte Kulturen gezeigt.



**Abbildung 4-13.**

Kultivierungen mit Zusatz von Hostinert 216 im Konzentrationsbereich 10-80 % (v/v) bei gleichem Kolbenvolumen. Darstellung der Biotrockenmassen (links) und Proteinkonzentrationen (rechts).

—■— Referenz, —■— 10 % (v/v), —■— 30 % (v/v), —■— 60 % (v/v), —■— 70 % (v/v), —■— 80 % (v/v) Hostinert.

Auffallend ist die längere Kultivierungszeit von 20 Tagen in dieser Versuchsreihe. Die Referenzkultur weist zu diesem Zeitpunkt mit 55 g/L eine um 39 % geringere Biotrockenmasse

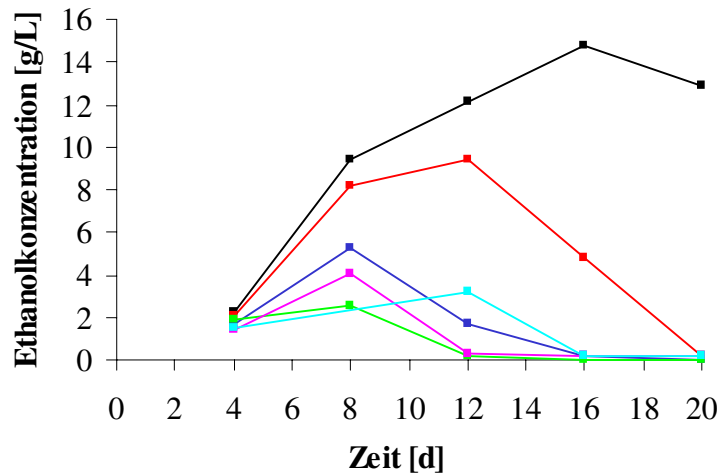


auf im Vergleich zu den beiden Referenzkulturen der ersten beiden Versuchsreihen (18. Tag). Zusätzlich ist ein Anstieg des extrazellulären Proteingehaltes festzustellen. Als Ursache für die geringere Zellmasse kann das größere Mediumvolumen herangezogen werden. Bei einem Volumen von 80 mL (wie in den ersten beiden Untersuchungen) ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sehr groß, wodurch der Sauerstofftransport bzw. Sauerstoffübergang in das Kulturmedium erhöht wird. Dieses Volumen hat sich in den verwendeten Erlenmeyerkolben als optimal erwiesen. Durch die Erhöhung des Volumens auf 200 mL wird das Verhältnis zu einem ungünstigeren Wert verschoben, so daß keine optimale Sauerstoffversorgung des Mediums mehr vorliegt. Zusätzlich wächst in einem größeren Flüssigkeitsvolumen absolut betrachtet eine größere Anzahl an Organismen, so daß höherer Sauerstoffbedarf besteht, der Sauerstoffeintrag jedoch geringer wird. Als Folge der nicht optimalen Sauerstoffversorgung ergibt sich ein geringeres Wachstum der Organismen.

Ein mit der Referenz vergleichbarer Verlauf der Biotrockenmasse ist bei Zusatz von 10 % (v/v) Hostinert festzustellen. Hier scheint die Menge an zugesetztem Hostinert für eine genügende Sauerstoffversorgung nicht ausreichend zu sein. Die Kulturen mit höherem Hostinert-Anteil besitzen jedoch höhere Zellmassen, wobei - wie bereits in der ersten Versuchsreihe beobachtet - keine Abhängigkeit von der zugesetzten Hostinert-Menge erkennbar ist. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit bei den Konzentrationen extrazellulärer Proteine. Dort weisen die Kulturen mit 10 bzw. 30 % (v/v) Hostinert deutlich geringere Proteingehalte auf als die Referenz. Hostinert-Konzentrationen von 60, 70 und 80 % (v/v) hingegen bewirken einen höheren Proteingehalt im Medium, wobei die Kultur mit 80 % (v/v) den höchsten Wert (8,4 g/L) erreicht.

Die Vermutungen über eine schlechte Sauerstoffversorgung des Pilzes in der Referenzkultur werden durch die Ethanolgehalte bestätigt, die für jede Kultur in Abbildung 4-14 gezeigt sind. Die Verläufe der Ethanolkonzentrationen verdeutlichen den sehr hohen Sauerstoffbedarf von *Claviceps purpurea* vor allem zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase. Liegen vor Beginn der exponentiellen Wachstumsphase die Ethanolgehalte in allen Kolben auf gleichem Niveau, so steigt der Gehalt in der Kultur ohne Hostinert stark und kontinuierlich bis zum 16. Kultivierungstag auf 14,8 g/L an. Dieses zeigt, daß während der gesamten Wachstumsphase eine schlechte Sauerstoffversorgung und damit Sauerstofflimitierung im Medium vorliegen muß. Der Ethanolgehalt nimmt bei 10 % (v/v) Hostinert-Zugabe ebenfalls stark zu, erreicht jedoch am 12. Tag mit 9,5 g/L seinen Maximalwert, bevor er wieder abfällt. Dies verdeutlicht die immer noch unzureichende Sauerstoffversorgung in diesem System, wie auch der Verlauf der Biomasse zeigt. Bei Zusatz von 20 % (v/v) Hostinert ist der Ethanolgehalt am 8. Tag mit 7,25 g/L (Daten nicht gezeigt) ebenfalls sehr hoch, während bei 30 % (v/v) PFC das Maximum bei 5,3 g/L liegt. Deutlich geringere Ethanolmengen sind in den anderen Kulturen zu erkennen, die (bis auf eine Ausnahme) ihren Maximalwert am 8. Tag erreichen und dann wie-

der auf 0 g/L fallen. Dabei treten im Bereich 40-50 % (v/v) Hostinert ähnliche Ethanolgehalte auf.



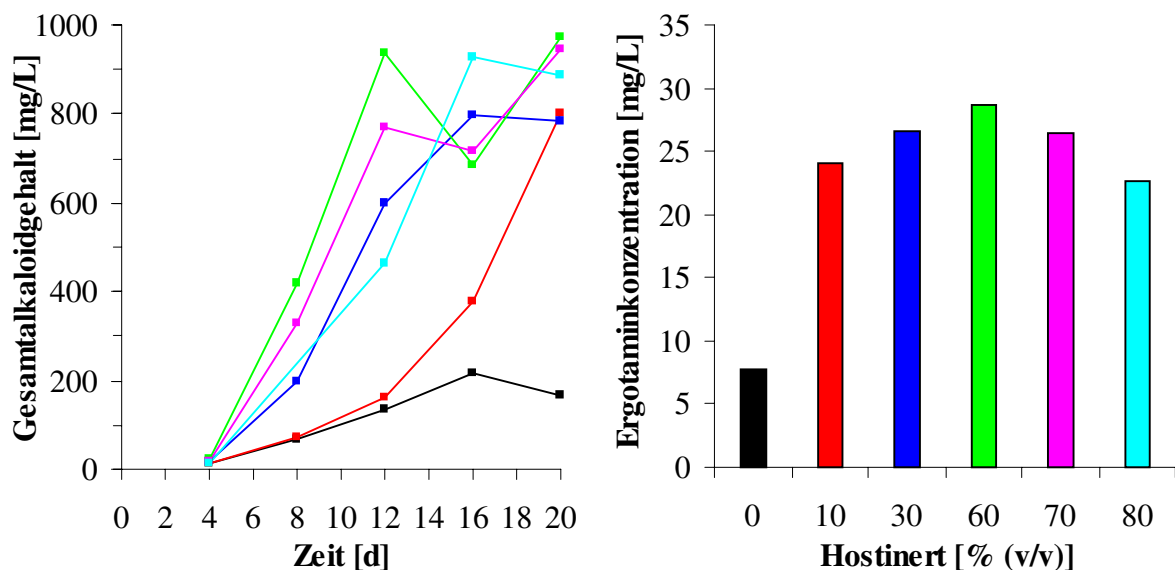
**Abbildung 4-14.**

Ethanolkonzentrationen bei Kultivierungen mit Hostinert-Zugabe von 10-80 % (v/v). In allen Kolben liegen die gleichen Flüssigkeitsvolumina (200 mL) vor.

—■— Referenz, —■— 10 % (v/v), —■— 30 % (v/v), —■— 60 % (v/v), —■— 70 % (v/v), —■— 80 % (v/v) Hostinert.

Bei der Betrachtung der produzierten Alkaloidmengen (siehe Abbildung 4-15) wird der positive Effekt des Hostinerts bestätigt. Wie sich schon bei der Biotrockenmasse gezeigt hat, ist auch die Alkaloidproduktion der Referenz geringer als in den Kolben mit PFC. Weiterhin ist sie deutlich niedriger als in den Referenzkulturen der ersten Versuchsreihen.

Hier wird noch einmal der Einfluß des Sauerstoffeintrags deutlich. Bedingt durch den geringeren Sauerstoffeintrag ist die Alkaloidkonzentration mit 218 mg/L um 70 % vermindert im Vergleich zu den Kultivierungen mit 80 mL Flüssigkeitsvolumen.



**Abbildung 4-15.**

Links: Gesamtalkaloidgehalt bei Kultivierungen mit Hostinert-Zugabe von 10-80 % (v/v). In allen Kolben liegen die gleichen Flüssigkeitsvolumina (200 mL) vor.

—■— Referenz, —■— 10 % (v/v), —■— 30 % (v/v), —■— 60 % (v/v), —■— 70 % (v/v), —■— 80 % (v/v) Hostinert. Rechts: Ergotaminkonzentration in Abhängigkeit von der zugesetzten Hostinert-Menge nach 20 Tagen.

Bis zum 12. Kultivierungstag ist kein Unterschied in der Alkaloidkonzentration zwischen dem Referenzkolben und dem Kolben mit 10 % (v/v) Hostinert zu erkennen, während zu diesem Zeitpunkt der Alkaloidgehalt in den anderen Kulturen um das 3,5- bis 7-fache gestiegen ist.

Im Gegensatz zur Kultur ohne Hostinert steigt der Alkaloidgehalt bei 10 % (v/v) PFC bis zum 20. Kultivierungstag sehr stark an und erreicht eine vergleichbar hohe Konzentration wie die Kultur mit 30 % (v/v) PFC. Die hier nicht gezeigte Zugabe von 20 % (v/v) Hostinert führt bis zum 8. Tag ebenfalls zu Alkaloidwerten, die der Referenz entsprechen. Danach folgt ein starker Anstieg, so daß am Ende der Kultivierung die Alkaloidkonzentration bei 835 mg/L liegt.

Die ermittelten Konzentrationen des Hauptprodukts Ergotamin (Abbildung 4-15 rechts) nach 20 Tagen Kultivierungszeit verdeutlichen ebenfalls die drastische Steigerung der Produktausbeute bei Zusatz von Hostinert. Die hier nicht dargestellte Zugabe von 50 % (v/v) Hostinert zeigte dabei die maximale Ergotaminkonzentration.

Aus den erhaltenen Daten läßt sich nur eine ungefähre Aussage über eine optimale PFC-Konzentration im Medium treffen. Der Zusatz von Hostinert im Konzentrationsbereich zwischen 10-30 % liefert Alkaloidkonzentrationen von 785-835 mg/L, während bei PFC-Konzentrationen von 40-80 % Alkaloidmengen im Bereich zwischen 890-1245 mg/L produziert werden. Die Produktivitäten (mg Alkaloide/g Biotrockenmasse) zeigen ähnliche Verläufe wie die der Gesamtalkaloidgehalte.

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen stellten ELIBOL UND MAVITUNA [1995] bei Kultivierungen von *Streptomyces coelicolor* unter Zusatz von Perfluorodecalin einen gleichmäßigen, starken Anstieg sowohl der Biomasse als auch der Antibiotikaproduktion mit zunehmender PFC-Konzentration bis 50 % (v/v) fest. Bei höheren PFC-Konzentrationen war hingegen ein starker Abfall der Biomasse und der Antibiotikakonzentration im Medium zu beobachten, deren Ursache der Autoren nach in der Umkehrung der PFC-in-Wasser Emulsion zu einer Wasser-in-PFC Emulsion liegen könnte. Diese konzentrationsabhängigen Effekte sind in den in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen mit *Claviceps purpurea* nicht zu erkennen. Es hat sich lediglich gezeigt, daß in den Schüttelkolbensystemen mit 10-20 % (v/v) Hostinert keine ausreichende Sauerstoffversorgung vorliegt, welches sich zum einen in der mit der Referenz übereinstimmenden Biomassekonzentration und zum anderen in dem hohen Ethanolgehalt ausdrückt.

Vor allem die dritte Kultivierungsreihe hat gezeigt, daß in Systemen mit geringerer Sauerstoffzufuhr der Einsatz von Hostinert zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung und damit zu höheren Biomassen und Alkaloidkonzentrationen führt. Demnach ist eine Übertragung dieses Systems auf Kultivierungen im Bioreaktor äußerst vielversprechend. Dabei sollte jedoch beachtet werden, daß Hostinert-Konzentrationen eingesetzt werden, die ökonomisch sinnvoll sind. Die Ergebnisse des Schüttelkolbenversuchs zeigen, daß schon Konzentrationen ab 20 % (v/v) zu einer Erhöhung der Produktivität führen können. Da im Bioreaktor voll-

kommen andere Bedingungen herrschen als in Schüttelkolben, können die hier ermittelten Daten nur einen Hinweis auf sinnvolle Konzentrationen geben. ROLS ET AL. [1990] fanden heraus, daß die Hauptwiderstände des Sauerstofftransports im 2-Phasen-System PFC/Wasser in den Phasengrenzflächen Gas-Wasser bzw. PFC-Wasser liegen. Die genauen Mechanismen bei Kultivierungen im 2-Phasen-System sind zwar noch nicht vollständig geklärt, jedoch hat die Phasengrenzfläche PFC-Wasser und damit die Oberfläche bzw. Blasengröße der PFC-Phase einen Einfluß auf den Sauerstofftransport. Durch mechanische Agitation kann die schwerere organische Phase im Bioreaktor stärker emulgiert werden, was möglicherweise auch bei geringen PFC-Konzentrationen zu einem besseren Gaseintrag führt. Daher sollte zunächst die Zugabe geringer Hostinert-Mengen im Bioreaktor getestet werden.

#### 4.5.2.1 Untersuchungen zum Einfluß von Hostinert 216 auf die Ergotalkaloide

Ähnlich wie bei den Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid muß der Einfluß von Hostinert auf die Ergotalkaloide bzw. deren Löslichkeit in dem organischen Lösemittel untersucht werden. Dazu werden in 3 Kolben das 2-Phasen-System Medium/Hostinert, das einen PFC-Anteil von 20 % (v/v) besitzt, sowie eine definierte Konzentration Ergotamin gegeben. Nach 24 h Inkubation werden in den drei Ansätzen die Gesamtalkaloidkonzentrationen bestimmt.

**Tabelle 4-3.**

Daten zur Ermittlung des Einflusses von Hostinert 216 auf die Ergotalkaloide.

Konzentration 1	35,2 mg/L
Konzentration 2	33,3 mg/L
Konzentration 3	35,5 mg/L
MW	34,7 mg/L
SD	1,23
RSD	3,55
Sollwert	34,9 mg/L

Aus Tabelle 4-3 ist zu erkennen, daß in allen drei Kolben nach 24 Stunden die Ausgangskonzentration von Ergotamin vorhanden ist. Die Unterschiede zum Sollwert sind sehr gering und durch den Fehler der Bestimmungsmethode bedingt. Dies entspricht den Angaben des Herstellers, wonach der perfluorierte Kohlenwasserstoff nahezu vollständig chemisch inert ist und sich nur wenige organische Stoffe in ihm lösen. Daher kann ein Einfluß des Hostinerts auf die Produkte während einer Kultivierung ausgeschlossen werden.

## 4.6 Kultivierungen im 2L-Bioreaktor Biostat B

### 4.6.1 Kultivierungen mit unterschiedlichen Rührertypen

Da bisher am Institut keine Erfahrungen im Umgang mit *Claviceps purpurea* vorhanden sind, muß zunächst ein Kultivierungssystem etabliert werden, das als Vergleichssystem für weitere Kultivierungen mit alternativer Sauerstoffversorgung dient.

Die für die Kultivierung mit *Claviceps purpurea* am häufigsten verwendeten Systeme sind neben der Blasensäule der Rührkesselreaktor. MERKEL [1996] zeigte bei einem Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme, daß für den von ihm verwendeten *Claviceps* Stamm die höchste Produktivität im Rührkesselreaktor erzielt wird.

In dieser Arbeit wird ein 2L-Rührkesselreaktor aus Edelstahl verwendet (siehe Kapitel 3.3). In den ersten beiden Kultivierungen wird der Einfluß des gewählten Rührertyps auf den Kultivierungsverlauf untersucht. Dabei wird auf den Einsatz von Antischaummitteln zunächst verzichtet. Getestet werden zum einen der in Bakterienkultivierungen häufig verwendete Scheibenrührer (Kultivierung F1) und zum anderen ein Paddelrührer (F2), der vor allem Anwendung bei Kultivierungen von scherstreßempfindlichen Zellen wie den Tierzellen findet.

Die Anfangsbedingungen für die Begasung und die Rührerdrehzahl sind in beiden Kultivierungen gleich. Sie werden je nach Kultivierungsverlauf individuell erhöht, wobei als Kriterium der Gelöstsauerstoff im Medium dient. Dabei werden sowohl die Begasungsrate als auch die Rührergeschwindigkeit abwechselnd schrittweise erhöht, so daß der Gelöstsauerstoff zwischen 20-30 % gehalten wird. Ein Abfallen unter 20 % sollte dabei vermieden werden, da dies zur Sauerstofflimitierung führen kann (siehe Kapitel 2.4). Als kurze Übersicht sind in Tabelle 4-4 die Werte für das während der Kultivierungen erreichte  $pO_2$ -Minimum, die maximale Begasungsrate sowie die höchste Rührerdrehzahl aufgeführt. Die Verläufe dieser Parameter sind ebenso wie die der Abgasdaten im Anhang dargestellt.

**Tabelle 4-4.**

Vergleich einiger prozeßrelevanter Parameter der Kultivierungen F1 und F2.

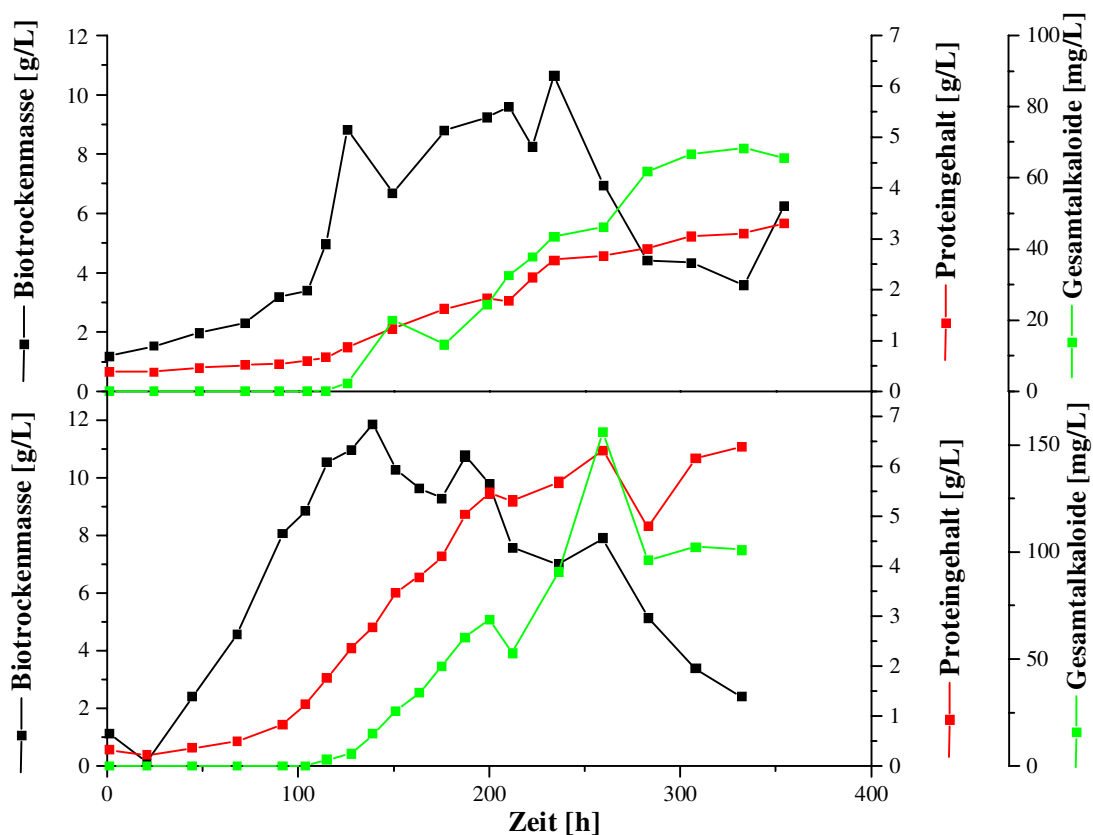
Parameter	F1	F2
Max. Begasungsrate [vvm]	2-2,25	2,5
Max. Rührerdrehzahl [rpm]	350	350
Min. $pO_2$ -Gehalt [%]	30	20-25

In beiden Kultivierungen sind Rührergeschwindigkeiten bis maximal 350 rpm eingestellt worden. Obwohl in F2 eine höhere maximale Begasungsrate vorliegt, sinkt der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium stärker ab als bei F1. Das  $pO_2$ -Minimum liegt in F1 bei ca. 160 h Kultivierungsdauer während es bei F2 bereits nach 110-120 h erreicht ist. Dies deutet auf eine

erhöhte Sauerstoffaufnahme bei der Kultivierung unter Einsatz der Paddelrührer hin. Die in der Literatur [LOHMEYER UND SANDER, 1993] angegebenen Kultivierungsbedingungen von 5 vvm und 450 rpm im Rührkesselreaktor sind in den durchgeführten Kultivierungen nicht einzustellen, da eine Erhöhung einer dieser Parameter zu einer noch größeren Schaumentwicklung geführt hätte. Auf dieses Problem wird im folgenden noch näher eingegangen.

Die in Abbildung 4-16 vergleichend dargestellten Verläufe der Biotrockenmasse, der Protein- sowie der Alkaloidkonzentrationen der beiden Kultivierungen weisen ein höheres Wachstum sowie eine verstärkte Alkaloidproduktion bei F2 auf.

Sowohl die Proteinkonzentration (6,4 g/L) als auch die maximale Biomassekonzentration (11,9 g/L) zeigen bei F2 wesentlich höhere Werte auf als bei F1 (3,3 g/L Protein, 10,7 g/L Biotrockenmasse). Auffällig sind in beiden Kultivierungen die Verläufe der Biotrockenmasse, die zunächst in der exponentiellen Wachstumsphase ansteigen, ein Maximum durchlaufen und dann wieder stark abfallen. Als Grund dafür ist die schon angesprochene starke Schaumentwicklung zu nennen und weniger das Absterben der Zellen. Bedingt durch die ansteigende Begasung wird die Schaumentwicklung stärker und die Zellen werden durch Flotation aus dem Medium getragen. Sie wachsen oberhalb der Mediumsoberfläche an der Reaktorwand oder an der Rührerwelle weiter und sind für die Analytik nicht mehr zugänglich. Dadurch sind die Biomassekonzentrationen um das 6-8-fache geringer als in Schüttelkolben.



**Abbildung 4-16.**

Vergleich der Kultivierungsverläufe der Fermentationen im Bioreaktor mit Scheibenrührern (F1, oben) bzw. mit Paddelrührern (F2, unten).

Der entscheidende Parameter, die Gesamtalkaloidkonzentration, liegt bei F2 am Kultivierungsende mit 103 mg/L um 50 % über der von F1. Die Alkaloidproduktion setzt in beiden Fermentationen nach ungefähr 100 h ein. Der in F2 erzielte maximale Alkaloidgehalt von 103 mg/L ist um das 8-10-fache geringer als die Konzentrationen, die in Schüttelkolbenkultivierungen erzielt werden.

Die starke Schaumentwicklung führt nicht nur zu einem Zellwachstum außerhalb des Mediums an der Reaktorwand, sondern auch zu einer relativ festen Schaumschicht, in der sich Zellstücke befinden. Durch diese Schicht kann sich ein Überdruck im Reaktor aufbauen, was zum Abplatzen einzelner Versorgungsleitungen oder zum Austreten der Zellsuspension durch den Abgaskühler führen kann und somit ein weiteres Problem darstellt.

Der Vergleich der beiden Rührertypen ergibt sowohl für das Wachstum als auch für die Alkaloidproduktion höhere Konzentrationen durch den Einsatz des Paddelrührers. Demzufolge werden alle weiteren Fermentationen mit diesem Rührertyp durchgeführt.

Ein Vergleich mit den von LOHMEYER UND SANDER [1993] mit diesem *Claviceps* Stamm durchgeführten Fermentation im 2L-Rührkesselreaktor zeigt, daß die Autoren eine ähnliche Biomassekonzentration (12 g/L) dafür jedoch eine erhöhte Alkaloidproduktion (246 g/L) erzielten. Die in den Kultivierungen F1 und F2 gewonnenen Höchstwerte der Alkaloidkonzentrationen betragen nur 28 (F1) bzw. 42 % (F2) im Vergleich dazu und liegen daher weit hinter den zu erwartenden Ausbeuten zurück.

Aus diesem Grund ist als weitere Optimierung der Einsatz eines Antischaummittels zu untersuchen. Nur so läßt sich der auftretende Schaum vermindern, ein Austragen der Zellen verhindern und die Ausbeute steigern.

#### 4.6.2 Kultivierung unter Zusatz eines Antischaummittels

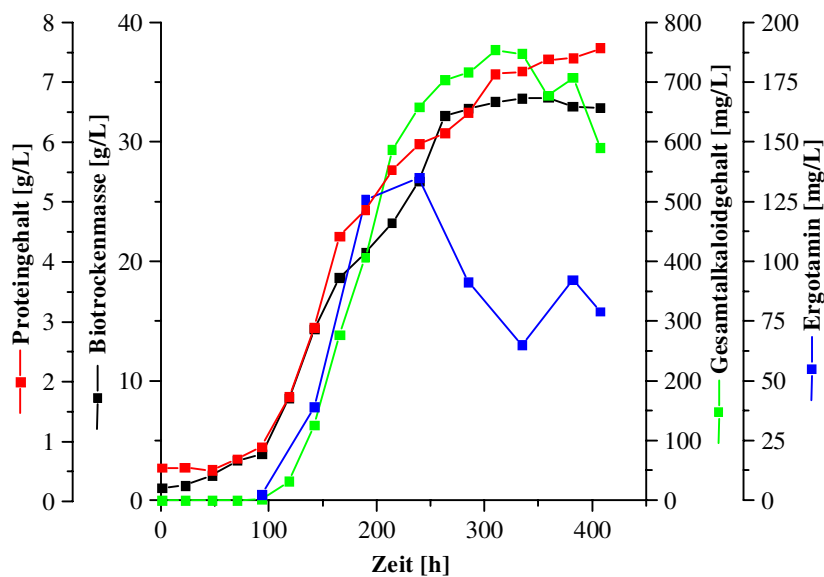
Das in den Voruntersuchungen im Schüttelkolben eingesetzte Antischaummittel Desmophen 3900 hat den geringsten Einfluß auf die Produktbildung gezeigt (s. Kapitel 4.2). Daher wird sein Einsatz bei Kultivierungen im Bioreaktor getestet, wobei zu Beginn eine Konzentration von 0,1 % (v/v) eingestellt wird. Da die Wirkung des Antischaummittels im Laufe der Kultivierung nachläßt, wird nach Bedarf die gleiche Menge erneut zugegeben.

Bei der ersten Kultivierung (R1) mit Desmophen-Zugabe sind die on-line Daten nicht aufgezeichnet worden (bedingt durch einen Computerfehler des Datenaufnahmesystems), so daß die Kultivierung ein zweites Mal durchgeführt (R2) wird. Das hat den Vorteil, daß die erhaltenen off-line Werte der unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Fermentationen R1 und R2 miteinander verglichen werden können, um so einen Eindruck über die Reproduzierbarkeit der Ausbeuten zu erhalten.

Diese beiden Kultivierungen sollen als Referenzkultivierungen für die nachfolgenden Fermentationen mit alternativen Systemen zur Sauerstoffversorgung dienen. Daher sollen hier

anhand von der Referenz 2 sämtliche Verläufe der off-line und on-line ermittelten Parameter exemplarisch dargestellt und ausführlich diskutiert werden. Bei allen folgenden Kultivierungen wird nicht mehr auf alle Kurvenverläufe der einzelnen Parameter eingegangen, sondern nur noch signifikante Änderungen aufgezeigt.

In der folgenden Graphik sind die off-line ermittelten Parameter Biomasse, Protein- sowie Gesamtalkaloidkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Dabei ist anhand der Biomasse der Anfang der exponentiellen Wachstumsphase nach ungefähr 100 h zu erkennen, die nach 280-300 h in die stationäre Phase übergeht. Bis zum Abbruch der Kultivierung nach 420 h bleibt die Biomasse konstant bei ca. 33 g/L. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Konzentration an extrazellulären Proteinen, die am Ende der Kultivierung bei 7,6 g/L liegt. Die Alkaloidproduktion setzt nach 100-110 h ein, durchläuft nach ungefähr 310 h ein Maximum (754 mg/L) und nimmt bis zum Ende der Fermentation wieder ab. Die Konzentration des Hauptproduktes Ergotamin nimmt mit dem Gesamtalkaloidgehalt gleichzeitig zu, erreicht bereits nach ca. 240 h einen Maximalwert von 135 mg/L, bevor sie bis zum Ende der Fermentation abnimmt.



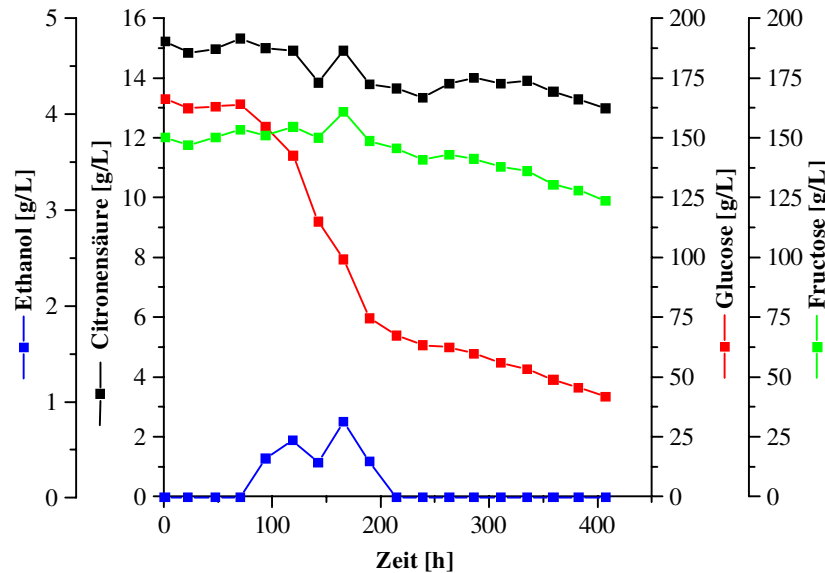
**Abbildung 4-17.**  
Off-line Daten der Referenzkultivierung R2.

Als Kohlenstoffquelle für *Claviceps purpurea* dient Saccharose, die von dem Pilz zunächst in Glucose und Fructose gespalten wird, wovon vorwiegend die freie Glucose weiter metabolisiert wird. Zur Bestimmung des Zuckergehaltes der Kultivierungsproben wird zunächst die Saccharose hydrolysiert und die Konzentrationen an Glucose und Fructose bestimmt, die in Abbildung 4-18 aufgetragen sind. Neben diesen Substanzen sind weiterhin die Verläufe von Citronensäure und Ethanol gezeigt.

Im Verlauf der Glucosekonzentration ist deutlich die Adaptionsphase bis zur 100. Stunde erkennbar. Die Abnahme der Glucose verläuft genau gegensätzlich zur Biomasse. Nach 410 h



sind 124 g/L Glucose und 26,4 g/L Fructose verstoffwechselt worden. Citronensäure wird gleichmäßig während der gesamten Kultivierungszeit verbraucht und weist am Ende noch einen relativ hohen Gehalt von 13,0 g/L (Anfangswert 15 g/L) auf.



**Abbildung 4-18.**

Ermittelte Konzentrationen an Citronensäure, Ethanol, Glucose und Fructose bei der Referenzkultivierung R2.

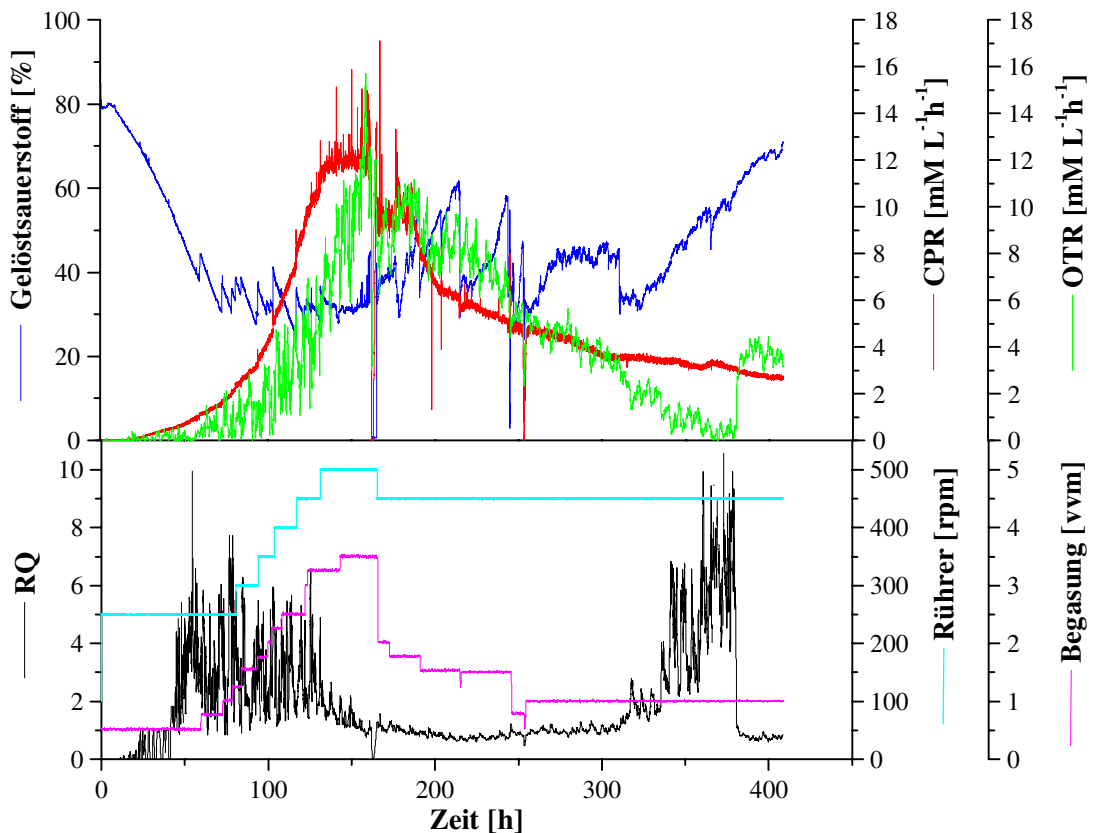
Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase ist ein Anstieg der Ethanolkonzentration zu erkennen, die nach ca. 120 h und nach 165 h zwei Maxima durchläuft. Dieser Verlauf ist durch einen Vergleich mit dem  $pO_2$ -Wert sowie mit den aus den Abgasdaten berechneten Werten für die Sauerstoffaufnahme OTR, die Kohlendioxidbildungsrate CPR und den Respirationskoeffizienten RQ erklärbar (s. Abb. 4-19).

Während der Adaptionsphase sinkt der  $pO_2$ -Wert kontinuierlich ab, so daß ab der 60. Stunde sowohl die Begasung als auch die Rührerdrehzahl in kleinen Schritten erhöht werden muß. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach 100 h) kann der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium durch ständige Steigerung der beiden Parameter bei 30 % gehalten werden. Sowohl der CPR- als auch der OTR-Wert steigen nach 80-100 h stark an. Der Respirationsquotient liegt zu diesem Zeitpunkt weit über 1,0, was auf anaerobe Bedingungen hinweist, obwohl der Gelöstsauerstoff nicht unter 30 % absinkt. Dementsprechend setzt zu diesem Zeitpunkt die Ethanolbildung ein.

Aufgrund eines hohen Überdrucks im Reaktor ist zwischen der 162.-165. Stunde der Begasungsschlauch abgesprungen, so daß die Sauerstoffzufuhr unterbrochen wird und der  $pO_2$ -Wert auf 0,5 % absinkt. Demzufolge fallen die OTR- und CPR-Werte deutlich, während die Ethanolproduktion bedingt durch den anaeroben Zustand wieder verstärkt einsetzt.

Nach 210 h ist kein Ethanol im Medium mehr nachweisbar und die Werte für CPR und OTR sinken beide gleichzeitig ab. Der Anstieg des OTR am Ende der Kultivierung ist durch eine fehlerhafte Analytik erklärbar. Im Gegensatz zum Kohlendioxidanalysator treten beim Sauer-

stoffmeßgerät starke Schwankungen während der Messungen auf. Zudem muß das Gerät bedingt durch eine Drift häufig rekaliert werden.



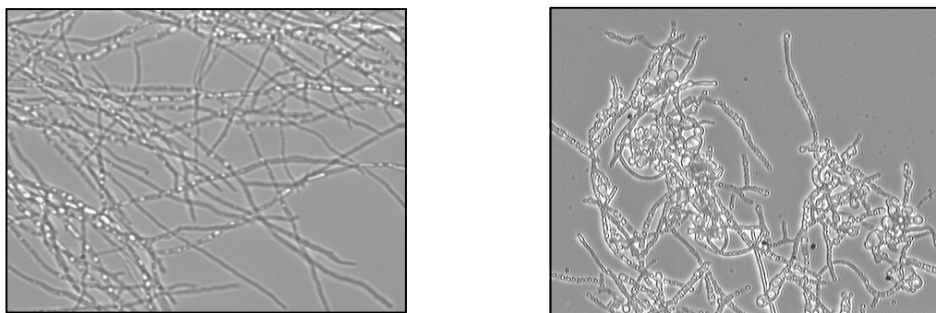
**Abbildung 4-19.**

Darstellung des Gelöstsauerstoffgehaltes, der Begasungsrate, der Rührerdrehzahl und der berechneten OTR-, CPR- und RQ-Werte während der Kultivierung R2.

Einen erhöhten Sauerstoffbedarf der Zellen ab dem 4. Tag konnten auch REISS [1990] und MILICIC ET AL. [1989] mit anderen *Claviceps purpurea* Stämmen beobachten. Dabei waren bei REISS in einem 2L-Reaktor Begasungsraten von 0,2-0,8 vvm eingestellt, die ein Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration auf 0 mg/L nicht verhindern konnten. Die Ausbeuten der Gesamtalkaloide betragen maximal 32 mg/L, was ungefähr 1/10 der maximalen Konzentrationen der von ihr durchgeführten Schüttelkolbenuntersuchungen entsprach.

Die bei Referenz 2 ermittelte höchste Alkaloidkonzentration (754 mg/L) entspricht hingegen ungefähr 2/3 bis 4/5 der in Schüttelkolben produzierten, maximalen Mengen.

Mikroskopische Untersuchungen im Laufe der Kultivierung R2 zeigen die morphologische Änderung des Pilzes von dem Stadium langer, dünner Hyphen zu verdickten, sklerotia-ähnlichen Zellen, die in der folgenden Graphik zu erkennen sind. Dabei ist in der linken Aufnahme eine Probe zu Beginn der Fermentation, in der rechten Aufnahme am Kultivierungsende zu sehen.

**Abbildung 4-20.**

Mikroskopische Aufnahmen von Kultivierungsproben zu Beginn der Kultivierung (links) und am Kultivierungsende (rechts).

Nach der ausführlichen Beschreibung des Kultivierungsverlaufs von R2 werden die hier erhaltenen Werte mit denen von R1 verglichen. Bei R1 liegt das  $pO_2$ -Minimum bei ungefähr 25 %, wobei die maximale Begasungsrate wie bei R2 3,5 vvm beträgt und die maximale Rührergeschwindigkeit mit 450 rpm etwas niedriger ist. Die Kurvenverläufe der Biomasse, Protein- und Alkaloidkonzentrationen entsprechen denen von R2. Da R1 bereits nach 350 h beendet wird, ist allerdings kein Abfall des Alkaloidgehaltes wie bei R2 erkennbar.

**Tabelle 4-5.**

Gegenüberstellung der wichtigsten Parameter der Kultivierungen F2, R1 und R2.

Parameter	F2	R1	R2
Min. $pO_2$ [%]	20-25	25	30
Max. Begasung [vvm]	2,5	3,5	3,5
Max. Rührergeschwindigkeit [rpm]	350	450	500
Biotrockenmasse [g/L]	10,8	59,9	33,7
Proteinkonzentration [g/L]	6,4	10,1	7,6
Gesamtalkaloidgehalt [mg/L]	155,9	504,1	753,7
Max. Ausbeute [mg Alkaloid/g BTM]	n.b.	11,0	25,3
Max. Produktivität [mg Alkaloid/L · h]	n.b.	1,8	2,8
Max. Ergotamingehalt [mg/L]	n.b.	52,5	134,9
Max. $\alpha$ -Ergokryptingehalt [mg/L]	n.b.	12,1	14,0

n.b.: nicht bestimmt

In Tabelle 4-5 sind zum Vergleich die off-line ermittelten Werte am Ende der jeweiligen Fermentation gegenübergestellt. Außerdem sind die Daten der Fermentation ohne Antischaummittel (F2) aufgeführt, die zur Beurteilung des Einsatzes von Desmophen als Antischaummittel herangezogen und mit den Kultivierungen R1 und R2 verglichen werden.

Bei beiden Kultivierungen mit Zusatz von Desmophen 3900 können höhere Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Medium durch gesteigerte Begasung bzw. Rührleistung eingestellt werden. Durch die Verhinderung der Schaumbildung werden die Zellen kaum noch ausgetragen, was sich in den um das drei- (R2) bis sechsfache (R1) erhöhten Biomassen im Vergleich zu F2 zeigt. Auch die Konzentration an extrazellulären Proteinen ist um 18 % (R2) bzw. 58 % (R1) gesteigert worden. Eine sehr starke Zunahme um den Faktor 3 (R1) bzw. 5 (R2) ist bei den Gesamtalkaloidkonzentrationen zu sehen. Die Ausbeuten der drei Kultivierungen können nicht miteinander verglichen werden, da für F2 die Berechnung der Ausbeuten zu sehr hohen Werten führt, die nicht den wahren Gegebenheiten entsprechen. Dies ist auf den starken Rückgang der Biomasse bedingt durch das Austragen der Zellen zurückzuführen, so daß die Ausbeute immer höhere Werte annimmt, obwohl gleichzeitig auch die Alkaloidkonzentration sinkt.

Somit führt der Einsatz von Desmophen im Bioreaktor zu Steigerungen des Wachstums und der Alkaloidproduktion, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der Schüttelkolbenversuche steht. Dies verdeutlicht, wie unterschiedlich die Bedingungen in den beiden Kultivierungssystemen Bioreaktor/Schüttelkolben sind, vor allem in Bezug auf Sauerstoffversorgung und Scherstreß.

Der Vergleich von R1 und R2 zeigt die Schwierigkeit auf, in zwei Kultivierungen von *Claviceps purpurea* unter den selben Bedingungen reproduzierbare Ausbeuten zu erhalten. Während die Biotrockenmasse bei R1 (60 g/L) fast doppelt so groß ist, werden in dieser Kultur nur 66 % (504 mg/L) der in R2 (754 mg/L) produzierten Alkaloidmenge gefunden. Demnach weist R1 mit 11,0 mg Alkaloid/g BTM eine um mehr als die Hälfte geringere Ausbeute als R2 (25 mg/g BTM) auf und auch die maximale Produktivität liegt mit 1,8 mg/L·h deutlich hinter dem Wert von R2 (2,8 mg/L·h). Ebenso deutlich liegen die Unterschiede in der maximalen Konzentration an Ergotamin in der Kulturbrühe, wobei in R1 mit 53 mg/L nur rund 39 % der in R2 produzierten Menge von 135 mg/L zu finden ist.

Gegenüber den von LOHMEYER UND SANDER [1993] für denselben *Claviceps purpurea* 1029 N5 Stamm erzielten Biomasse- (12 g/L) und Gesamtalkaloidkonzentrationen (246 mg/L) liegen die hier erreichten Biomassen (59,9 bzw. 33,7 g/L) um den Faktor 5 bzw. 3 und die Alkaloidkonzentrationen (504 bzw. 754 mg/L) um den Faktor 2 bzw. 3 deutlich höher. Weitere Experimente der Autoren in einer Blasensäule wiesen noch geringere Ausbeuten auf.

Diese Kultivierungen zeigen deutlich die Schwierigkeiten einer *Claviceps* Fermentation auf. Der Einsatz eines Antischaummittels ist in dem Rührkesselreaktor notwendig, um das Austragen der Zellen zu vermeiden. Dennoch kann auch bei Fermentationen mit Antischaummitteln ein Zellwachstum oberhalb des Mediums an der Reaktorwand nicht völlig verhindert werden, da durch die Begasung und den Rührer das zellhaltige Medium an die Wände verteilt wird. Die Zellen können dabei die Innenseite des Reaktordeckels zuwachsen, so daß ein Überdruck im Innenraum entsteht, der dann z.B. zum Abspringen von Versorgungsleitungen führen

kann. Demzufolge ist die Entwicklung einer Sauerstoffversorgung, die nicht nur auf der Begasung des Mediums mit Druckluft beruht, sinnvoll. Daher werden in den weiteren Kultivierungen die Zugabe von Wasserstoffperoxid bzw. die Kultivierung im 2-Phasen-System untersucht.

#### 4.6.3 Kultivierungen mit Zudosierung von Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid wird in drei Kultivierungen als zusätzliche Sauerstoffquelle zudosiert. Die Regelung der Zugabe erfolgt mit Hilfe eines Reglers, dessen Funktionsweise und ständige Weiterentwicklung im Verlauf der drei Kultivierungen in Kapitel 3.5 ausführlich beschrieben ist.

Ziel ist es, den Sauerstoffeintrag und damit die Sauerstoffversorgung der Zellen zu erhöhen, wobei die Begasung und die Rührergeschwindigkeit reduziert werden sollen, um die Scherstreßbelastung zu minimieren.

Die drei Kultivierungen werden zunächst getrennt voneinander beschrieben, wobei auf die Besonderheiten und Schwierigkeiten eingegangen wird. Am Ende des Kapitels erfolgt ein Vergleich der Fermentationen untereinander sowie mit den Referenzkultivierungen.

##### 4.6.3.1 Kultivierung H1

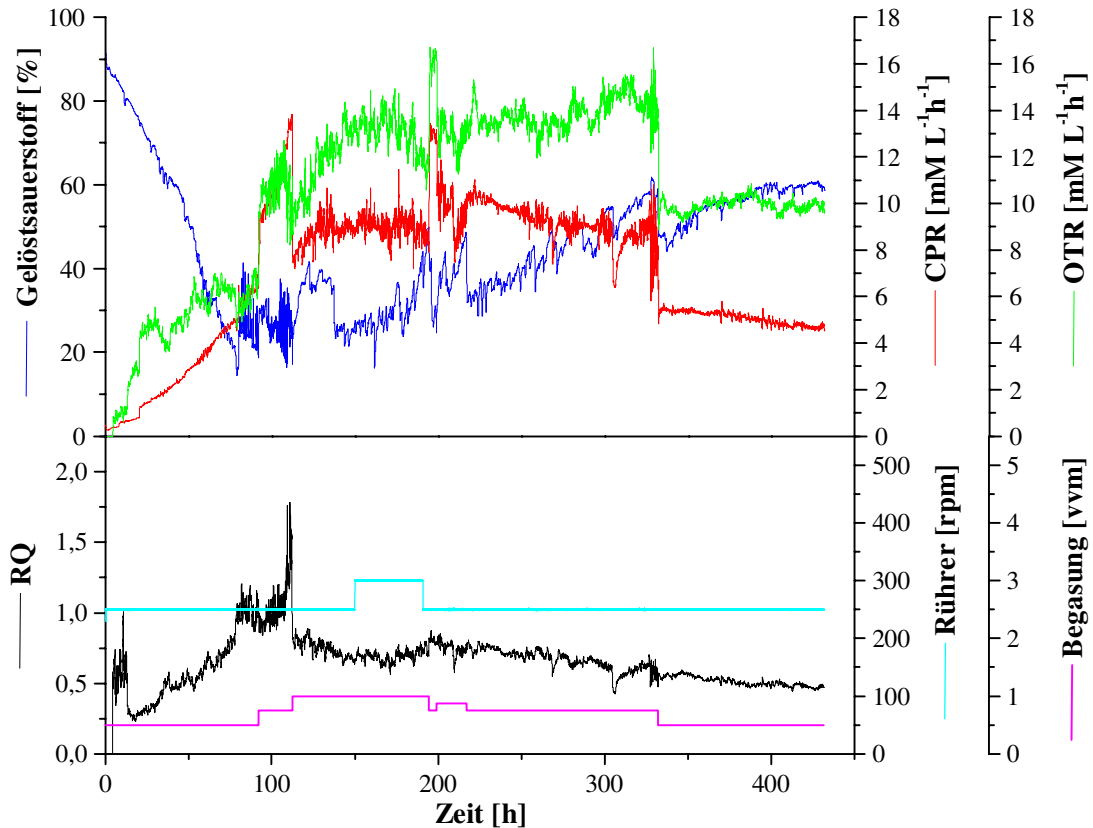
Die erste Kultivierung mit Zugabe 3 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung (H1) ist in Zusammenarbeit mit BOEHL [1998] durchgeführt worden. Da das Ziel ist, bei niedrigen Begasungsraten und Rührerdrehzahlen zu arbeiten, wird bei dieser Fermentation auf die Zugabe von Antischaummittel verzichtet.

In dieser Kultivierung soll zunächst der zweite Teil des Reglers, der sogenannte „Notfallregler“ etabliert werden. Die Konzentration des Gelöstsauerstoffs, bei der die  $H_2O_2$ -Zufuhr beginnen soll, wird zunächst auf einen niedrigen Wert von 25 % gesetzt. Sollte der Regler funktionieren und die Zufuhr des Peroxids erfolgreich sein, kann die Grenze erhöht werden, wobei dann höhere Mengen Peroxid zugeführt werden müssen, um den  $pO_2$ -Wert beispielsweise auf 40 % zu halten.

Wie in Abbildung 4-21 zu sehen, ist nach ungefähr 74 h Kultivierungsdauer der  $pO_2$ -Gehalt im Medium auf 25 % gesunken und die Zudosierung von  $H_2O_2$  beginnt.

Da in den weiteren Stunden der Sauerstoffbedarf stark ansteigt, reicht das vom Regler berechnete und zugegebene Volumen nicht aus, um den Grenzwert von 25 % zu halten. Grund dafür sind die zunächst zu hoch angesetzten Totzeiten des Reglers. Daher erfolgt im weiteren Kultivierungsverlauf eine manuelle Zugabe von ca. 0,7 mL erst stündlich, dann alle 20 und anschließend alle 10 Minuten. Später wird das zuzugebende Volumen auf das Doppelte erhöht. Am Verlauf des  $pO_2$ -Wertes sind die großen Schwankungen bedingt durch die Zugabe größerer Mengen Peroxid zu erkennen. Da jedoch die zugeführte Menge an Sauerstoff nicht ausreicht, um den Gelöstsauerstoffgehalt über 25 % zu halten, müssen die Begasung und später die Rührerdrehzahl erhöht werden. Die dadurch verursachte Schaumentwicklung führt zu

einer dichten Schaumdecke, die wiederum die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkt in das Medium verhindert, da die Lösung auf dieser Schicht hängenbleibt. Daher muß die Schaumschicht regelmäßig durch mechanisches Schütteln des Reaktors zerstört werden.



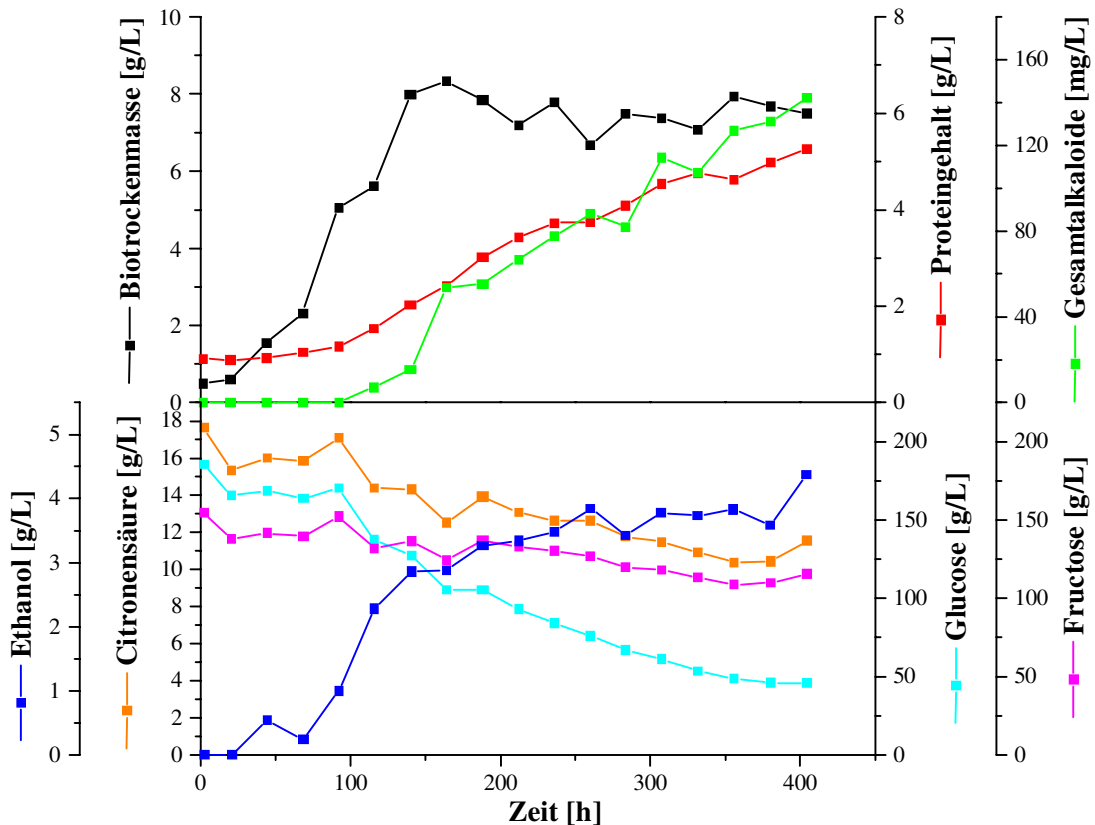
**Abbildung 4-21.**

Darstellung der bei H1 eingestellten Begasungsrate und Rührerdrehzahl, des  $\text{pO}_2$  sowie der aus den Abgasdaten berechneten Werte für CPR, OTR und RQ nach der Zeit.

Ab der 112. Stunde wird die Begasung auf 1,0 vvm erhöht und der Regler soweit optimiert, daß im weiteren Verlauf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe über den Regler erfolgt. Der OTR liegt bis kurz nach Beginn der Zugabe von Wasserstoffperoxid über dem CPR-Wert. Anschließend jedoch überwiegt die Kohlendioxidproduktion, was sich im RQ-Wert größer 1 zeigt. In dieser Phase liegen teilweise anaerobe Bedingungen vor, die erst durch Erhöhung der Begasung auf 1,0 vvm behoben werden können. Im restlichen Kultivierungsverlauf überwiegt die Sauerstoffaufnahme.

Das Ziel, eine ausreichende Sauerstoffversorgung durch Zugabe von Wasserstoffperoxid bei geringen Rührerdrehzahlen bzw. Begasungsraten zu gewährleisten, ist in dieser Fermentation noch nicht erreicht. Durch die großen Totzeiten des Reglers und die Berechnung der zuzugebenden Menge allein aus den Gelöstsauerstoffwerten (siehe Kapitel 3.5), ist keine kontinuierliche Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgt. Die manuelle Dosierung hat teilweise sehr hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen in das Medium eingebracht, was eigentlich durch den Regler verhindert

werden sollte, um die Zellen nicht zu schädigen. Dadurch sind hohe Schwankungen der Gelöstsauerstoffkonzentration und ein Abfall des  $pO_2$  auf 20 % aufgetreten. Wie sich diese Sauerstoffversorgung auf das Zellwachstum und die Alkaloidproduktion ausgewirkt hat, geht aus Abbildung 4-22 hervor.



**Abbildung 4-22.**

Darstellung der off-line ermittelten Parameter zur Beurteilung des Wachstums und der Produktbildung von H1 ohne Berücksichtigung der Verdünnung.

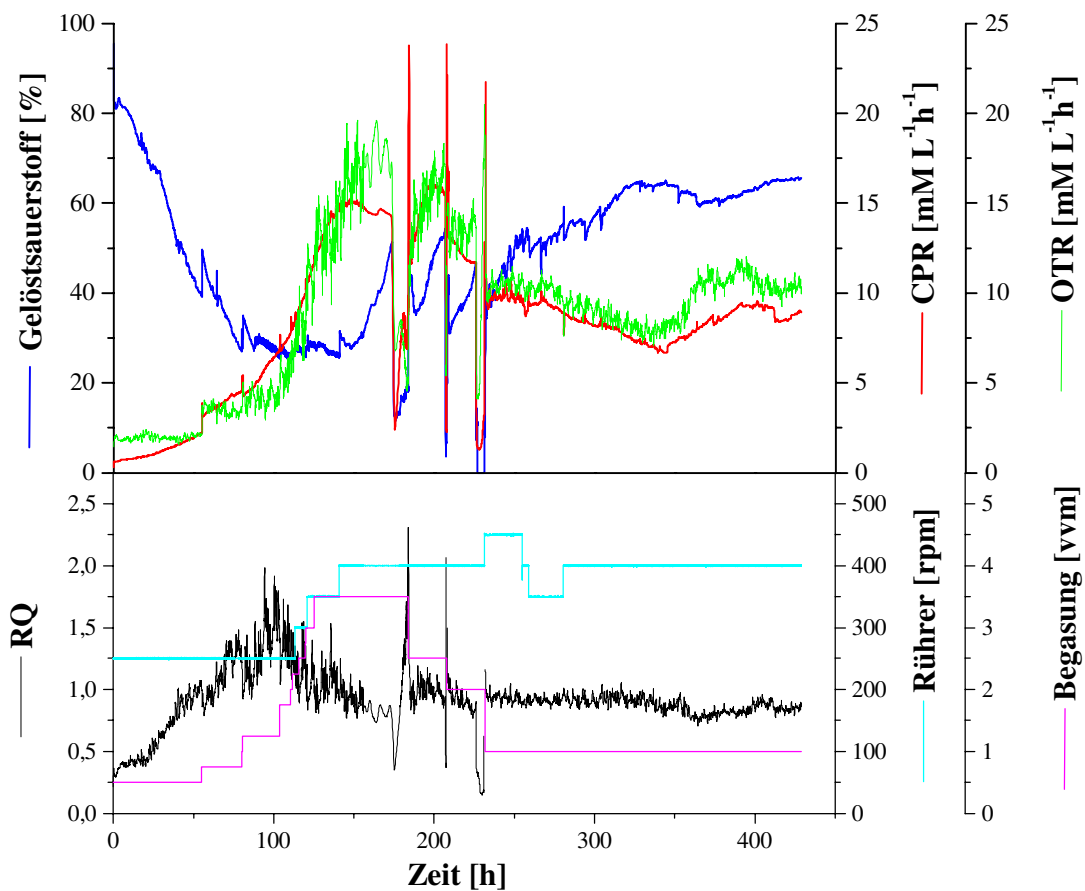
Die Biomasse nimmt in der Adaptionphase bis zur 100. Stunde zu, steigt jedoch anschließend nur noch gering an, so daß bereits nach 164 h das Maximum von 8,3 g/L erreicht ist. Dieser Biomassegehalt ist äußerst gering und liegt in dem Bereich der Kultivierung F2. Die Hauptursache hierfür scheint in der starken Schaumentwicklung zu liegen, die trotz niedriger Begasungsrate und Rührerdrehzahl auftritt, wodurch die Zellen außerhalb des Mediums wachsen. Die Alkaloidkonzentration steigt ab der 100. Stunde an und weist nach 404 h mit 142 g/L ebenfalls einen niedrigen Wert auf, der jedoch um 38 % über dem bei F2 (103 mg/L) produzierten Alkaloidgehalt liegt. Die Kohlenstoffquelle Saccharose bzw. ihre Spaltstücke Glucose und Fructose werden ähnlich wie in der Referenzkultur verstoffwechselt, wobei nach 405 h noch 46 g/L Glucose und 115 g/L Fructose nach der Hydrolyse vorhanden sind. Am Kultivierungsende liegt ein Citronensäuregehalt von ca. 10,5 g/L vor.

Auffallend ist der Verlauf der Ethanolkonzentration, die während der gesamten Kultivierung ansteigt. Dies ist ungewöhnlich, da anhand der Werte des  $pO_2$  und des RQ zwar eine Sauerstofflimitierung zwischen der 81.-112. Stunde vorgelegen hat, die jedoch anschließend behoben ist. Da für die Messung drei Analysegeräte ( $pO_2$ -Elektrode,  $O_2$ - und  $CO_2$ -Analysator) eingesetzt werden, ist es unwahrscheinlich, daß alle drei Geräte einen großen Meßfehler aufweisen. Somit ist nicht erklärbar, weshalb Ethanol als Stoffwechselprodukt anaerober Bedingungen weiter gebildet wird.

#### 4.6.3.2 Kultivierung H2

Die folgende Kultivierung mit Wasserstoffperoxid wird aufgrund der hohen Schaumbildung in H1 mit Desmophen als Antischaummittel durchgeführt. Der „Notfallregler“ ist durch Veränderung der Verstärkungsfaktoren und Totzeiten optimiert worden. Der  $pO_2$ -Grenzwert, bei dem die Zugabe der  $H_2O_2$ -Lösung beginnt, ist auf 30 % erhöht worden.

Wie aus Abbildung 4-23 ersichtlich ist, wird bereits nach 55 h die Begasungsrate von 0,5 vvm auf 0,75 vvm erhöht, um dem starken Sauerstoffbedarf gerecht zu werden und anaerobe Verhältnisse zu verhindern.



**Abbildung 4-23.**

Darstellung der bei H2 eingestellten Begasungsrate und Rührerdrehzahl, des  $pO_2$  sowie der aus den Abgasdaten berechneten Werte für CPR, OTR und RQ nach der Zeit.



Nach 75 h ist der  $pO_2$ -Wert auf 30 % gesunken und die  $H_2O_2$ -Zugabe beginnt. Diesmal erfolgt die Dosierung mit Hilfe des Reglers, wobei die hohen  $pO_2$ -Schwankungen, die bei H1 aufgetreten sind, vermieden werden können. Allerdings ist zu erkennen, daß der Mittelwert des Gelöstsauerstoffs immer weiter abnimmt, so daß der  $pO_2$  bis auf Werte um 26 % sinkt, ehe ein Anstieg bedingt durch die  $H_2O_2$ -Zugabe erfolgt. Demzufolge wird die Begasung und Rührerdrehzahl zusätzlich erhöht, um die Sauerstoffkonzentration zu steigern. Dabei werden maximale Drehzahlen von 350 rpm und Begasungsraten von 3,5 vvm eingestellt. Obwohl zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, zwischen der 80.-120. Stunde, der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium nicht unterhalb 25 % liegt, zeigt der RQ mit Werten größer 1 für diesen Zeitraum anaerobe Verhältnisse an. Da die zur Berechnung des RQ verwendeten OTR-Werte nur den Sauerstoffeintrag über die Druckluft berücksichtigen, geben diese Werte im Zeitraum der  $H_2O_2$ -Zugabe nicht die gesamte Sauerstoffaufnahme wieder. Sowohl der OTR als auch der RQ müssen daher in diesem Bereich kritisch beurteilt werden und können nur eine Tendenz aufzeigen. Ob und inwiefern anaerobe Verhältnisse vorliegen, kann anhand der Ethanolbildung bestimmt werden, die Abbildung 4-24 dargestellt ist.

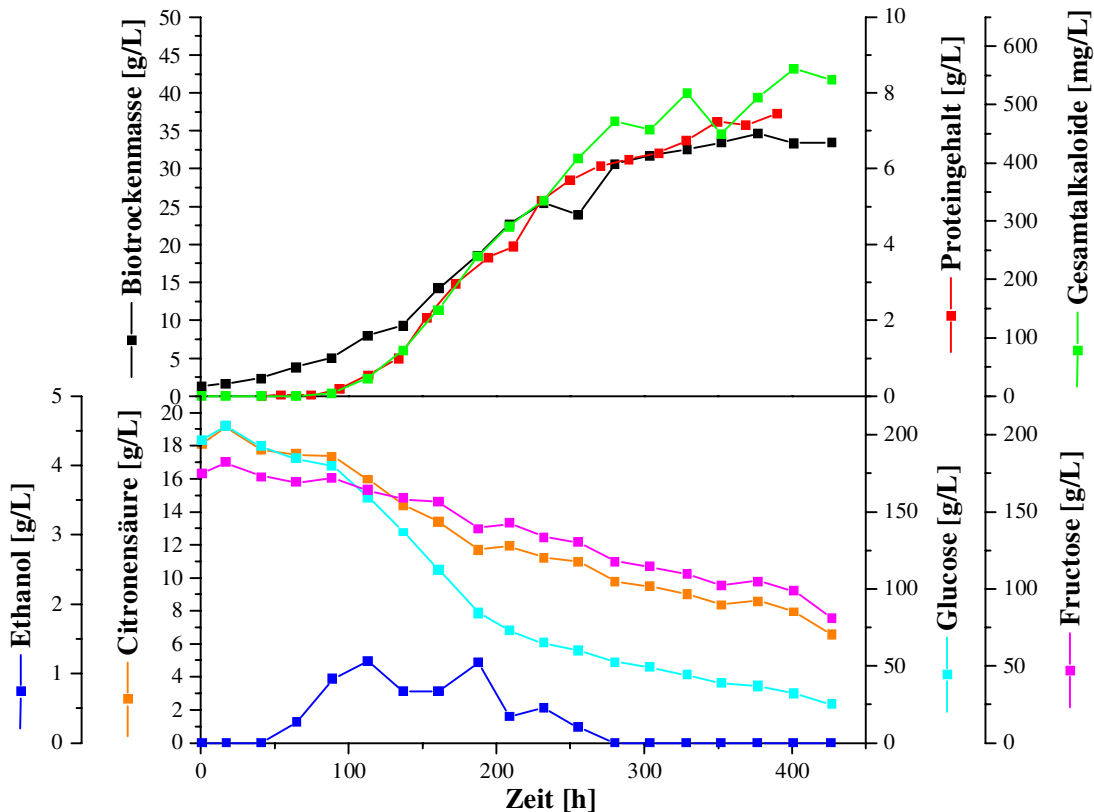
Nach ca. 174 h tritt der Fall ein, für den dieser Regler konzipiert ist: Aufgrund der hohen Begasungsrate von 3,5 vvm und der Erhöhung des Mediumvolumens durch die  $H_2O_2$ -Lösung hat sich im Reaktor ein Überdruck aufgebaut, der zum Abspringen des Begasungsschlauches vor dem Sterilfilter führt. Somit wird keine Luft mehr in den Reaktor eingetragen und die Sauerstoffversorgung ausschließlich über Wasserstoffperoxid gewährleistet. Dadurch ist es möglich, den  $pO_2$ -Gehalt im Medium zunächst nicht unter 10 % sinken und anschließend allmählich auf nahezu 20 % steigen zu lassen. Somit hat sich dieser Regler für solche Notsituationen sehr gut bewährt. Es zeigt sich hier allerdings das Problem der Zufuhr hoher Flüssigkeitsmengen (nach 200 h sind bereits 450 mL  $H_2O_2$ -Lösung zugegeben worden), was zu einem hohen Flüssigkeitsspiegel im Medium und damit auch zum Überdruck führt. Dadurch müssen zwischenzeitlich mehrere Male 50-100 mL Probe aus dem Reaktor entnommen werden, um ein Überlaufen zu verhindern.

Der „Notfallregler“ hat auch bei zwei weiteren Unterbrechungen der Luftzufuhr zumindest eine minimale Sauerstoffversorgung gewährleisten können.

Nach ca. 230 h liegt der  $pO_2$  über 40 % und die Sauerstoffaufnahme ist höher als die Kohlendioxidproduktion.

Der Ethanolgehalt (Abbildung 4-24) bestätigt mit den drei Maxima die oben aufgeführten Zeitpunkte der ungenügenden Sauerstoffversorgung. Somit liegt nach 100-120 h Sauerstofflimitierung im Medium vor, obwohl der Gelöstsauerstoff oberhalb 25 % gelegen hat. Die Zeitpunkte der Unterbrechung der Luftzufuhr und des deshalb abfallenden Gelöstsauerstoffgehaltes im Medium zeigen sich durch die zwei weiteren Maxima der Ethanolkonzentration. Nach 280 h ist Ethanol jedoch vollständig abgebaut. Die im Vergleich mit Referenzen geringeren Endkonzentrationen der Kohlenstoffquellen Glucose (25 g/L), Fructose (81 g/L) und

Citronensäure (6,5 g/L) weisen auf eine erhöhte Stoffwechselleistung hin. Dies wird anhand der Biomasse und Alkaloidkonzentrationen bestätigt. Trotz der noch nicht berücksichtigten Verdünnung des Kulturmediums ist eine deutliche Steigerung der Biomasse und der Alkaloidproduktion zu erkennen. Die Kurvenverläufe entsprechen dabei der Referenzkultivierung. Am Ende der Kultivierungszeit ist die Biomasse auf 34 g/L, der Proteingehalt auf 7,5 g/L und die Gesamtalkaloidkonzentration auf 560 mg/L gestiegen, was eine deutliche Steigerung zur Kultivierung H1 darstellt.



**Abbildung 4-24.**

Darstellung der off-line ermittelten Parameter zur Beurteilung des Wachstums und der Produktbildung von H2 ohne Berücksichtigung der Verdünnung.

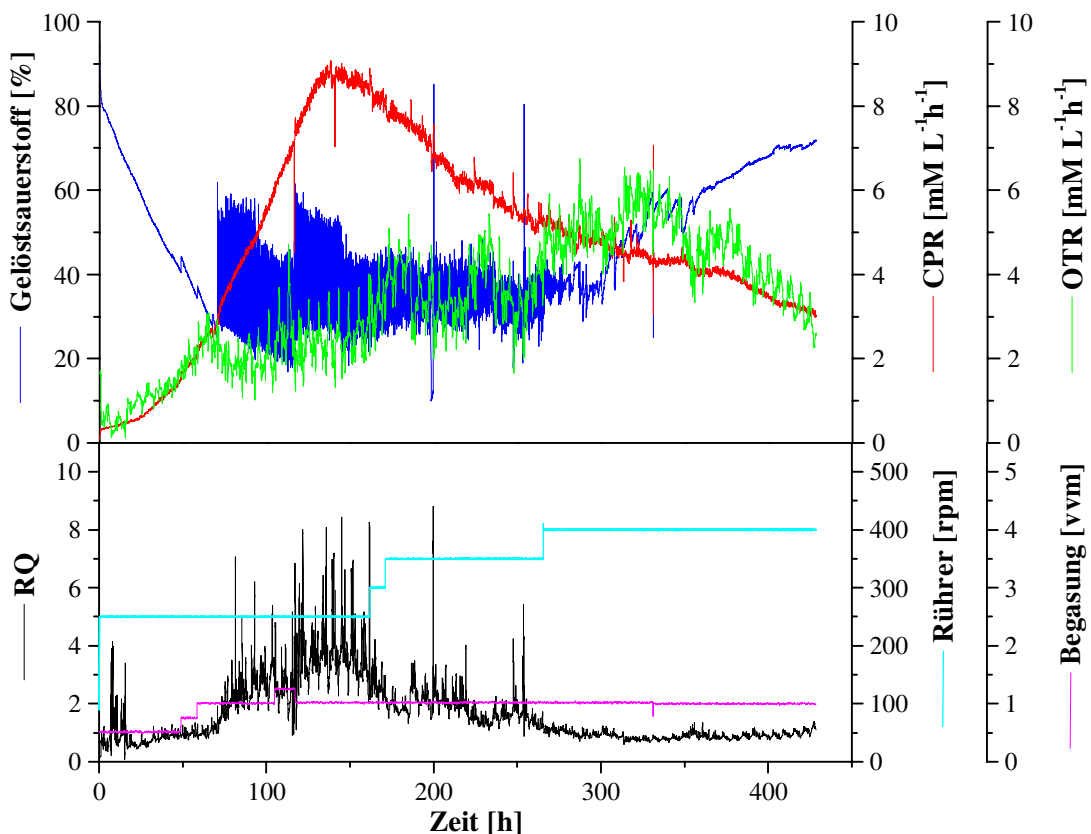
Der Einsatz von Desmophen als Antischaummittel hat sich auch bei Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe bewährt. Der „Notfallregler“ hat die Sauerstoffzufuhr unterstützen können, besonders in Fällen, in denen die Sauerstoffversorgung durch Druckluft unterbrochen war. Allerdings ist es noch nicht gelungen, den gelösten Sauerstoff allein durch Zugabe von  $H_2O_2$  auf einem konstanten Niveau zu halten.

Nachdem in Kultivierung H2 der „Notfallregler“ etabliert und auf seine Zuverlässigkeit bei Unterbrechung der Luftzufuhr getestet wurde, wird der Hauptregler, der die  $H_2O_2$ -Zugaberaten aus den Abgasdaten berechnet (s. Kapitel 3.5), in der folgenden Kultivierung eingesetzt. Der  $pO_2$ -Wert soll hierbei innerhalb der Grenzen von 30-45 % gehalten und das

Unterschreiten des gewählten Minimums verhindert werden. Um die bei H2 aufgetretenen hohen Verdünnungsraten zu minimieren, wird eine 10 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung zudosiert. Außerdem wird erneut Desmophen als Antischaummittel eingesetzt.

#### 4.6.3.3 Kultivierung H3

Zu Beginn dieser Fermentation (H3) wird die Begasung wie schon bei H2 auf 0,75 bzw. 1,0 vvm erhöht (Abbildung 4-25). Nach 70 h ist der Grenzwert des Gelöstsauerstoffgehaltes von 30 % erreicht, obwohl die  $H_2O_2$ -Zugabe bereits nach Unterschreitung von 45 % eingesetzt hat.

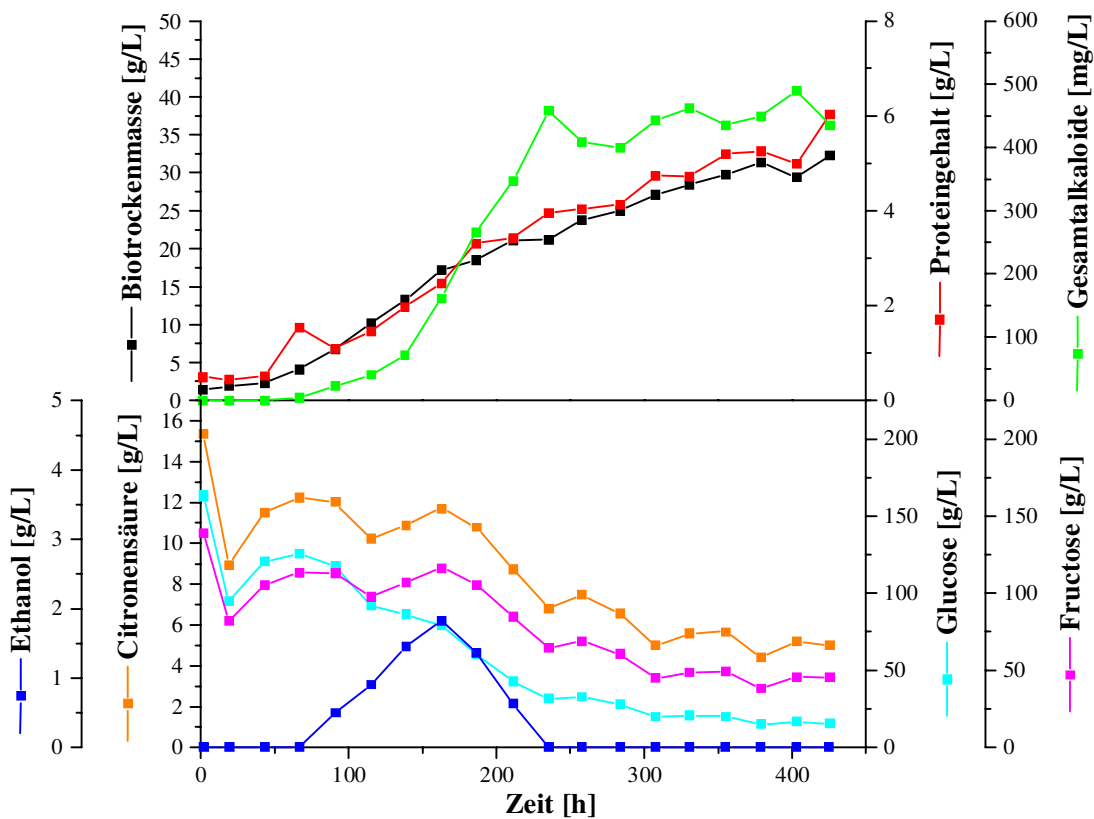


**Abbildung 4-25.**

Darstellung der eingestellten Begasungsrate und Rührerdrehzahl, des  $pO_2$  sowie der aus den Abgasdaten berechneten Werte für CPR, OTR und RQ nach der Zeit im Laufe der Kultivierung mit Zugabe von 10 %iger  $H_2O_2$ -Lösung (H3).

Da die Pumpe der Steuereinheit keine kleineren Volumina als 0,8 mL zugeben kann, werden die berechneten Volumina des Reglers aufaddiert, bis eine Menge von 0,8 mL erreicht ist. Dann wird diese (oder eine höhere Menge) dem Medium zugeführt. Da bei dieser Kultivierung 10 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung verwendet wird, wirkt sich die Zugabe dieses hohen Volumens stark auf den  $pO_2$ -Wert aus, der sofort drastisch ansteigt. Dabei treten Schwankungen des  $pO_2$ -Werts von 25-30 % auf. Der  $pO_2$ -Minimumwert nimmt im Laufe der weiteren Kultivierung immer weiter ab, bis er bei ca. 20 % liegt. Aus diesem Grund wird die Begasung zusätzlich auf 1,25 vvm erhöht. Im weiteren Verlauf der Kultivierung kann die Bega-

sung wieder auf 1,0 vvm gestellt werden. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid erfolgt bis zur 300. Stunde, anschließend wird der Sauerstoffbedarf durch die Begasung vollständig gedeckt. Die Kohlendioxidproduktionsrate steigt ab dem Beginn der Kultivierung stark an und erreicht nach ca. 145 h ihren Maximalwert. Aus den bei der Beschreibung von H2 bereits ausgeführten Gründen, nimmt der OTR mit Beginn der Peroxidzugabe ab und liegt bis zum Ende der Zudosierung unterhalb des CPR. Anschließend überwiegt die Sauerstoffaufnahme wieder. Da jedoch sehr viel Sauerstoff über Wasserstoffperoxid in das Medium eingebracht aber nicht in den OTR mit einbezogen wird, geben diese Werte nur die Versorgung über die Druckluft wieder. Der RQ weist nach ungefähr 140 h ebenfalls ein Maximum auf, was sich in den Werten des Ethanolgehaltes widerspiegelt (Abbildung 4-26).



**Abbildung 4-26.**

Darstellung der off-line ermittelten Parameter zur Beurteilung des Wachstums und der Produktbildung von H3 ohne Berücksichtigung der Verdünnung.

Im Gegensatz zu den anderen Kultivierungen tritt das Maximum der Ethanolkonzentration etwas später auf (nach ca. 160 h) und liegt mit 1,8 g/L um 1,0-1,2 g/L höher als bei den beiden Referenzkultivierungen und um 0,6 g/L höher als bei H2. Weiterhin weisen die Kohlenstoffquellen nach 425 h geringere Werte auf (Glucose: 15,4 g/L; Fructose: 45,3 g/L; Citronensäure: 5,0 g/L). Die Verdünnungsfaktoren sind dabei jedoch noch nicht berücksichtigt worden. Deren Einbeziehung erfolgt erst beim Vergleich der verschiedenen Kultivierungen am Ende des Kapitels.

Die ermittelten Werte für die Biomasse lassen keinen negativen Einfluß des Wasserstoffperoxids bzw. der zugesetzten hohen Konzentrationen vermuten, vielmehr entsprechen die Verläufe der off-line ermittelten Parameter denen der Referenz. Die Endkonzentration von 32,3 g/L liegt in dem Bereich von R2 und H2. Die Konzentrationen an Proteinen (6,0 g/L) und an Alkaloiden (490 mg/L) liegen jedoch unterhalb der Werte, die bei H2 und R2 ermittelt wurden.

In dieser Kultivierung ist die zusätzliche Sauerstoffversorgung über Wasserstoffperoxid mit Hilfe des Hauptreglers über eine weite Zeitspanne gelungen. Es hat sich gezeigt, daß die Berechnung des Sauerstoffbedarfs aus den Abgasdaten zu einer schnelleren Reaktion des Reglers auf Unterschiede in der Sauerstoffversorgung führt. Die Berechnung aus den Steigungen des Gelöstsauerstoffgehaltes hat teilweise zu relativ großen Totzeiten geführt, die hier jedoch vermieden werden konnten. Des weiteren hat sich der Einsatz von 10 %-iger  $H_2O_2$ -Lösung bewährt, obwohl eine Verdünnung des Mediums nicht zu verhindern war. Die Versorgung mit  $H_2O_2$  ist über einen wesentlich längeren Zeitraum von 200 h erfolgreich durchgeführt worden.

#### 4.6.3.4 Vergleich der Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe

Für den Vergleich der verschiedenen Fermentationen unter Zusatz von Wasserstoffperoxid werden jeweils die am Ende der Kultivierung erhaltenen maximalen Werte der einzelnen Parameter miteinander verglichen. Dabei wird entsprechend des zugefügten Volumens der  $H_2O_2$ -Lösung ein Verdünnungsfaktor für jede Kultivierung berechnet, mit dem die Endkonzentrationen multipliziert werden. Nur so ist es möglich, genaue Aussagen über die Produktivität der Zellen zu erhalten. Beachtet werden muß dabei allerdings, daß auch dieses Verfahren Fehlerquellen beinhaltet, da dem Reaktor durch Probenahmen im Laufe der Fermentation Medium mit Zellen entnommen wurde. Des weiteren wurde während der Kultivierungen Kulturbrühe entfernt, um ein Überlaufen oder Überdruck zu vermeiden.

In der nachfolgenden Tabelle 4-6 sind alle entscheidenden Parameter unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors für die drei Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe vergleichend dargestellt. Zusätzlich sind die entsprechenden Werte der beiden Referenzkultivierungen R1 und R2 aufgeführt. Dabei werden jeweils die gegen Ende der Kultivierung vorliegenden maximalen Konzentrationen der Produkte und die insgesamt verbrauchten Mengen der Kohlenstoffquellen präsentiert. Des weiteren werden die Produktausbeuten bezogen auf die Gesamtalkaloidkonzentration und auf die erhaltenen Ergotamin-Konzentrationen getrennt berechnet.

Ein Vergleich der für die Beurteilung des Sauerstoffeintrags wichtigen  $pO_2$ -Werte zeigt, daß im Verlauf der Kultivierungen eine Regelung etabliert werden konnte, durch die der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium auf höherem Niveau gehalten werden konnte. Während der  $pO_2$ -Wert bei H1 teilweise unterhalb von 20 % lag, konnte er bei H3 zum Zeitpunkt des höchsten Sauerstoffbedarfs zwischen 20-25 % gehalten werden. Die bei H1 eingestellte maximale

Begasungsrate ist mit 1,0 vvm deutlich unterhalb der in der Literatur für diesen Stamm im Rührkesselreaktor angegebenen von 5 vvm [LOHMEYER UND SANDER, 1993], allerdings liegt das pO<sub>2</sub>-Minimum unterhalb von 20 %.

**Tabelle 4-6.**

Vergleich verschiedener Parameter der Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der beiden Referenzkultivierungen.

Parameter	H1	H2	H3	R1	R2
Zugegebenes Volumen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mL]	120	500	700	-	-
Min. pO <sub>2</sub> [%]	13-18	22-25 <sup>1</sup>	20-25	25	30
Max. Begasung [vvm]	1,0	3,5	1,25	3,5	3,5
Max. Rührergeschwindigkeit [rpm]	300	450	400	450	500
Biotrockenmasse [g/L]	8,4	41,9	43,6	59,9	33,7
Proteingehalt [g/L]	5,6	9,3	8,1	10,1	7,6
Umgesetzte Glucose [g/L]	136,8	165,5	142,4	115,1	124,2
Umgesetzte Fructose [g/L]	32,1	73,6	78,5	(+13,4)	26,4
Umgesetzte Citronensäure [g/L]	6,6	9,9	8,6	(+4,1)	2,2
Gesamtalkaloidgehalt [mg/L]	150,8	701,8	661,1	504,1	753,7
Max. Ergotamin-Konzentration [mg/L]	36,6	152,7	130,0	52,5	134,9
Max. α-Ergokryptin-Konzentration [mg/L]	1,4	18,5	12,6	12,1	14,0
Max. Alkaloidausbeute <sup>2,3</sup> [mg Alkaloide/g BTM]	20,1	21,0	22,5	11,0	25,3
Max. Ergotaminausbeute <sup>2,3</sup> [mg/g BTM]	4,9	5,0	4,6	0,9	5,0
Max. Produktivität <sup>3</sup> [mg Alkaloide/L·h]	0,4	2,1	1,9	1,8	2,8

<sup>1</sup> Diese Werte berücksichtigen nur die Niveaus bei unterstützender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe ohne Berücksichtigung der aufgrund der Unterbrechung der Druckluftzufuhr erniedrigten pO<sub>2</sub>-Gehalte zwischen 0-10 %.

<sup>2</sup> Die maximalen Ausbeuten beziehen sich auf den Zeitpunkt der max. Produktkonzentrationen, bei dem die Biomasse noch nicht unbedingt ihren Maximalwert erreicht hat.

<sup>3</sup> Die Werte beziehen sich auf den Zeitpunkt nach Beendigung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe bei H1-3 und berücksichtigen die Verdünnung.

Im Laufe der zweiten Kultivierung ist ein höheres Niveau des pO<sub>2</sub>-Wertes gehalten worden, was jedoch zum Großteil durch die zusätzlich erhöhten Rührerdrehzahlen und Begasungsraten bedingt ist. Durch den Einsatz der 10 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung bei H3 ist es gelungen, mit einer

relativ geringen Begasung von 1,25 vvm und einer Rührergeschwindigkeit von maximal 400 rpm den Gelöstsauerstoff bei knapp 25 % zu halten.

Vor allem in der letzten Fermentation hat die Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Medium zu einem weiteren Sauerstoffeintrag geführt, der die konventionelle Begasung unterstützen konnte. Dabei erfolgte die Zugabe über einen Zeitraum von 200 h, so daß insgesamt ein recht hohes Volumen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (700 mL) dem Kulturmedium zugefügt wurde. Im Vergleich zu den beiden Referenzkultivierungen konnte bei H3 mit niedrigeren Einstellungen der Zuluft und des Rührers der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium auf vergleichbarem (teilweise etwas niedrigerem) Niveau gehalten werden.

Trotz der erniedrigten Begasung kann auf den Zusatz von Antischaummitteln nicht verzichtet werden, wie sich in H1 gezeigt hat. Dort hat schon die Begasung mit 1 vvm Druckluft zu sehr starker Schaumbildung geführt.

Die Produktbildung weist bei den drei Kultivierungen deutliche Unterschiede zwischen H1 (151 mg/L Alkaloide) auf der einen und H2 (702 mg/L) bzw. H3 (661 mg/L) auf der anderen Seite auf. Aufgrund der starken Schaumentwicklung bedingt durch die leichte Erhöhung der Begasung sind bei H1 ähnliche Probleme aufgetreten wie bei den Kultivierungen F1 und F2. Allerdings konnte durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid die Begasung niedriger gehalten werden. Im Vergleich zu den ebenfalls ohne Antischaummittel durchgeführten Kultivierungen F1 und F2 weist die Biomasse jedoch kein Maximum auf und der Gesamtalkaloidgehalt ist um 38 % höher als bei F2. Dennoch sind die Biomasse-, die Protein- und die Gesamtalkaloidkonzentration deutlich geringer als bei H2, H3 und den beiden Referenzen, was sich ebenfalls in der sehr geringen Produktivität von 0,4 mg/L·h zeigt. Die maximale Alkaloidausbeute liegt allerdings mit 20,1 mg Alkaloid/g BTM nur leicht hinter denen von H2 und H3 zurück, während die auf das Produkt Ergotamin bezogene Ausbeute (4,9 mg/g BTM) im gleichen Bereich zu finden ist.

In den beiden Fermentationen H2 und H3 ist ein ähnlich hohes Zellwachstum mit Biomassen von 42-44 g/L erreicht worden. Allerdings liegt in H2 ein um 1,2 g/L größerer Proteingehalt vor. Zudem sind die umgesetzten Mengen der Kohlenstoffquellen Glucose und Citronensäure ebenfalls um 23 bzw. 1,3 g/L höher als bei H3. Daraus resultiert ein um 40 mg/L (= 6 %) höherer Gesamtalkaloidgehalt am Ende von H2 und auch die maximale Ergotamin-Konzentration liegt bei H2 um 22,7 mg/L (=18 %) deutlich höher. Demgegenüber liegt bei H3 eine höhere Alkaloidausbeute vor (22,5 mg/g BTM für H3, 21,0 mg/g BTM für H2), während die Ergotaminausbeute bei H2 (5,0 mg/g BTM im Gegensatz zu 4,6 mg/g bei H3) leicht erhöht ist. Diese Werte sind aus den maximalen Alkaloidkonzentrationen berechnet worden, die häufig nicht am Ende einer Fermentation (insbesondere bei Ergotamin), sondern schon früher vorliegen, wenn die Biomasse noch nicht ihr Maximum erreicht hat. Allerdings sind bei der

Berechnung erst die maximalen Werte nach Beendigung der Zugabe von Wasserstoffperoxid verwendet worden, da ansonsten die Verdünnung nicht berücksichtigt würde.

Somit haben sich die bei H2 aufgetretenen, kurzfristigen Sauerstofflimitierungen kaum auf die Produktbildung ausgewirkt. Dies könnte daran liegen, daß die starke Abnahme des Gelöstsauerstoffs in eine Phase fiel, in der der Sauerstoffbedarf (80-120 h) bereits nicht mehr maximal war.

Der Vergleich der beiden Kultivierungen mit Wasserstoffperoxid-Zugabe und den zwei Referenzen ergibt, daß die Werte für die Biomasse, Protein- und Gesamtalkaloidkonzentrationen bei H2 und H3 zwischen denen der Referenzen liegen. Obwohl in R2 im Vergleich mit den Kultivierungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe teilweise wesentlich geringere Mengen der Kohlenstoffquellen (besonders Citronensäure) umgesetzt werden, liegt der Gesamtalkaloidgehalt dort mit 754 mg/L am höchsten. Dies ist um so erstaunlicher, als daß die Alkaloidproduktion sehr stark von der Konzentration an Citronensäure abhängig ist. Aufgrund der hohen Alkaloidkonzentration in R2 ist dort auch die höchste Alkaloidausbeute mit 25,3 mg/g im Gegensatz zu H2 und H3 (21,0 bzw. 22,5 mg/g BTM) zu finden. Ebenso liegt bei R2 eine höhere Produktivität (2,8 mg/L·h) vor. Referenz 1 zeigt dagegen eine sehr geringe Alkaloidkonzentration (504 mg/L), die lediglich höher liegt als die von H1. Allerdings ist bei der Referenz 1 mit 11,0 mg/g BTM eine sehr geringe Alkaloidausbeute vorhanden, die sogar unterhalb der von H1 (20,1 mg/g BTM) liegt.

Obwohl R2 einen deutlich höheren Gesamtalkaloidgehalt aufweist, sind die entscheidenden Konzentrationen des Hauptproduktes Ergotamin bei H2 (153 mg/L) größer und bei H3 (130 mg/L) ähnlich der von R2 (135 mg/L). Die auf Ergotamin bezogene Produktivität liegt bei allen drei Fermentation mit Wasserstoffperoxid-Zugabe H1, H2 und H3 im Bereich 4,6-5,0 mg/g BTM ähnlich wie die Referenz R2 (5,0 mg/g BTM), wobei auch hier der Wert für R1 nur 1/5 davon beträgt.

Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid als alternative Sauerstoffquelle konnte die konventionelle Druckluftbegasung unterstützt werden, was zu einer Verringerung der Scherbelastung durch niedrigere Begasungsraten und Rührerdrehzahlen geführt hat. Eine Steigerung der Alkaloidproduktion ist gegenüber Referenz R2 nicht gelungen, vielmehr liegen die Alkaloidausbeuten in einem ähnlichen Bereich. Allerdings ist es mit diesem System gelungen, die Ausbeuten in einem annähernd gleichen Konzentrationsbereich zu etablieren, während die beiden Referenzkultivierungen erhebliche Differenzen in Ausbeute und Produktivität erkennen lassen. Des weiteren ist in einer Kultivierung mit Wasserstoffperoxid-Zugabe eine höhere Ergotaminkonzentration produziert worden.

Die Berechnung der zum Medium zu gebenden Wasserstoffperoxidmenge über die Begasungsrate und die Abgaswerte mit dem Regler ergibt höhere Gelöstsauerstoffgehalte im Vergleich zu den Kultivierungen, bei denen der „Notfallregler“ etabliert wurde. Mit dem Hauptregler konnte Wasserstoffperoxid über 200 h zugeführt werden.



Die bisher einzige veröffentlichte Arbeit über die Zugabe von Wasserstoffperoxid zu Kultivierungen von *Claviceps purpurea* von REISS [1990] ist mit immobilisierten Zellen und quervernetzter Katalase durchgeführt worden. Dabei sind leichte Erhöhungen der Ausbeute durch Zugabe von  $H_2O_2$  festgestellt worden. Ein Vergleich mit nativen Zellen ist jedoch schwierig, da bei immobilisierten Zellen die Sauerstoffversorgung komplizierter ist. Dort muß eine Versorgung der Zellen im Inneren der Pellets gewährleistet werden. Die dort erzielten Ausbeuten um die 20 mg/L liegen deutlich unterhalb der in dieser Arbeit erhaltenen Werte, allerdings ist dies von dem eingesetzten Stamm abhängig.

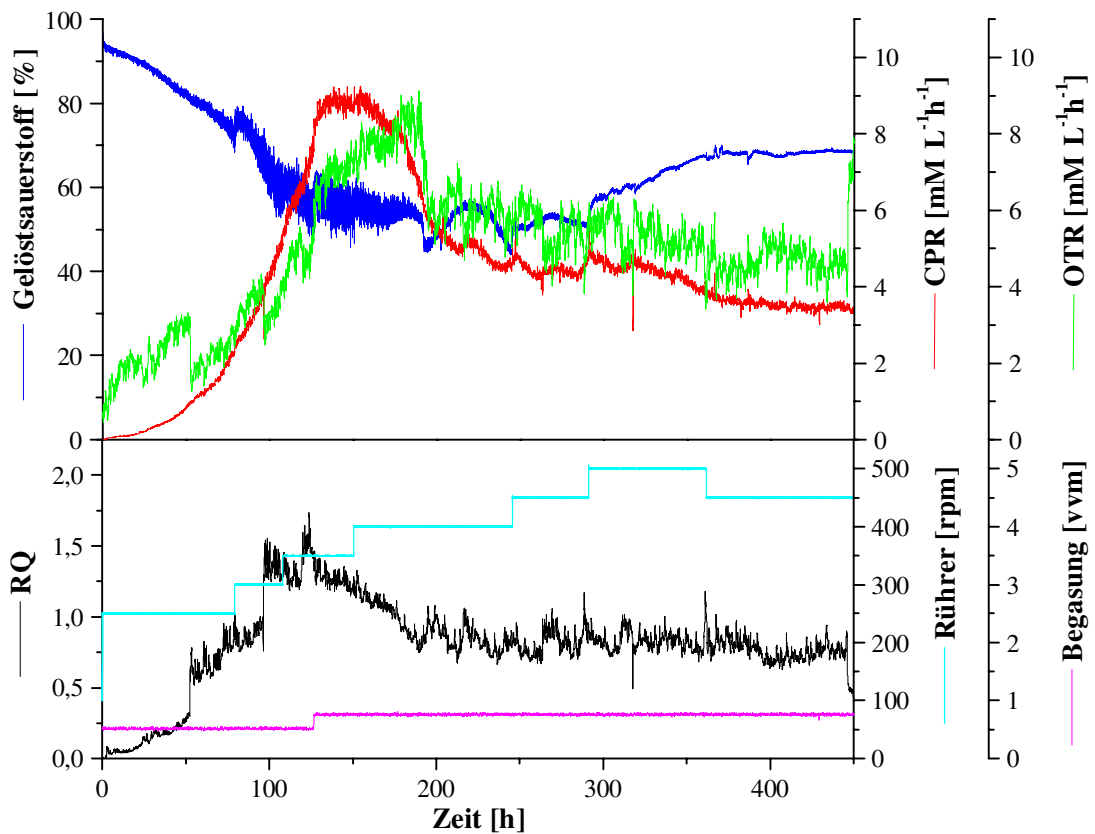
Somit ist die Zugabe von Wasserstoffperoxid in der Phase größten Sauerstoffbedarfs sehr sinnvoll und nützlich. Zudem dient sie als Sicherheitsmaßnahme, die einsetzt, wenn durch auftretende Fehler keine Begasung mehr stattfindet. In weiteren Untersuchungen wäre der Einsatz höher konzentrierter  $H_2O_2$ -Lösungen sinnvoll, um die hohe Verdünnung zu minimieren. Gleichzeitig sollte dann eine Präzisionspumpe verwendet werden, die in der Lage ist, kleinste Mengen zu pumpen. Nur so sind das  $pO_2$ -Niveau zu halten und starke Schwankungen zu vermeiden.

#### **4.6.4 Kultivierungen mit Zusatz verschiedener Konzentrationen Hostinert 216**

Aufgrund der aus den Voruntersuchungen gewonnenen positiven Ergebnisse in Hinblick auf Wachstum und Ausbeutesteigerung bei Zusatz von Hostinert 216 zum Kulturmedium, soll in verschiedenen Fermentationen im Rührkesselreaktor Hostinert eingesetzt werden. Dabei wird der Einfluß auf den Sauerstoffgehalt im Medium bei verschiedenen Hostinert-Konzentrationen überprüft und die Wirkung auf Wachstum, Ausbeute und Produktivität näher untersucht.

Zunächst werden bei zwei Kultivierungen (PFC1 und PFC2) die gleiche Hostinert-Konzentration von 20 % (v/v) eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit der Produktivität und des Wachstums zu untersuchen. Da sich die Graphen für den Gelöstsauerstoff und die Abgasdaten sehr ähneln, werden hier nur die Daten der zweiten Kultivierung gezeigt (die Verläufe für PFC1 sind im Anhang dargestellt) und später die ermittelten off-line Daten beider Kultivierungen miteinander verglichen.

Aus dem in Abbildung 4-27 dargestellten Verlauf des Gelöstsauerstoffs ist zu erkennen, daß dieser während der gesamten Kultivierungszeit nicht unterhalb 45 % sinkt. Dabei liegt er in der Zeit der exponentiellen Wachstumsphase zwischen der 90. bis 150. Stunde sogar oberhalb von 50 %. Die eingestellte Begasungsrate von 0,5 vvm muß nur einmal nach ungefähr 130 h auf 0,75 vvm erhöht werden. Dennoch steigt die Kohlendioxidproduktionsrate deutlich an und liegt bis ca. zur 140. Stunde über dem OTR-Wert. Dadurch steigt der Respirationsquotient nach 100 h über 1,0, so daß trotz des hohen Gelöstsauerstoffgehaltes im Medium anaerobe Bedingungen detektiert werden.



**Abbildung 4-27.**

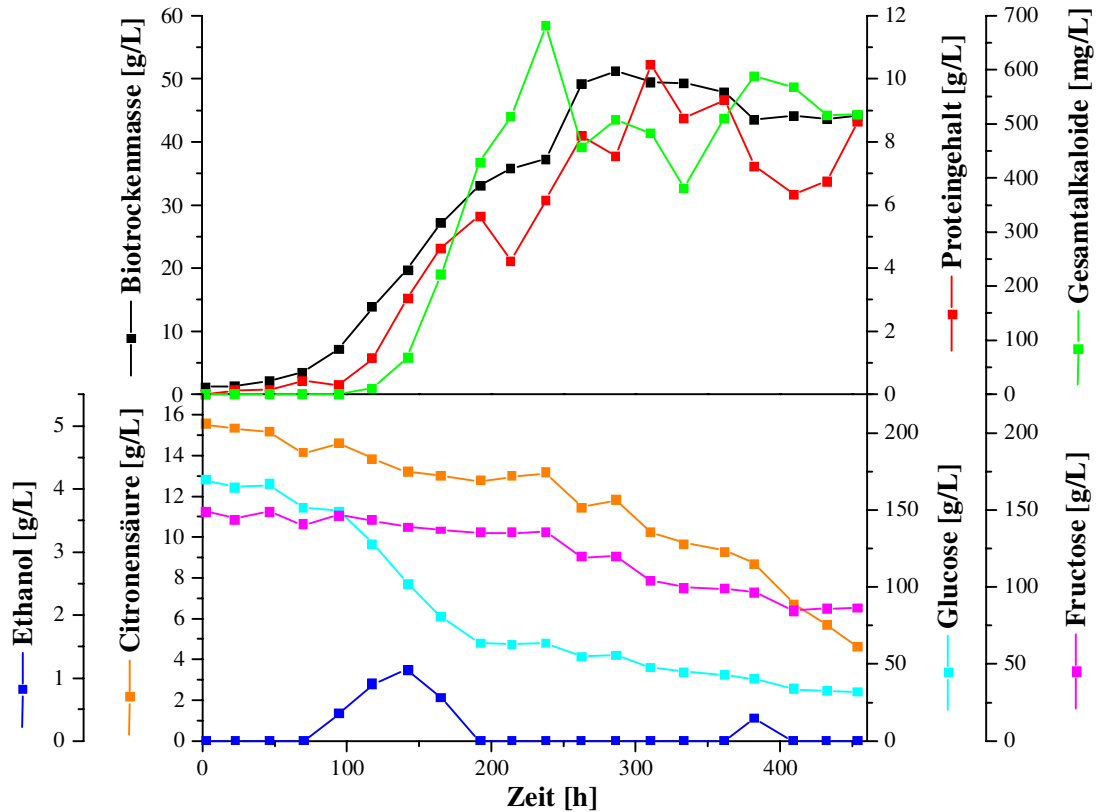
Vergleich der Parameter  $pO_2$ , CPR, OTR, RQ und die eingestellten Begasungsraten und Rührerdrehzahlen bei der Kultivierung mit 20 % (v/v) Hostinert (PFC2).

Der Rührer muß während der gesamten Kultivierungsdauer erhöht werden, um eine gleichmäßige Verteilung der organischen Phase im gesamten Reaktorraum zu gewährleisten. Die Viskosität des Mediums nimmt sehr stark zu, so daß Rührergeschwindigkeiten bis 500 rpm eingestellt werden müssen.

Die anfängliche Rührergeschwindigkeit von 250 bzw. 300 rpm zu Kultivierungsbeginn reicht aus, das Medium und die organische Phase vollständig zu suspendieren, was in Vorversuchen getestet wurde. Dabei ist der Gelöstsauerstoff in unterschiedlichen Höhen im Medium gemessen und keine Unterschiede festgestellt worden. Dies gilt aber nur für reines Medium ohne Zellen. Da während der Fermentation die Zellmasse stark zunimmt, sind von außen einzelne Einschlüsse bzw. Blasen mit Hostinert in der Zellsuspension erkennbar. Um diese gleichmäßiger zu verteilen und zu zerkleinern, damit die Oberfläche der PFC-Phase für einen Phasentransport vergrößert wird, muß stärker gerührt werden.

Die aus dem RQ-Wert ermittelten anaeroben Zustände im Medium werden durch die Ethanolbildung bestätigt, die nach ca. 140 h ein Maximum einnimmt (Abbildung 4-28). Der kurze Anstieg der Alkoholkonzentration gegen Ende der Kultivierung ist nicht erklärbar, da er bei der anderen Kultivierung PFC1 mit 20 % (v/v) Hostinert nicht auftritt. In beiden Kultivierung-

gen steigt die Biomasse bis zur 280. Stunde an und bleibt anschließend vergleichsweise konstant. Bei beiden Fermentationen treten vergleichbare Schwankungen im Verlauf der Proteinkonzentrationen auf.



**Abbildung 4-28.**

Verläufe der off-line ermittelten Parameter Biotrockenmasse, Protein-, Alkaloid-, Glucose-, Fructose-, Citronensäure- und Ethanol-Konzentration während der Kultivierung mit 20 % (v/v) Hostinert-Zugabe.

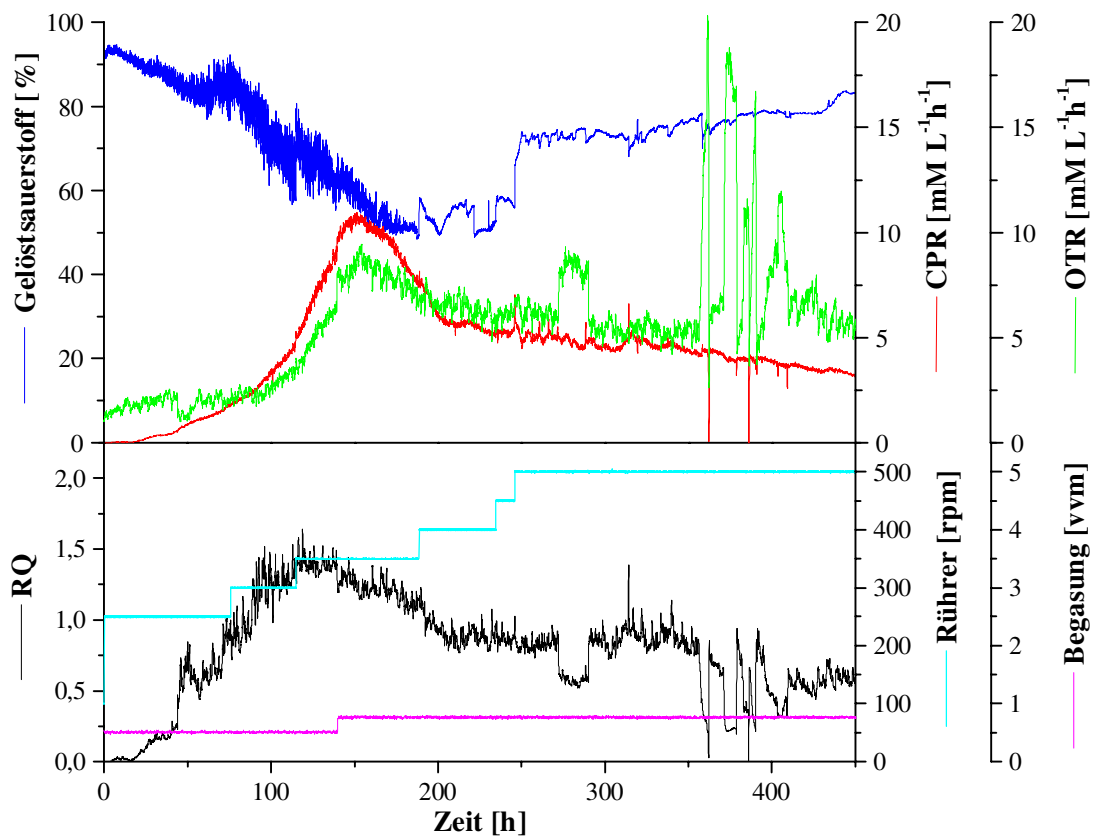
Die Abnahme der Kohlenstoffquellen verläuft erwartungsgemäß, wobei am Kultivierungsende 138 g/L Glucose, 63 g/L Fructose und 10,9 g/L Citronensäure metabolisiert worden sind.

Das hier auftretende Maximum in der Gesamtalkaloidkonzentration mit 681 mg/L weist bei beiden Kultivierungen den gleichen Wert auf, tritt wiederum bei beiden nach 280 h Kultivierungsdauer auf und ist damit reproduzierbar. Einhergehend mit dem Maximum und dem relativ starken Abfall des Alkaloidgehaltes kann ab diesem Zeitpunkt eine dunkle, bräunliche Verfärbung des Mediums beobachtet werden. Somit scheint nach 10 Tagen eine Änderung im Stoffwechsel stattzufinden.

Da die Abnahme des Alkaloidgehaltes und die Verfärbung des Mediums möglicherweise aufgrund des Zusatzes von Hostinert verursacht werden, wird in der folgenden Kultivierung (PFC3) eine geringere PFC-Konzentration von 10 % (v/v) eingesetzt. Zwar ist bei dieser Konzentration im Schüttelkolben nur eine verzögerte Steigerung des Wachstums und der Pro-

duktion beobachtet worden, dennoch scheint ein Einsatz im Bioreaktor aufgrund der dort vollkommen unterschiedlichen Bedingungen vielversprechend.

Durch den Zusatz von 10 % (v/v) Hostinert zum Medium kann der Gelöstsauerstoffgehalt ebenfalls auf hohem Niveau von 50 % gehalten werden, während die Begasung wie bei PFC2 mit 20 % (v/v) Hostinert nur auf 0,75 vvm eingestellt werden muß (Abbildung 4-29). Wie schon bei PFC2 zu sehen, ist der Bereich, in dem sich der  $pO_2$ -Wert bis zur Mitte der Kultivierung bewegt, relativ breit. Dies kann auf die unterschiedlichen Phasen und die darin enthaltenen, unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen zurückgeführt werden. Trotz des hohen Gelöstsauerstoffgehaltes im Medium ist wie bei PFC2 ein Maximum des RQ nach 120 h zu erkennen, wobei der Wert über 1,0 liegt. Auch bei dieser Kultivierung muß die Rührergeschwindigkeit im Laufe der Zeit auf 500 rpm erhöht werden.



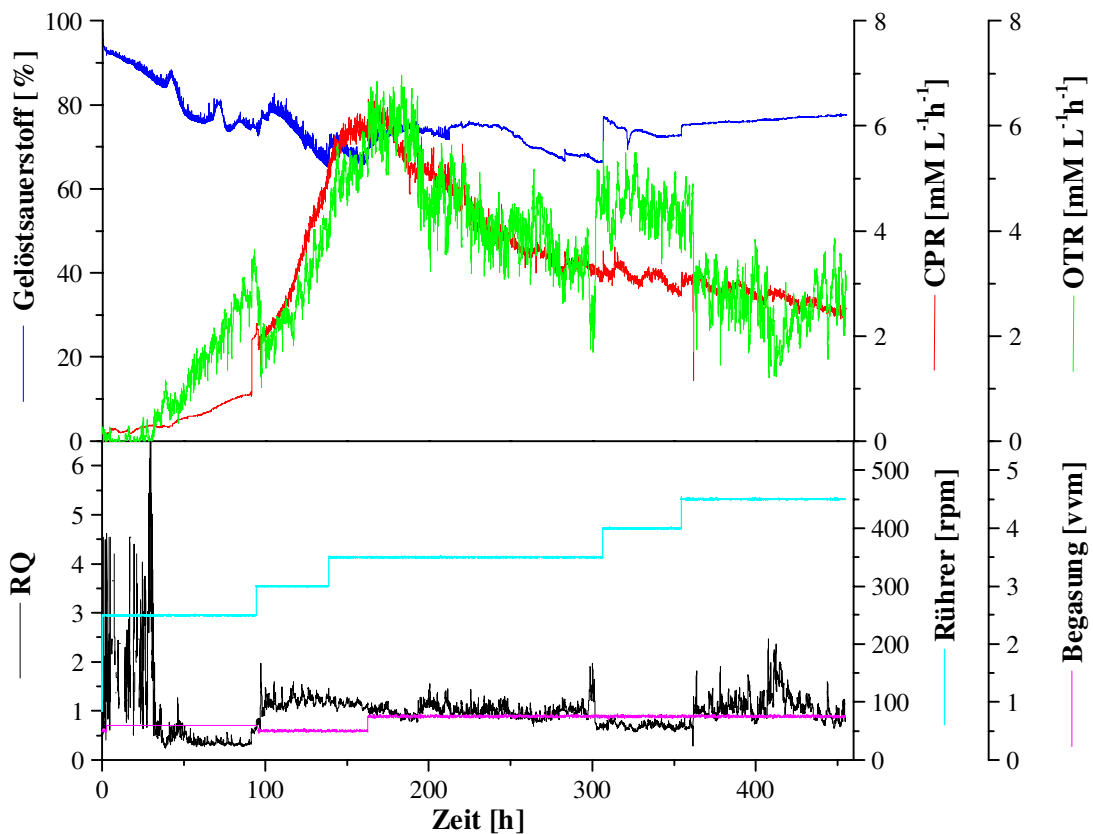
**Abbildung 4-29.**

Vergleich der Parameter  $pO_2$ , CPR, OTR, RQ und die eingestellten Begasungsraten und Rührerdrehzahlen bei der Kultivierung mit 10 % (v/v) Hostinert (PFC3).

Da die Verläufe der off-line ermittelten Daten denen von PFC2 ähneln, werden die einzelnen Parameter wie Biomassekonzentration etc. später für alle Kultivierungen mit Hostinert-Zusatz vergleichend dargestellt.

Zunächst wird daher die vierte Fermentation unter Zugabe von 40 % (v/v) Hostinert vorgestellt. In dieser Fermentation (PFC4) soll überprüft werden, ob diese größere Hostinert-Konzentration zu einer ausreichenden Sauerstoffversorgung führt, so daß keine anaeroben Zustände vorliegen.

Wie bei den bisher vorgestellten Fermentationen mit geringeren PFC-Konzentrationen, reicht eine Begasung von 0,75 vvm aus, um einen Gelöstsauerstoffwert oberhalb 50 % und in dieser Kultivierung sogar über 60 % einzustellen (Abbildung 4-30).



**Abbildung 4-30.**

Vergleich der Parameter  $pO_2$ , CPR, OTR, RQ und die eingestellten Begasungsraten und Rührerdrehzahlen bei der Kultivierung mit 40 % (v/v) Hostinert (PFC4).

Bedingt durch eine defekte Abgasanalytik zu Beginn der Fermentation sind RQ-Werte über 1,0 vorhanden. Der RQ fällt jedoch nach dem Beheben des Fehlers wieder ab. Dennoch tritt auch bei dieser Fermentation nach ca. 120 h ein erhöhter RQ von über 1,0 auf, was ebenfalls auf anaerobe Zustände hinweist. Der Grund hierfür ist wie schon bei den anderen Kultivierungen schwer erklärbar. Da aufgrund des Gelöstsauerstoffgehaltes davon auszugehen ist, daß in dem 2-Phasen-System eine hohe Sauerstoffkonzentration vorhanden ist, kann der Sauerstoff von den Zellen nicht vollständig aufgenommen werden. Somit scheint eine Limitierung des Sauerstofftransfers vorzuliegen. Dabei können die verschiedenen Phasenübergänge des Sauerstoffs die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sein. Dies kann zum einen der Über-

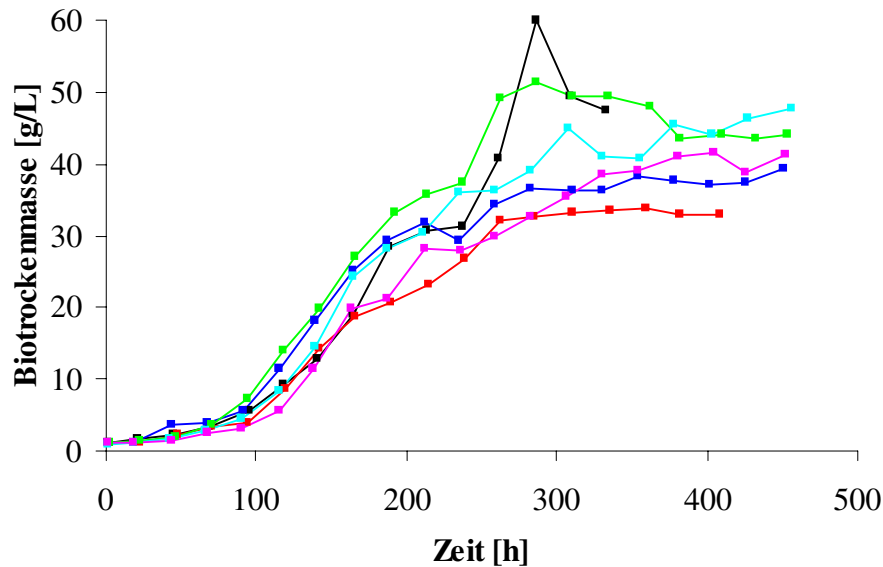
gang Medium/Zelle, PFC/Zelle oder PFC/Medium sein. Bei einem langsamen Übergang Gas/PFC dürfte kein hoher Sauerstoffgehalt im System zu finden sein. Da jedoch ein hoher Gelöstsauerstoffgehalt in dem 2-Phasen-System vorliegt, scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Phasenübergang Medium/Zelle zu liegen. Es wäre allerdings auch möglich, daß der Sauerstofftransport aus der PFC- zur wäßrigen Phase langsam verläuft, was mit einer hier verwendeten  $pO_2$ -Elektrode nicht nachweisbar ist. Der langsame oder schlechte Sauerstofftransport zu den Zellen scheint daher für die kurzzeitigen anaeroben Zustände verantwortlich zu sein. Dies kann auch an der Struktur des dichten Mycels liegen, wodurch die Diffusion des Sauerstoffs ins Zellinnere erschwert ist.

Die genauen Mechanismen des Phasenübergangs in Kultivierungen mit PFC-Zusatz sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Ein Faktor stellt die Blasengröße der PFC-Phase dar, so daß mit kleinerem Blasenvolumen der Phasenübergang größer wird. Um möglichst kleine Blasen zu erhalten und gleichzeitig für eine gleichmäßige Durchmischung der beiden Phasen zu sorgen, sind die Rührerdrehzahlen im Lauf der Kultivierungen kontinuierlich erhöht worden. Ob dies zu dem gewünschten Erfolg geführt hat, ist schwer abschätzbar, da der Gelöstsauerstoff nur an einem Ort des Reaktors gemessen werden kann. Somit können keine Aussagen über den Sauerstoffgehalt in den oberen Bereichen des Mediums getroffen werden. Nur durch erhöhte Rührergeschwindigkeiten lassen sich bei steigender Zellmasse die beiden Phasen ausreichend miteinander mischen, da sich ansonsten der perfluorierte Kohlenwasserstoff aufgrund seines höheren Gewichtes am Reaktorboden absetzen würde. Es könnte daher mit steigender Zellmasse und erhöhter Viskosität des Mediums zu einem geringeren PFC-Anteil im oberen Reaktorbereich und damit zu einem niedrigeren Sauerstoffanteil führen. Zum Zeitpunkt der auftretenden Sauerstofflimitierung ist jedoch die Zellmasse noch nicht sehr hoch, so daß die Schwierigkeiten der gleichmäßigen Verteilung beider Phasen nicht gegeben ist.

Um Aussagen über den Phasentransport treffen zu können, müßte der Sauerstoffgehalt sowohl in der wäßrigen als auch in der organischen Phase bestimmt werden. Dies ist jedoch kaum realisierbar. JUNKER ET AL. [1989] lieferten erste Ansätze zur Messung des Transports durch den Einsatz von faseroptischen Methoden und Fluoreszenzfarbstoffen. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reaktorsystem ist die Messung des Gelöstsauerstoffs allerdings nur mit einer Elektrode möglich gewesen.

Wie sich die unterschiedlichen Hostinert-Konzentrationen auf das Wachstum und die Produktbildung ausgewirkt haben, kann aus den nachfolgenden Graphiken entnommen werden, in denen die verschiedenen Parameter der PFC-Kultivierungen vergleichend dargestellt sind. Die Verläufe der Biotrockenmassen zeigen für jede Fermentation den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach ca. 100 h. Anschließend steigen die Werte unterschiedlich an, bleiben jedoch nach spätestens 300 h auf einem relativ konstanten Niveau. Dabei liegen die maximalen Biomassen der PFC-Kultivierungen zwischen den beiden Referenzkultivierungen

(59,9 bzw. 33,7 g/L). Die Werte der beiden Kultivierungen mit 20 % PFC sind mit 39,4 (PFC1) und 51,2 g/L (PFC2) sehr unterschiedlich. Zwischen diesen beiden Werten reihen sich die maximalen Biomassen von PFC3 (47,7 g/L) und PFC4 (41,7 g/L) ein, ohne daß eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich des eingesetzten Hostinerts erkennbar ist. Auch die hier nicht präsentierten Proteinkonzentrationen der vier PFC-Fermentationen zeigen keine konzentrationsabhängige Tendenz und liegen mit Werten zwischen 7,2 bis 10,4 g/L im Bereich der Referenzen.



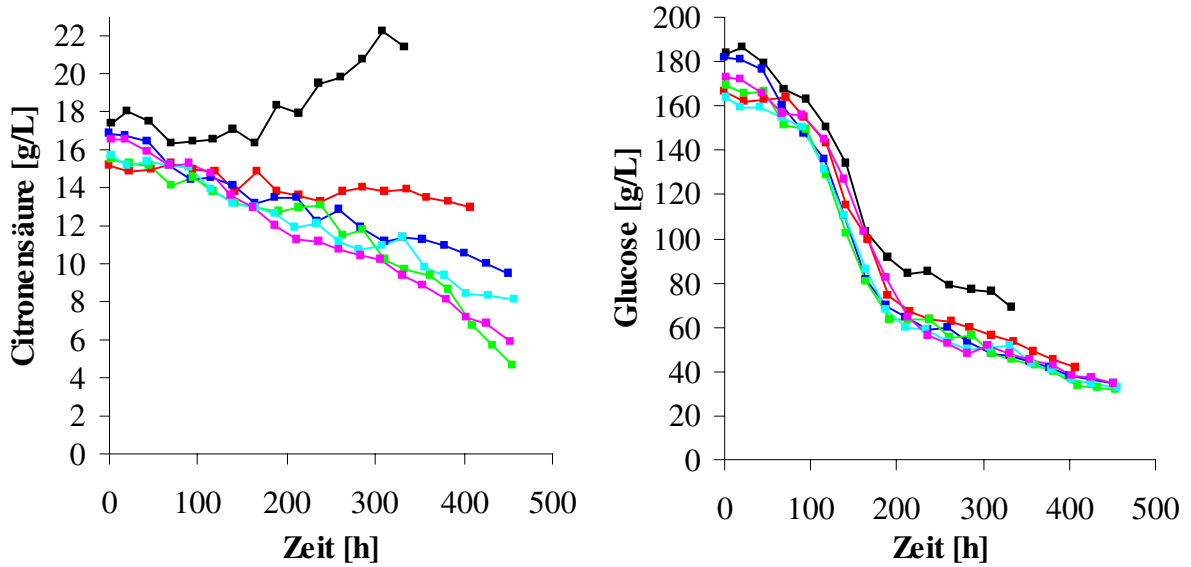
**Abbildung 4-31.**

Vergleich der Biomassegehalte der Kultivierungen mit Zusatz von Hostinert und den Referenzkultivierungen.

—■— R1, —■— R2, —■— PFC1, —■— PFC2, —■— PFC3, —■— PFC4.

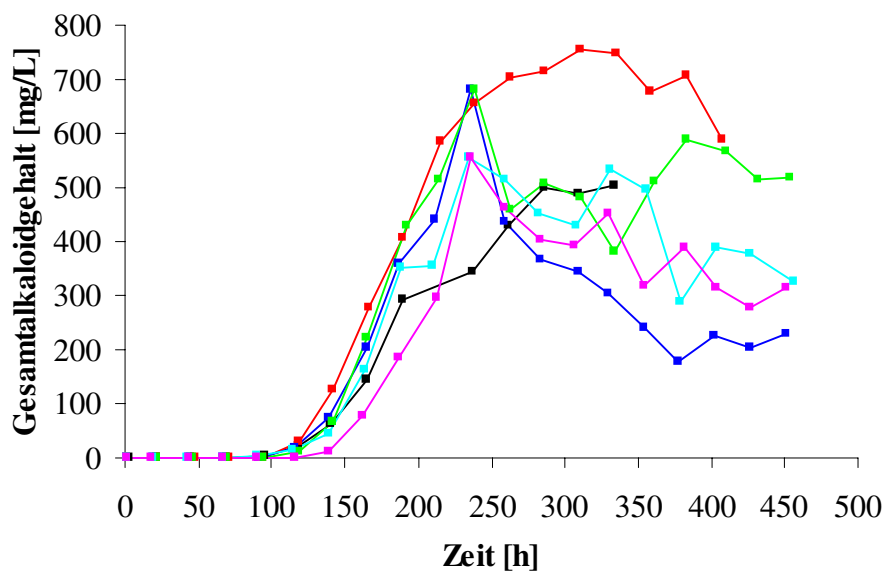
Bei allen Kultivierungen ist der Übergang vom hyphenartigen zum sklerotia-ähnlichen Stadium erkennbar, so daß sich bezüglich dieses Kriteriums keine Unterschiede zeigen.

Die Konzentrationen der Glucose und der Citronensäure sind in der nachfolgenden Graphik dargestellt. Während bei den Glucosekonzentrationen zwischen den Kultivierungen mit Hostinert und den Referenzen kaum Unterschiede erkennbar sind, ist bei dem Kurvenverlauf der Citronensäure deutlich zu sehen, daß diese mit Hostinert-Zusatz stärker verstoffwechselt wird (zwischen 7,4-10,9 g/L) als bei den Referenzen (R2: 2,2 g/L). Allerdings sind die dabei auftretenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Hostinert-Kultivierungen nicht den verschiedenen PFC-Konzentrationen zuzuweisen.



**Abbildung 4-32.** Citronensäure- und Glucose-Konzentrationen der Kultivierungen mit Hostinert und der Referenzfermentationen. —■ R1, —■ R2, —■ PFC1, —■ PFC2, —■ PFC3, —■ PFC4.

Ob und inwieweit sich diese erhöhte Citronensäureaufnahme auf die Produktbildung auswirkt, kann den in Abbildung 4-33 gezeigten Gesamtalkaloidverläufen entnommen werden. Wie schon bei der Kultivierung PFC2 beschrieben, tritt auch bei allen anderen Kultivierungen mit Hostinert-Zusatz nach 10 Tagen ein Maximum in der Konzentration auf, wobei anschließend die Konzentrationen teilweise sehr schnell wieder abnehmen. Dabei werden in PFC1 und PFC2 jeweils 681 mg/L und in PFC3 und PFC4 genau 554 mg/L Alkaloide produziert. Diese Werte sind im Vergleich zu Referenz 1 um 35 bzw. 10 % erhöht, liegen jedoch um 26 bzw. 10 % unterhalb der maximalen Konzentration von Referenz 2.



**Abbildung 4-33.** Gesamtalkaloidkonzentrationen der Kultivierungen mit Hostinert-Zugabe und der Referenzfermentationen. —■ R1, —■ R2, —■ PFC1, —■ PFC2, —■ PFC3, —■ PFC4.

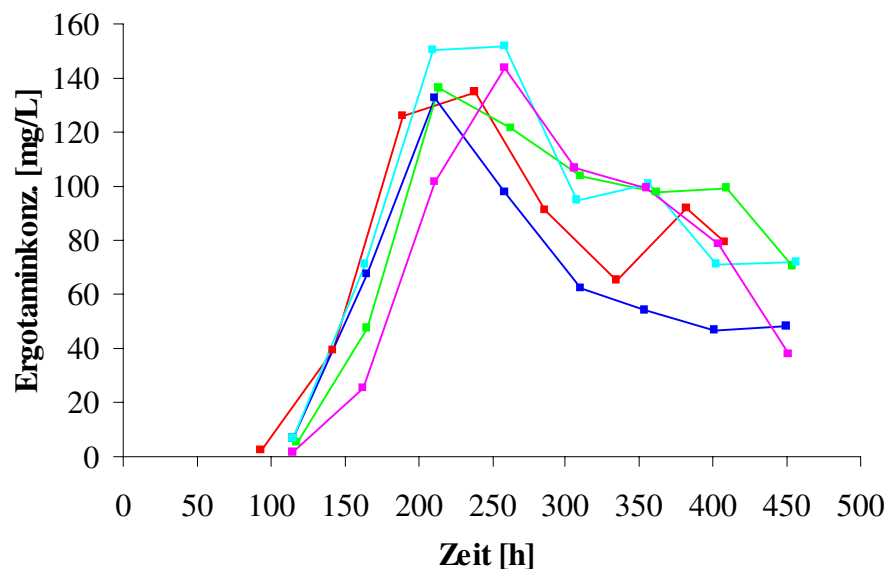


Aus den erhaltenen Daten läßt sich eine Reproduzierbarkeit der Alkaloidproduktion bei einer Hostinert-Konzentration von 20 % (v/v) erkennen, ebenso wie der Zeitpunkt der maximalen Alkaloidproduktion (240 h).

Die starke Abnahme der Alkaloide im Medium und die zeitgleich einsetzende dunkle Verfärbung des Mediums läßt auf eine mögliche Änderung des Stoffwechsels schließen. Eventuell werden dabei die gebildeten Produkte von dem Organismus selber wieder abgebaut. Aufgrund der Voruntersuchungen zur Löslichkeit der Alkaloide in Hostinert kann ein möglicher Übergang der Produkte in die organische Phase ausgeschlossen werden, so daß eine Metabolisierung durch degradierende Enzyme wahrscheinlich ist.

In der Literatur sind einige Beispiele bekannt, wonach die Produkte nach Erreichen ihrer maximalen Konzentration von zelleigenen Enzymen abgebaut werden [REHACEK UND SAJDL, 1990]. Über Einzelheiten oder Faktoren, die einen Abbau auslösen, ist bisher nichts bekannt. Da die Referenzkultur einen höheren Alkaloidgehalt aufweist, dort aber keine starke Abnahme zu verzeichnen ist, wird der Abbau vermutlich nicht durch eine bestimmte Alkaloidkonzentration im Medium hervorgerufen. Des weiteren ist zum Zeitpunkt des Alkaloidmaximums bzw. unmittelbar danach in keiner Kultivierung eine Abnahme der Biomasse in Folge einsetzender Zell-Lyse zu beobachten, so daß die starke Verringerung der Alkaloidkonzentration nicht aufgrund absterbender Zellmasse erfolgt.

Ein Vergleich der Gesamtalkaloidmengen mit den in Abbildung 4-34 aufgeführten Ergotaminkonzentrationen zeigt, daß entsprechend den oben gemachten Beobachtungen diese Konzentrationen ebenfalls ein Maximum durchlaufen und anschließend stark zurückgehen.



**Abbildung 4-34.**

Ergotaminkonzentrationen der Kultivierungen mit Hostinert-Zugabe und R2.

—■— R2, —■— PFC1, —■— PFC2, —■— PFC3, —■— PFC4.

Diese Maxima treten nahezu zeitgleich mit denen des Gesamtalkaloidgehaltes zwischen 220-260 h auf. Interessant dabei ist, daß auch die Ergotaminkonzentration in der Referenzkultivierung R2 einen maximalen Wert erreicht und anschließend stark absinkt, wohingegen die Konzentration der gesamten Alkaloide weiter ansteigt. Demzufolge werden ab der 260. Stunde keine Ergopeptine, sondern möglicherweise niedrigere Lysergsäurederivate oder Clavinalkaloide gebildet, die den Gesamtalkaloidgehalt weiter ansteigen lassen.

Um die einzelnen Kultivierungen hinsichtlich ihrer Produktausbeute miteinander vergleichen zu können, sind in der nachfolgenden Tabelle die maximalen Konzentrationen der Produkte aufgeführt. Zusätzlich sind die Anteile der beiden Produkte Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin an der Gesamtalkaloidkonzentration für die Zeitpunkte berechnet worden, als die höchste Konzentration des jeweiligen Stoffes im Medium vorlag. Diese entsprechen nicht immer den Zeitpunkten der maximalen Gesamtalkaloidkonzentrationen im Medium. Des Weiteren sind die Ausbeuten, sowohl bezogen auf den Gesamtalkaloidgehalt als auch auf die Ergotaminkonzentration dargestellt. Diese sind ebenfalls zum Zeitpunkt der maximalen Produktkonzentrationen (Gesamtalkaloidkonzentration bzw. Ergotaminkonzentration) berechnet worden, wobei in vielen Fällen die Biomasse noch nicht ihr Maximum erreicht hat.

**Tabelle 4-7.**

Übersicht der Ausbeuten und Produktivitäten der verschiedenen Kultivierungen mit Hostinert-Zusatz und der beiden Referenzfermentationen.

<b>Parameter</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>PFC1</b>	<b>PFC2</b>	<b>PFC3</b>	<b>PFC4</b>
Hostinert 216-Konzentration [% (v/v)]	-	-	20	20	10	40
Max. Gesamtalkaloidkonz. [mg/L]	504	754	681	681	554	554
Max. Ergotaminkonz. [mg/L]	52,5	134,9	132,8	136,4	152,1	143,8
Max. $\alpha$ -Ergokryptinkonz. [mg/L]	12,1	14,0	11,0	13,9	21,5	25,1
Anteil Ergotamin am Gesamtalkaloidgehalt [%]	10,5	20,5	30,0	26,5	29,4	31,0
Anteil $\alpha$ -Ergokryptin am Gesamtalkaloidgehalt [%]	2,4	2,1	2,5	2,7	4,3	5,4
Alkaloidausbeute [mg Alkaloid/g BTM]	10,6	22,6	23,4	18,3	15,5	19,9
Ergotaminausbeute [mg Ergotamin/g BTM]	0,9	5,0	4,3	3,8	4,2	4,8
Max. Produktivität [mg/L·h]	1,8	2,8	2,9	2,9	2,4	2,4

Wie schon aus Abbildung 4-33 hervorgegangen ist, liegen die höchsten Gesamtalkaloidkonzentrationen bei R2, die niedrigsten in der Referenz 1 vor. Daher ist auch die Alkaloidausbeute zum Zeitpunkt der höchsten Gesamtalkaloidkonzentration bei R1 mit 11 mg/g BTM deutlich geringer als bei allen anderen Fermentationen. In der Kultivierung PFC1 ist eine etwas höhere Ausbeute vorhanden als bei Referenz 2, in allen anderen PFC-Kultivierungen liegen die Ausbeuten zum Teil wesentlich niedriger.

Der Vergleich der maximalen Produktkonzentrationen macht deutlich, daß die Referenzkultivierung R2 zwar den größten Gesamtalkaloidgehalt aufweist, die Konzentrationen der Hauptprodukte, der Ergopeptine, jedoch nicht höher als bei den Kultivierungen mit Hostinert-Zusatz sind.

Die Ergotaminkonzentration von 135 mg/L in R2 befindet sich im Bereich der Kultivierungen PFC1 und PFC2, die mit 133 bzw. 136 mg/L wie beim Gesamtalkaloidgehalt gleiche Ergebnisse aufweisen. Die Zugabe von 10 % (v/v) Hostinert führt zu einer Ergotaminkonzentration von 152 mg/L, die im Vergleich zur Referenz 2 um 13 % höher liegt. Ein um 7 % erhöhter Ergotamingehalt von 144 mg/L ist in der Kultivierung PFC4 vorhanden. Dadurch nimmt der Anteil an Ergotamin am Gesamtalkaloidgehalt auch bei den Kultivierungen mit Hostinert im Gegensatz zu den beiden Referenzen deutlich zu, wobei prozentuale Anteile zwischen 27-31 % zu finden sind. In den Referenzkultivierungen liegt der Ergotaminanteil dagegen nur bei 11 bzw. 21 %, so daß vor allem in R2 viele Zwischenprodukte wie Lysergsäurederivate etc. anstelle des wichtigen Hauptproduktes Ergotamin produziert werden.

Ähnliche Unterschiede treten auch bei den Konzentrationen von  $\alpha$ -Ergokryptin auf. Während in beiden Referenzen und in den Kultivierungen mit 20 % (v/v) Hostinert zwischen 11 bis 14 mg/L  $\alpha$ -Ergokryptin gebildet werden, sind in den Fermentationen PFC3 und PFC4 22 bzw. 25 mg/L vorhanden, was eine Steigerung gegenüber der Referenz 2 um 54 bzw. 79 % darstellt. Somit liegen auch bei diesen beiden Kultivierungen die Anteile dieses Produktes am Gesamtalkaloidgehalt teilweise über das Doppelte höher im Vergleich zu den anderen vier Ansätzen.

Sowohl die Erhöhung des Ergotamin- als auch des  $\alpha$ -Ergokryptin-Anteils zeigen jedoch keine Abhängigkeit von der Hostinert-Konzentration auf, die dem Medium zugesetzt worden ist.

Trotz des erhöhten Ergotamingehaltes in den Fermentationen mit Hostinert, liegt die auf das Hauptprodukt bezogene Ausbeute aller vier Ansätze unterhalb der von R2. Dies ist durch das etwas langsamere Ansteigen der Biomasse bei R2 im ersten Abschnitt des exponentiellen Wachstums zu erklären.

Die maximalen Produktivitäten der Kultivierungen mit 20 % (v/v) Hostinert liegen mit 2,9 mg/L·h über der von R2 (2,8 mg/L·h), die der anderen beiden PFC-Kultivierungen mit 2,4 mg/L·h leicht darunter. Die Produktivität der Referenz 1 besitzt mit 1,8 mg/L·h den mit Abstand geringsten Wert.

Es wird deutlich, daß der entscheidende Faktor, die Konzentration des pharmazeutisch interessanten Ergotalkaloids Ergotamin, durch die Zugabe von Hostinert zu *Claviceps purpurea*

Kultivierungen gesteigert werden kann. Außerdem ergeben sich reproduzierbare Ergebnisse, wie sie in den beiden Referenzkultivierungen nicht zu finden sind.

MILICIC ET AL. [1989] führten in einem 7L-Rührreaktor Kultivierungen mit einem *Claviceps purpurea* Stamm durch und untersuchten die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme von der Begasungsrate und die Auswirkungen auf die Produktbildungen. Dabei konnten sie zeigen, daß die Sauerstoffaufnahme bei der höchsten Begasungsrate von 2,5 vvm zwar maximal war, die höchste Alkaloidkonzentration jedoch bei einer Rate von 1,5 vvm erhalten wurde. Gleichzeitig fanden sie heraus, daß sich die Zusammensetzung der am Gesamtalkaloidgehalt beteiligten Alkaloide in Abhängigkeit von den verschiedenen Sauerstoffaufnahme-raten änderten. So stieg der Anteil an Ergocornin, Ergotamin und Ergometrin mit steigender Begasungsrate, während Ergokryptin, das den größten Anteil am Gesamtalkaloidgehalt darstellte, abnahm.

Diese Daten lassen sich zwar nur bedingt mit denen in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen vergleichen, jedoch zeigen auch sie Verschiebungen der Produktzusammensetzungen bei Änderungen der Begasungsbedingungen auf. Die Ergebnisse sind schwer vergleichbar, da die Autoren bei ihren Untersuchungen nicht die Begasung an sich, sondern das Flüssigkeitsvolumen im Reaktor geändert haben. Dies führte zu unterschiedlichen Bedingungen im Medium, da die für den Sauerstoffeintrag entscheidenden Faktoren wie Reaktorgeometrie, die Flüssigkeitsmenge und damit auch das Verhältnis Volumen zu Oberfläche unterschiedlich waren. In der vorliegenden Arbeit ist immer in einem Flüssigkeitsvolumen von 2 Litern gearbeitet worden, so daß je nach Hostinert-Konzentration unterschiedliche Mediumvolumina vorlagen.

Ein Vergleich der Sauerstoffaufnahme-raten der vier Hostinert-Kultivierungen wie bei den Kultivierungen von MILICIC ET AL. [1989] ist schwierig. Es zeigt sich, daß mit höherem Anteil an Hostinert ein geringerer OTR-Wert vorliegt. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, daß die tatsächliche O<sub>2</sub>-Aufnahme der Zellen bei höherem PFC-Anteil geringer ist. Da der OTR-Wert aus den Daten der Zu- und Abluft berechnet wird, bleibt die sehr gute Löslichkeit des Sauerstoffs in der Hostinert-Phase unberücksichtigt. Bei erhöhtem Hostinert-Volumen steigt auch der Anteil des gelösten Sauerstoffs, der im Medium bleibt und nicht durch die Abluft meßbar ist, was zur Verringerung des OTR-Wertes führen kann.

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Kultivierungen eines *Claviceps purpurea* Stammes in einem Rührkesselreaktor unter Zusatz eines perfluorierten Kohlenwasserstoffs zeigen, daß dadurch die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium gesteigert werden kann. Dabei werden im Vergleich zu normalen Kultivierungen weitaus geringere Begasungsraten benötigt, wodurch sich die Handhabung des Systems vereinfacht, da eine Überdruckbildung oder ein Übersäumen des Mediums verhindert wird. Zwar kann die Gesamtalkaloidkonzentration im 2-Phasen-System die der sehr guten Referenzkultivierung R2 nicht übertreffen, jedoch können die Konzentrationen des Hauptproduktes Ergotamin deutlich gesteigert werden.

Im Gegensatz zu den von MERKEL [1996] durchgeführten abgasfreien Fermentationen mit *Claviceps purpurea* und Hostinert in einer Fermentationsanlage, in der der sauerstoffgesättigte perfluorierte Kohlenwasserstoff von oben auf das Medium getropft wird, können im Rührkesselreaktor hohe Alkaloidausbeuten erhalten werden. In den von MERKEL durchgeführten Fermentationen ist keine morphologische Umwandlung des Pilzes und somit keine Alkaloidproduktion beobachtet worden.

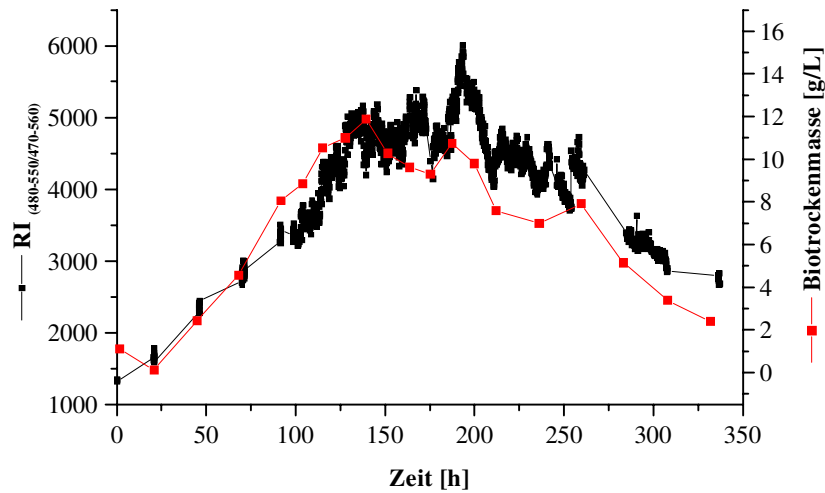
Bei allen Kultivierungen mit Hostinert-Zugabe liegen nach zehn Tagen die höchsten Gesamtalkaloidkonzentrationen im Medium vor, während bei den Referenzkultivierungen diese erst Tage später erreicht werden. Allerdings sind bei den Referenzkultivierungen ebenfalls Maxima in der Ergotaminkonzentration vorhanden, die zum selben Zeitpunkt wie bei den PFC-Kultivierungen auftreten. Dabei ist es jedoch sehr schwierig, anhand der üblichen Produktbestimmung diese Maxima schnell zu detektieren. Eine genaue zeitliche Bestimmung des Produktmaximums ist jedoch für Industrieprozesse äußerst wichtig, um Kosten zu senken. Daher wäre ein prozeßintegriertes Analysensystem von Vorteil, daß on-line und in time die Produktkonzentration ermitteln kann. Für diese Problemstellung bietet sich die Zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie an, wobei die Eigenfluoreszenz der Produkte gemessen und darüber Aussagen über den Produktionsverlauf getroffen werden können. Dabei sollten kleinste Änderungen sofort detektierbar sein, ohne aufwendige Extraktion der Kultivierungsproben und zeitaufwendige Bestimmung mittels HPLC. Daher wird während der Kultivierungen im Bioreaktor die Zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt, deren Ergebnisse im nächsten Kapitel vorgestellt werden.

#### **4.7 Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie**

Während der Kultivierungen von *Claviceps purpurea* verändert sich die Zusammensetzung des Mediums durch von den Mikroorganismen produzierten und aus den Zellen ausgeschleusten Substanzen. Neben den Ergotalkaloiden werden weitere fluoreszierende Stoffe gebildet wie beispielsweise Proteine, die aromatische Aminosäuren beinhalten. Daher unterscheiden sich die 2D-Fluoreszenzspektren der Kulturbrühe von denen der reinen Ergotalkaloidlösung durch weitere Fluoreszenzbereiche. Aus den ermittelten Fluoreszenzbereichen werden Wellenlängenpaare ausgewählt, deren relative Fluoreszenzintensitäten mit den verschiedenen offline ermittelten Parametern korreliert werden sollen.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit MAROSE [1999] und BOEHL [1999] durchgeführt. In dieser Arbeit werden daher nur die grundlegenden Ergebnisse an einzelnen Beispielen kurz erläutert. Ausführliche Betrachtungen und Diskussionen sind bei MAROSE [1999] zu finden, weiterführende Untersuchungen und Modellierungen werden derzeit von BOEHL [1999] durchgeführt.

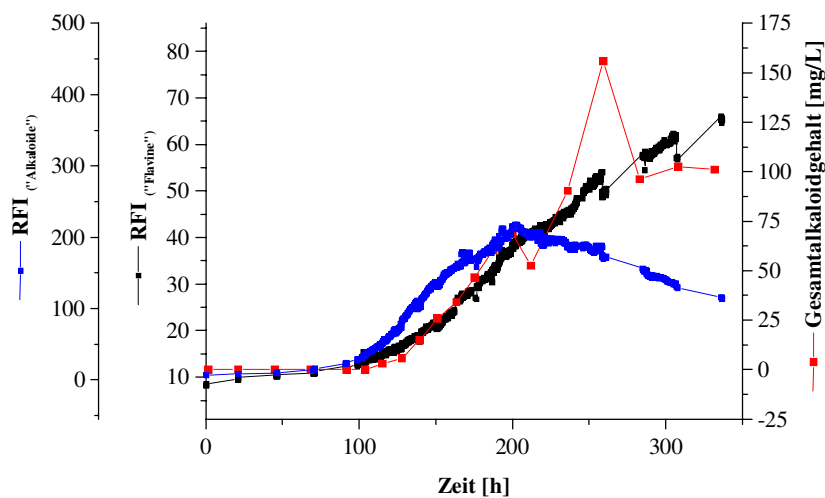
MAROSE [1999] zeigte für die Kultivierung F2 die gute Korrelation zwischen der RFI des Bereiches „Streulicht“ (Ex: 480-550/Em: 470-560 nm) und der Biotrockenmasse über den gesamten Kultivierungszeitraum (Abb. 4-35).



**Abbildung 4-35.**

Korrelation der on-line-Intensität im Bereich „Streulicht“ mit der Biotrockenmasse bei der Kultivierung F2 [MAROSE, 1999].

Die Streulichtintensität nimmt während des Zellwachstums zu und fällt bedingt durch das Austragen der Zellen aus dem Medium gleichzeitig mit der Biomassekonzentration ab. Während im Bereich „Flavine“ der Wellenlängenpaare (Ex. 430-440/Em. 500-540 nm) eine gute Korrelation zwischen der RFI und dem Gesamtalkaloidgehalt über den gesamten Zeitraum festzustellen ist, wird für den Bereich „Alkaloide“ (Ex. 310-360/Em. 400-510 nm) nur bis zur 200. Stunde eine Korrelation erhalten. In Abbildung 4-36 sind beide RFI-Bereiche den offline ermittelten Gesamtalkaloidgehalten gegenübergestellt. Die RFI im Bereich „Flavine“ steigt ab etwa 120 h linear mit dem Alkaloidgehalt an und nimmt mit diesem weiter zu. Im Gegensatz dazu nimmt die RFI im Bereich „Alkaloide“ nach ungefähr 200 h ab.



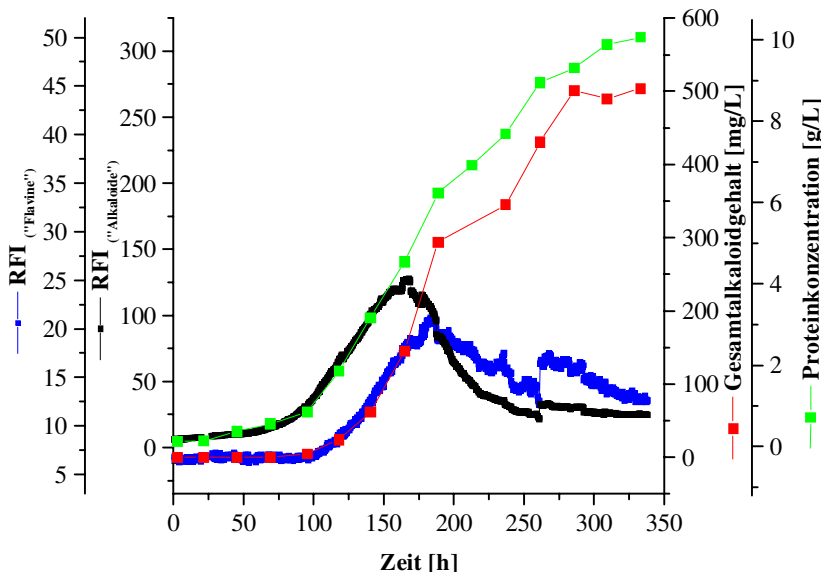
**Abbildung 4-36.**

Korrelation der RFI im Bereich „Flavine“ und „Alkaloide“ mit den offline ermittelten Gesamtalkaloidgehalten für F2 [MAROSE, 1999].

Bis zu diesem Zeitraum läßt sich der Gesamtalkaloidgehalt mit der RFI des Alkaloidbereiches durch ein Polynom 2. Grades beschreiben. Es wäre allerdings eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Alkaloidkonzentration zu erwarten gewesen, so daß diese Ergebnisse auf eine Überschreitung des Fluoreszenzsättigungsbereiches hinweisen.

Die in der Kultivierung F2 erzielten Biotrockenmassen und Gesamtalkaloidgehalte sind gegenüber Kultivierungen mit Antischaummittelzusatz äußerst gering (vgl. Kapitel 4.6.2).

Es zeigt sich bei Kultivierungen, in denen höhere Produkt- und Zellkonzentrationen zu finden sind, daß die Fluoreszenzintensitäten der ausgewählten Bereiche nach ca. 160 h ein Maximum durchlaufen und wieder abfallen. In Abbildung 4-37 sind zum Vergleich ausgewählte RFI-Verläufe der off-line ermittelten Parameter der Referenzkultivierung R1 dargestellt. Bis zum Erreichen eines Maximums lassen sich der Proteingehalt mit der RFI des Bereiches „Alkaloide“ und der Gesamtalkaloidgehalt mit der RFI „Flavine“ korrelieren. Die hier nicht gezeigte Biomasse kann ebenfalls bis zur 200. Stunde mit der Streulichtintensität beschrieben werden. Die Alkaloidkonzentration läßt sich bei dieser Kultivierung ebenfalls besser mit den Fluoreszenzintensitäten im Bereich der „Flavine“ korrelieren als mit dem Verlauf der RFI im Bereich „Alkaloide“. Der frühere Anstieg der RFI („Alkaloide“) im Vergleich zu den off-line Daten könnte durch intrazelluläre Alkaloide verursacht werden, die zu dem Zeitpunkt noch nicht in das Medium ausgeschleust worden sind, so daß sie off-line nicht detektiert werden.



**Abbildung 4-37.**

Darstellung der on-line Fluoreszenzintensitäten der Bereiche „Flavine“ und „Alkaloide“ und der off-line ermittelten Parameter Protein- und Gesamtalkaloidgehalt für die Referenzkultivierung R1 [MAROSE, 1999].

Als Gründe für den Abfall der Fluoreszenzintensitäten können demnach die bis auf das fünf-fach höhere Biotrockenmasse und der bis zum dreifachen gestiegene Alkaloidgehalt genannt werden. Die starke Zunahme der Biomasse kann sich negativ auf die Eindringtiefe des Anregungslichtes auswirken, erhöhte Alkaloidkonzentrationen können zu Quench-Effekten führen.

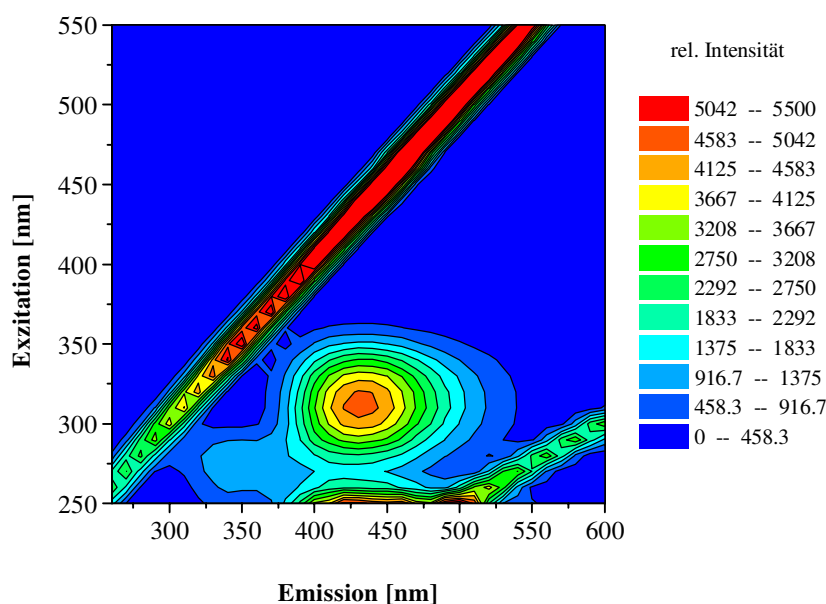
Auch die verstärkte Gelbfärbung des Mediums im Laufe der Kultivierung kann einen negativen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität ausüben. Bei anderen Kultivierungen, bei denen die Zellmasse und die Produktkonzentrationen ebenfalls wesentlich höher als bei F2 lagen, sind ähnliche Verläufe der Fluoreszenzintensitäten ermittelt worden, so daß sich der Prozeßverlauf aus den Fluoreszenzintensitäten einzelner Wellenlängenpaare on-line nur bis zur 200. Stunde verfolgen läßt.

#### 4.7.1 Off-line-Messung der 2D-Fluoreszenz an verdünnten Kultivierungsproben

Inwieweit die erhöhten Produktkonzentrationen zu Quench-Effekten führen können, wird anhand von off-line-Messungen an Kultivierungsüberständen untersucht. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten verdünnter Kultivierungsproben in einer Mikroküvette gemessen.

MAROSE [1999] zeigte, daß Verdünnungen des Kultivierungsüberstandes der Kultivierung R1 im Verhältnis 1:2 ähnliche RFI-Verläufe ergeben wie bei den on-line-Messungen. Verdünnungen von 1:200 bewirkten jedoch, daß ein Intensitätsmaximum bei kleinen Wellenlängen Ex 280/Em 340 nm (Proteinbereich) sichtbar wird. Die RFI-Verläufe zeigen bei diesen Verdünnungen kein Maximum, sondern steigen über den gesamten Zeitraum weiter an. Der Gesamtalkaloidgehalt läßt sich mit den gemessenen RFI des Bereiches „Flavine“ mit einem Polynom 2. Grades beschreiben. Demnach scheint auch bei einer Verdünnung von 1:200 ein Überschreiten des Fluoreszenzsättigungsbereiches vorzuliegen, so daß keine lineare Korrelation möglich ist. Die RFI im Bereich „Proteine“ (Ex: 270-290/Em 330-360 nm) lassen sich dagegen linear dem Proteingehalt im Medium zuordnen.

In Zusammenarbeit mit BOEHL [1999] sind Überstände anderer Kultivierungen 1:1000 verdünnt und 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden am Beispiel der Kultivierung mit Zugabe einer 10 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung (H3) präsentiert.



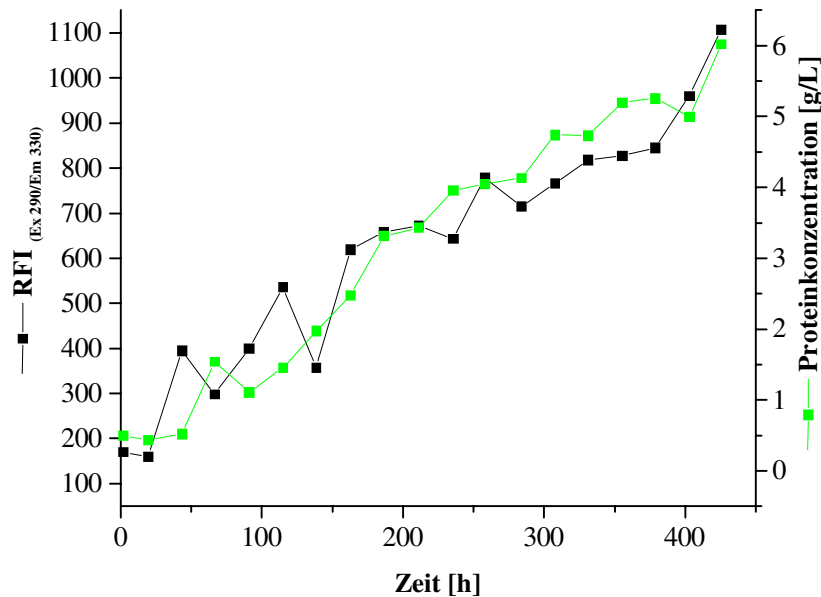
**Abbildung 4-38.**

Spektrum einer 1:1000 verdünnten Kultivierungsprobe der Kultivierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe (H3).



In Abbildung 4-38 ist ein Spektrum der 1:1000 verdünnten Kultivierungsprobe von H3 dargestellt. Neben dem Produktpeak läßt sich der den Proteinen zugeordnete Fluoreszenzbereich bei Ex. 280/Em. 350 nm erkennen.

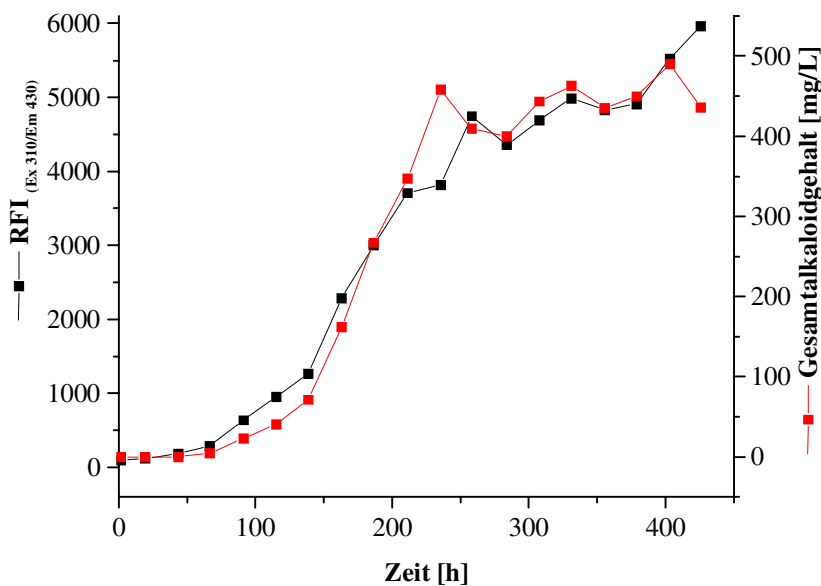
Der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz des Proteinbereiches ist in Abbildung 4-39 mit dem Proteingehalt für H3 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Fluoreszenzintensität dieses einen Wellenlängenpaares den Verlauf des extrazellulären Proteingehaltes gut beschreibt.



**Abbildung 4-39.**

Darstellung der RFI des Wellenlängenpaares Ex 290/Em 330 nm und des Proteingehaltes der off-line gemessenen Kulturüberstände von H3.

Im Gegensatz zu den oben vorgestellten Untersuchungen an den 1:200 verdünnten Kultivierungsüberständen von R1, kann bei den 1:1000 verdünnten Proben von H3 der Gesamtalkaloidgehalt mit der RFI im Bereich der Alkaloide bei Ex 310/Em 430 nm korreliert werden, was in Abbildung 4-40 dargestellt ist. Sowohl die RFI als auch der Gesamtalkaloidgehalt steigen nach ungefähr 80 h gleichzeitig linear an. Nach ca. 250 h sind keine großen Änderungen der RFI und der Konzentration erkennbar. Die Korrelation der Fluoreszenzintensitäten zum Gesamtalkaloidgehalt ist linear. Die Verdünnung des Mediums von 1:1000 verhindert demnach die Quench-Effekte, die in den Bereichen niedriger Wellenlängen bei den on-line-Messungen aufgetreten sind. Außerdem wird bei dieser Verdünnung der Sättigungsbereich der Fluoreszenz nicht überschritten, wie es bei Verdünnungen von 1:200 noch der Fall war.



**Abbildung 4-40.**

Off-line RFI-Verlauf des Wellenlängenpaares Ex 310/Em 430 nm und des Gesamtalkaloidgehaltes für H3.

Somit läßt sich mit Hilfe der Zweidimensionalen Fluoreszenz off-line der Alkaloidgehalt verfolgen, wobei die Messung im Vergleich zu dem üblicherweise angewendeten photometrischen van Urk-Test einfacher und schneller durchführbar ist.

#### 4.7.2 Anwendung einer multivariaten Regression

Für eine schnelle Prozeßkontrolle und –steuerung ist es wichtig, Informationen über den augenblicklichen Zustand einer Kultivierung zu erhalten. Nur so kann schnell und effektiv in das Prozeßgeschehen eingegriffen werden. Die Bestimmung des Verlaufes der Alkaloidproduktion durch off-line-Messung der Fluoreszenz von Kultivierungsproben hat zwar gegenüber den gängigen Testverfahren den Vorteil, daß innerhalb weniger Minuten ein Ergebnis vorhanden ist, doch ist diese Methode personalaufwendig. Eine on-line und in-time Analytik ist daher wünschenswert.

Zur Beurteilung des Prozeßverlaufs aus den gemessenen Fluoreszenzdaten wurden bisher nur bestimmte Bereiche ausgesucht und die Intensitätsverläufe mit denen der off-line Proben korreliert. Dabei wurden jedoch alle anderen Wellenlängenpaare, die ebenfalls detektiert wurden, nicht berücksichtigt.

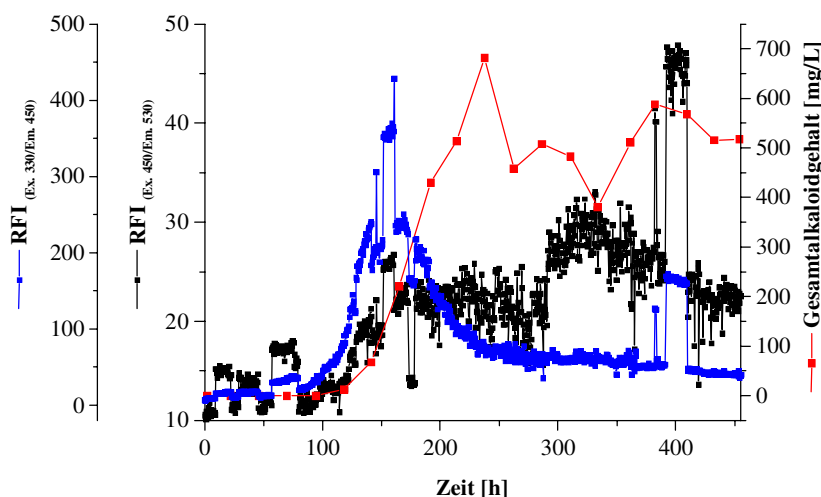
Mit Hilfe der multivariaten Modellierung soll daher ein Modell erstellt werden, daß aus den Fluoreszenzdaten des gesamten Spektrums die Verläufe der off-line Proben beschreibt. Für eine multivariate Modellierung stehen verschiedene Regressionsmethoden zur Verfügung. Eine Methode ist die sogenannte PLS (Partial Least Square), die in diesem Fall verwendet wird. Für ausführliche Beschreibungen über die multivariate Regression und die PLS sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen [OTTO, 1997].

Die PLS wird mit dem Programm „The Unscrambler<sup>®</sup> 7.5“ (Fa. Camo) durchgeführt. Mit der PLS wird ein Modell erstellt, für das 4 Hauptkomponenten verwendet wurden. Mit Hilfe die-

ses Modells wird dann eine Vorhersage für die off-line Daten getroffen, wofür wiederum 4 Hauptkomponenten benutzt werden. Diese Vorhersage wird dann mit den off-line ermittelten Werten verglichen.

Genauere Untersuchungen und Modellierungen der erhaltenen Fluoreszenzdaten werden zur Zeit von BOEHL [1999] durchgeführt. In dieser Arbeit werden daher erste Ergebnisse anhand des Beispiels der Kultivierung PFC3 präsentiert.

In Abbildung 4-41 ist exemplarisch die Fluoreszenzintensität im Alkaloid- und Flavinbereich vergleichend zu den off-line ermittelten Alkaloidgehalten aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, daß eine Beschreibung des Produktverlaufes anhand der RFI im Flavinbereich nur bis zur 160. Stunde möglich ist. Die Intensität nimmt anschließend ab, obwohl die Konzentration weiter ansteigt.



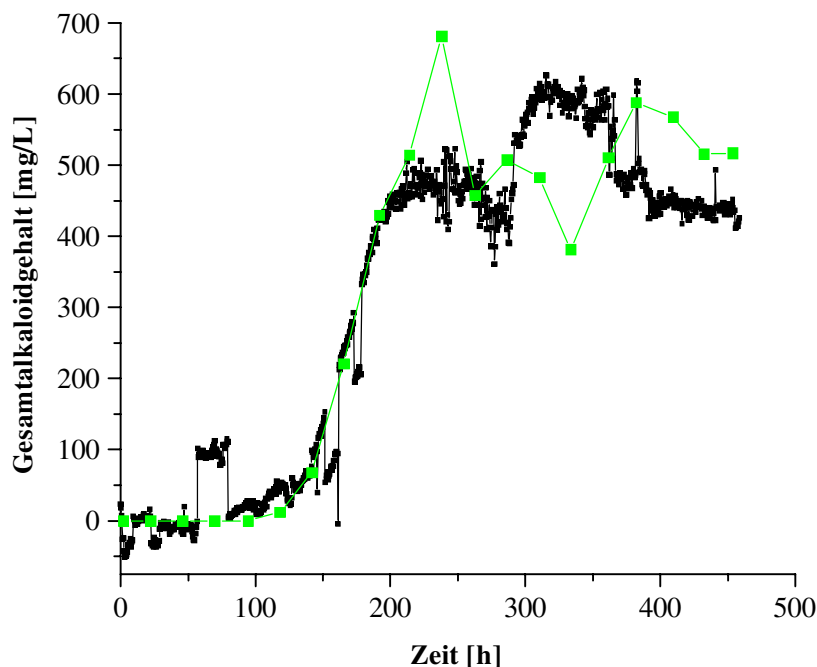
**Abbildung 4-41.**

Korrelation der on-line-Fluoreszenz im Bereich der Alkaloide und Flavine mit dem Gesamtalkaloidgehalt für PFC3.

Wie schon bei der Kultivierung R1 dargestellt wurde, nimmt auch in diesem Fall die Fluoreszenzintensität im Bereich der Alkaloide zu, bevor Alkaloide im Medium nachzuweisen sind. Weiterhin ist zu erkennen, daß zwischen der 60.-80., 130.-140. und 390.-410. Stunde sprunghafte Anstiege in der Fluoreszenz auftreten, deren Ursache in der fehlerhaften Messung des Fluoreszenzspektrometers liegt. Dadurch ist es in diesen Zeiträumen schwierig, die RFI mit den off-line Daten zu korrelieren und Aussagen über den momentanen Zustand der Kultivierung zu geben. Die Korrelationen mit dem Proteingehalt und der Biotrockenmasse zeigen ähnliche Verläufe.

Aus den erhaltenen on-line Daten ist eine Korrelation der Fluoreszenzintensitäten einzelner Wellenlängenpaare mit den verschiedenen Parametern und damit eine on-line Verfolgung des Prozesses nur bis zur 160. Stunde möglich. Im Gegensatz dazu können die aus dem aufgestellten Modell entwickelten Vorhersagen für die jeweiligen Parameter wesentlich genauere

Aussagen über den Zustand des Prozesses liefern. In Abbildung 4-42 ist der mit dem Photometertest ermittelte Gesamtalkaloidgehalt für die Kultivierung PFC3 und die aus der Vorhersage ermittelten Konzentrationen vergleichend dargestellt.



**Abbildung 4-42.**

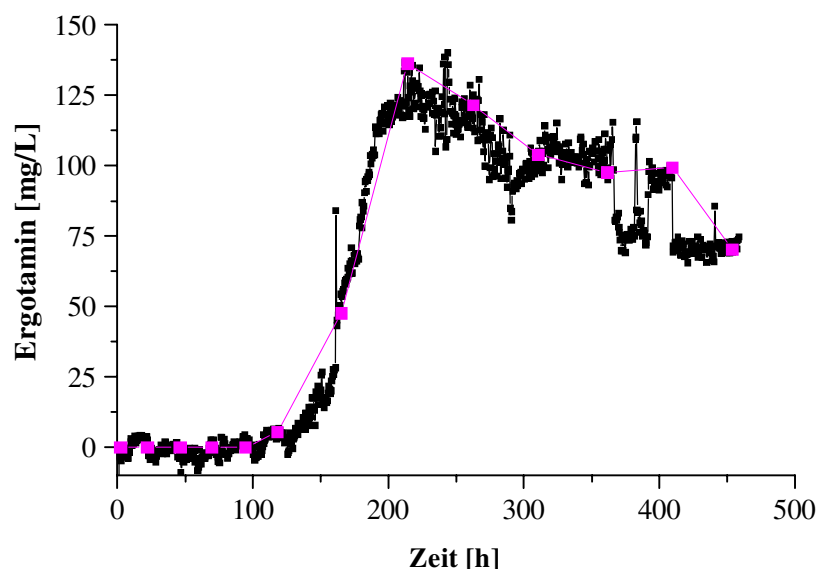
Darstellung der aus dem Modell entwickelten Vorhersage (—■—) und den zugehörigen off-line ermittelten Werten (—■—) des Gesamtalkaloidgehaltes für PFC3.

Aufgrund der bereits angesprochenen gerätebedingten Meßungenauigkeiten sind bei den vorhergesagten Werten wie schon bei den on-line Daten sprunghafte Veränderungen zu erkennen. Dennoch stimmt bis zur 220. Stunde der Verlauf der beiden Kurven sehr gut überein. Den Maximalwert der Konzentration trifft die Vorhersage allerdings nicht, doch nimmt die Konzentration nach 240 h mit den gemessenen Werten wieder ab. Ab der 300. Stunde steigen die vorhergesagten Daten jedoch wieder auf einen Maximalwert an, der nicht mit den off-line gemessenen Werten übereinstimmt. Dennoch läßt sich mit dieser Vorhersage der Konzentrationsverlauf in einem größeren Bereich (bis zur 200. Stunde) als mit den on-line Daten verfolgen.

Bei der hier durchgeführten Vorhersage muß berücksichtigt werden, daß die für das Modell verwendeten Daten in einigen Bereichen große Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten aufwiesen, die nicht durch Änderungen im Medium oder ähnliches, sondern durch Meßfehler des Gerätes auftraten. Die Modellierung wird vor allem dann erschwert, wenn die off-line ermittelten Daten in den Bereich dieser großen Streuungen fallen, da somit diese Werte eine andere Gewichtung erhalten.

Dieses Modell konnte trotz teilweise schlechter Daten eine gute Korrelation der vorhergesagten und der gemessenen Alkaloidkonzentrationen liefern.

Als weiteres Beispiel ist die für die Prozeßbeobachtung wichtige Ergotaminkonzentration in Abbildung 4-43 sowie die vorhergesagten Konzentrationen dargestellt. Die Vorhersage liefert für die Konzentration des Hauptproduktes den gleichen Verlauf wie die off-line Daten. Das Produktmaximum nach 214 h wird ebenso erfaßt wie der anschließende Abfall der Konzentration bis zum Ende der Kultivierung. Dabei wird nicht nur der Verlauf sondern auch die Ergotaminkonzentration sehr gut wiedergegeben.



**Abbildung 4-43.**

Darstellung der aus dem Modell entwickelten Vorhersage (—■—) und den zugehörigen off-line ermittelten Ergotaminkonzentrationen (—■—) für PFC3.

Diese hier vorgestellten ersten Ergebnisse der Modellierung der Fluoreszenzdaten zeigen einen äußerst vielversprechenden Weg auf, die Zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie für eine on-line Prozeßüberwachung zu etablieren.

In weiteren Untersuchungen soll daher dieses Modell auf seine Anwendbarkeit bei anderen *Claviceps* Kultivierungen getestet und weiterentwickelt werden. Ziel wird es dabei sein, das erweiterte Modell für die Vorhersage direkt am Fermentationsprozeß einzusetzen, um aus den on-line aufgenommenen Fluoreszenzspektren innerhalb kürzester Zeit Angaben über den aktuellen Prozeßzustand zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In allen aeroben Fermentationsprozessen spielt die ausreichende Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen eine bedeutende Rolle. Dabei muß der zumeist mechanische Sauerstoffeintrag in das Kulturmedium in der Größenordnung der Sauerstoffaufnahme der Zellen liegen. Andernfalls können sauerstofflimitierende Bedingungen zu Ausbeuteverlusten führen. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Sauerstoff in wäßrigen Medien, stellt dieser häufig den limitierenden Faktor einer Fermentation dar [CRUEGER UND CRUEGER, 1989].

Der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* zeigt in Submerskultivierungen zu Beginn der Wachstumsphase einen sehr hohen Sauerstoffbedarf. Die Anfälligkeit dieses Pilzes gegenüber mechanischer Belastung (Scherkräften) setzt enge Grenzen in bezug auf die Begasungsrate und die Rührergeschwindigkeit, so daß ein Hauptproblem der Kultivierung in der ausreichenden Sauerstoffversorgung des Mikroorganismus liegt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, alternative Methoden zur konventionellen Druckluftbegasung zu entwickeln und in Kultivierungen von *Claviceps purpurea* 1029 N5 im Bioreaktor anzuwenden, wobei eine Steigerung der Produktausbeute erzielt werden sollte. Eine Methode den Sauerstoffeintrag zu erhöhen war die Zugabe von Wasserstoffperoxid, aus dem Sauerstoff in flüssiger Phase generiert werden kann. Als zweites Verfahren wurde die Kultivierung in einem Zwei-Phasen-System mit perfluorierten Kohlenwasserstoffen, die eine wesentlich höhere Sauerstofflöslichkeit als Wasser besitzen, untersucht. Dabei wurden beide Methoden zunächst in Schüttelkolbenkultivierungen erprobt, um anschließend auf das Fermentationssystem übertragen zu werden.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die zur quantitativen Analyse der Produkte durchgeführte Extraktion für die beiden Ergotalkaloide Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin eine sehr gute Wiederfindungsrate aufweist. Dadurch war eine genaue Quantifizierung der Hauptprodukte möglich.

Da während der Kultivierungen von *Claviceps purpurea* im Bioreaktor starke Schaumentwicklung aufgrund der teilweise hohen Begasungsraten auftrat, wurde der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen der drei Antischaummittel Desmophen 3900, Paraffin sowie Silicon auf die Mikroorganismen untersucht. Dabei zeigte sich, daß Antischaummittelkonzentrationen bis 0,3 % (v/v) das Zellwachstum nur in geringem Maß beeinflussten. Die Gesamtalkaloidkonzentration lag jedoch bei allen Kulturen mit Antischaummittel unterhalb der Referenz, wobei in den Ansätzen mit Desmophen 67-77 %, mit Paraffin 72-83 % und mit Silicon 73-92 % der Konzentration der Referenz erzielt wurden. Demgegenüber wurden in den Kultivierungen mit Desmophen um 23-32 % erhöhte Konzentrationen des Hauptproduktes Ergotamin im Vergleich zur Referenz erhalten. Somit wurde in den Kultivierungen im Bioreaktor 0,1 % (v/v) Desmophen 3900 als Antischaummittel eingesetzt.

Zur Entwicklung einer alternativen Sauerstoffversorgung durch Zugabe von Wasserstoffperoxid wurden in Schüttelkolbenkultivierungen Voruntersuchungen durchgeführt, die Aufschluß über mögliche Wirkungen des Stoffes auf die Mikroorganismen und die Produkte geben sollten.

Die Einwirkung von 0,1 mM/L  $H_2O_2$  auf die Alkaloide Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin führte zu einer Abnahme der Konzentrationen um 1,2-1,6 %, wohingegen der Einsatz von 6 mM/L  $H_2O_2$  die Alkaloidkonzentrationen um 3,6 bzw. 3,4 % verringerte.

Die tägliche Zugabe von Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Konzentrationen zu *Claviceps* Kultivierungen führte zu keiner Beeinträchtigung des Zellwachstums. Der Gesamtalkaloidgehalt nahm jedoch mit ansteigender  $H_2O_2$ -Konzentration ab, wobei 0,1 mM/L  $H_2O_2$  eine um 5 % und 1,0 mM/L  $H_2O_2$  eine um 24 % verringerte Alkaloidausbeute im Vergleich zur Referenzkultur ergab. Die Ausbeuten des Hauptproduktes Ergotamin betragen nur 21-23 % des in der Referenzkultur erhaltenen Wertes.

Diese Ergebnisse machten den Einsatz von Katalysatoren zur schnelleren Spaltung des Wasserstoffperoxids notwendig.

Für ihren Einsatz als Katalysatoren wurden zum einen Katalase und zum anderen Mangandioxid untersucht. Die optimale Katalase-Konzentration für eine schnelle Sauerstoff-Freisetzung wurde mit 25 mg/L (50.000-125.000 units) ermittelt. Es stellte sich heraus, daß Katalase nach 24 h im Kultivierungsmedium große Aktivitätsverluste aufwies, so daß das Enzym in Kultivierungen täglich neu hinzugegeben werden mußte, wodurch die Kontaminationsgefahr erhöht wurde.

Um Zersetzungsgeschwindigkeiten zu erhalten, die in der Größenordnung der Katalase lagen, mußten 1,0 g/L Mangandioxid eingesetzt werden.

Der Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen von  $MnO_2$  in Kultivierungen zeigte keine negative Beeinflussung des Pilzwachstums. Im Gegensatz dazu wurden am Ende der Kultivierung nur 70-87 % des in der Referenz produzierten Proteingehalts erreicht. Ebenso konnten in den  $MnO_2$ -haltigen Kulturen lediglich 62-92 % des Gesamtalkaloidgehaltes der Referenz detektiert werden, auch die Ergotaminkonzentrationen lagen unterhalb der Referenz.

In Kultivierungen mit täglicher Wasserstoffperoxidzugabe und Zusatz von Katalase bzw. Mangandioxid wurden in allen Ansätzen ähnliche Biomassen erhalten. Die  $H_2O_2$ -Zugabe wirkte sich auf die Produktbildung aus, wobei der Ansatz mit Wasserstoffperoxid-Zugabe ohne Katalysator einen um 19 % im Vergleich zur Referenz erniedrigten Gesamtalkaloidgehalt aufwies, die Ansätze mit  $MnO_2$  zeigten vergleichbare Abweichungen zur Referenz. Die Kulturen mit Katalase erzielten noch geringere Alkaloidkonzentrationen. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid zu den Kultivierungen konnte demnach nicht zur Produktionssteigerung führen. Dies ließ darauf schließen, daß in dem verwendeten Schüttelkolbensystem (80 mL

Füllvolumen im 500 mL Erlenmeyerkolben) bedingt durch das günstige Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bereits ein optimaler Sauerstoffeintrag vorlag.

Aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit von  $\text{MnO}_2$  und der geringeren Kosten im Vergleich zur Katalase, wurde in den Kultivierungen im Bioreaktor mit Wasserstoffperoxidzugabe  $\text{MnO}_2$  eingesetzt. Aufgrund der geringeren Produktausbeute bei Verwendung der für eine schnelle Spaltung optimalen  $\text{MnO}_2$ -Konzentration von 1,0 g/L, empfahl es sich, 0,1 g/L  $\text{MnO}_2$  einzusetzen.

Kultivierungen von *Claviceps purpurea* in Gegenwart von Sojaöl in Schüttelkolben lieferten keine Produktionssteigerungen. Vielmehr führte der Zusatz von 4,7, 9,1 bzw. 16,7 % (v/v) Sojaöl zu einer Verringerung der Alkaloidkonzentrationen um 66-88 %, so daß der Einsatz dieser Substanz im Bioreaktor nicht sinnvoll erschien.

Der Einsatz der vier Kohlenwasserstoffe Hexan, Nonan, Dekan und Toluol in Schüttelkolbenkultivierungen ergab toxische Wirkungen von Toluol und Hexan auf die Mikroorganismen. Das Wachstum wurde durch Nonan und Dekan soweit inhibiert, daß im Ansatz mit Nonan nur 32 % und mit Dekan 78 % der Biomasse der Referenzkultur erhalten wurde. Demzufolge wurden in diesen Ansätzen nur 13 % (Nonan) bzw. 32 % (Dekan) des Gesamtalkaloidgehaltes der Referenzkultur produziert. Damit waren diese getesteten Kohlenwasserstoffe für einen Einsatz in Bioreaktor-Kultivierungen nicht geeignet.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß der perfluorierte Kohlenwasserstoff Hostinert 216 keinen Einfluß auf die vom Mikroorganismus gebildeten Produkte Ergotamin und  $\alpha$ -Ergokryptin ausübte und diese sich nicht in dem Kohlenwasserstoff lösten.

In Schüttelkolbenkulturen wurde Hostinert 216 in unterschiedlichen Konzentrationen zum Medium gegeben, um den Sauerstoffeintrag zu erhöhen. In zwei Versuchsreihen wurde mit konstantem Mediumvolumen (80 mL) gearbeitet, so daß sich durch Zugabe unterschiedlicher Hostinert-Mengen die Füllvolumina unterschieden. Dabei konnten für die eingesetzten Hostinert-Konzentrationen zwischen 10-50 % (v/v) anhand der Biomassen und der Proteinkonzentrationen keine Hemmungen des Zellwachstums und des Stoffwechsels beobachtet werden. In allen Ansätzen mit Hostinert-Zugabe war im Vergleich zur Referenzkultur eine Erhöhung des Gesamtalkaloidgehaltes erkennbar, wobei keine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen war. Des weiteren zeigte sich, daß eine maximale Alkaloidkonzentration vorwiegend nach 16 Kultivierungstagen auftrat. In einer weiteren Versuchsreihe wurden in allen Kolben das gleiche Flüssigkeitsvolumen von 200 mL eingestellt und Hostinert-Konzentrationen bis 80 % (v/v) eingesetzt. Die Referenzkultur zeigte im Vergleich zu den Kulturen mit 80 mL Medium ein deutlich verringertes Zellwachstum. Dieses wurde durch die schlechte Sauerstoffversorgung in diesem System, bedingt durch das ungünstige Verhältnis von Flüssigkeitsoberfläche zum Volumen, hervorgerufen. Der stetig ansteigende Ethanolgehalt bestätigte diese Annah-



me. Als Folge ergab sich eine um 80 % verringerte Alkaloidkonzentration. Der Einsatz von 10 % (v/v) Hostinert in diesem System führte zu keiner deutlichen Verbesserung des Sauerstoffeintrags, da die Biomasse einen ähnlichen Verlauf wie die der Referenz zeigte und der Ethanolgehalt ebenfalls hohe Werte (10 g/L) annahm. Hostinert-Konzentrationen von 30 % (v/v) und mehr führten zu geringeren Ethanolproduktionen und damit zur verbesserten Sauerstoffversorgung. In allen Kolben mit PFC-Zusatz konnten am Kultivierungsende deutlich höhere Gesamtalkaloid- und Ergotamin-Konzentrationen im Vergleich zur Referenz ermittelt werden. Eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit war nicht zu beobachten, Hostinert-Konzentrationen zwischen 10-30 % (v/v) führten zu einer Steigerung des Gesamtalkaloidgehaltes um das vierfache, Konzentrationen von 40-80 % (v/v) erreichten eine Erhöhung um das vier- bis sechsfache in diesem Schüttelkolbensystem. Die Ergotaminkonzentrationen wurden durch Zugabe von Hostinert um das zwei- bis vierfache erhöht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dieses Zwei-Phasen-System auf Fermentationen im 2L-Bioreaktor übertragen.

Bevor die alternativen Methoden zur Sauerstoffversorgung auf einen Bioreaktor übertragen werden konnten, wurde zunächst ein Kultivierungssystem etabliert, daß als Referenzsystem diente. Aufgrund der hohen Scherstreßanfälligkeit des Pilzes wurden zwei verschiedene Rührertypen (Scheiben- und Paddelrührer) im Rührkesselreaktor getestet. Es zeigte sich, daß die anfangs eingestellten Begasungsraten und Rührerdrehzahlen (0,5 vvm bzw. 250 rpm) im Laufe der Kultivierungen (F1 und F2) ständig erhöht werden mußten, um dem gesteigerten Sauerstoffbedarf der Organismen zu entsprechen. Gleichzeitig trat bei beiden Kultivierungen eine sehr starke Schaumentwicklung auf, die zum Austrag der Zellen führte. Der Vergleich der beiden Rührertypen ergab eine deutlich höhere Biomasse und eine um 50 % gesteigerte Alkaloidkonzentration bei der Kultivierung F2 unter Einsatz des Paddelrührers, weshalb dieser Rührer in den weiteren Fermentationen eingesetzt wurde. Diese Werte lagen bedingt durch den Zellaustrag allerdings um das sechs- bis achtfache (Biomasse) bzw. acht- bis zehnfache (Gesamtalkaloidgehalt) unterhalb der in Schüttelkulturen produzierten Mengen.

Zur weiteren Optimierung des Fermentationssystems wurde in zwei Kultivierungen (R1 und R2) das Antischaummittel Desmophen 3900 eingesetzt. Dadurch konnte die Schaumbildung minimiert und ein Austrag der Zellen verhindert werden. Um dem Sauerstoffbedarf der Zellen gerecht zu werden, konnten in beiden Fermentationen höhere Begasungsraten und Rührergeschwindigkeiten eingestellt werden als in der Kultivierung ohne Desmophen, so daß der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium bei Konzentrationen von 25 bzw. 30 % gehalten werden konnte. Dabei traten jedoch Schwierigkeiten in der Prozeßführung durch hohen Überdruck im Reaktor auf. Im Gegensatz zu den Kultivierungen im Schüttelkolben führte der Einsatz von Desmophen im Bioreaktor zu einer Steigerung der Biomasse um das sechs- (Referenz 1) bzw. dreifache (Referenz 2) und einer Erhöhung des Gesamtalkaloidgehaltes um den Faktor 3 bzw.

5. Dies verdeutlichte die unterschiedlichen Bedingungen in Bezug auf Sauerstoffeintrag und mechanische Belastung in den beiden Kultivierungssystemen Schüttelkolben und Bioreaktor. Die beiden mit Desmophen durchgeführten Kultivierungen zeigten die Schwierigkeit auf, in zwei unter denselben Bedingungen durchgeführten Fermentationen reproduzierbare Ausbeuten zu erhalten. So wurden in Kultivierung R1 zwar eine um das Doppelte erhöhte Biomasse erhalten, doch konnten nur 66 % des Gesamtalkaloidgehaltes bzw. 39 % der Ergotaminkonzentration der in R2 produzierten Mengen ermittelt werden.

Beide Kultivierungen dienten als Referenzwerte für die Kultivierungen unter Einsatz alternativer Sauerstoffversorgungen.

In drei Fermentationen wurde die konventionelle Druckluftbegasung durch Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Kultivierungsmedium unterstützt. Dabei konnte für die  $H_2O_2$ -Zugabe ein Regler etabliert werden, der den über  $H_2O_2$  zu deckenden Sauerstoffbedarf der Zellen aus den Abgasdaten berechnete. Des Weiteren wurde ein sogenannter „Notfallregler“ entwickelt, der einsprang, sobald die Begasung aufgrund technischer Fehler ausfiel. Durch die  $H_2O_2$ -Zugabe konnten teilweise geringere Rührergeschwindigkeiten und Begasungsraten eingestellt werden, so daß die Scherbelastung der Zellen erniedrigt wurde. Bei der Kultivierung mit 10 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung konnte über 200 h die Luftbegasung durch  $H_2O_2$ -Zugabe unterstützt werden. In allen drei Kultivierungen mit  $H_2O_2$ -Zugabe setzte wie bei den Referenzkultivierungen nach ca. 80 h die Ethanolproduktion ein, obwohl die Gelöstsauerstoffgehalte zwischen 20-25 % lagen.

Trotz zusätzlicher Sauerstoffversorgung über  $H_2O_2$  und damit verbundener Verringerung der Begasungsraten, erwies sich der Einsatz des Antischaummittels aufgrund starker Schaumentwicklung als unerlässlich. Die ohne Desmophen durchgeführte Kultivierung mit  $H_2O_2$ -Zugabe (H1) ergab daher Biomassen, die im Bereich der Kultivierung F2 (kein Antischaummittel, konventionelle Begasung) lagen, wobei allerdings die Alkaloidproduktion um 38 % gesteigert wurde.

In den beiden mit Desmophen- und  $H_2O_2$ -Zugabe durchgeführten Fermentationen (H2 und H3) wurden Biomassekonzentrationen erhalten, die zwischen den in den beiden Referenzkulturen produzierten Mengen lagen. Auch die Gesamtalkaloidgehalte lagen zwischen den in den Referenzkultivierungen produzierten Konzentrationen. Demgegenüber konnte bei H2 eine um 13 % erhöhte Konzentration des wichtigen Hauptproduktes Ergotamin im Vergleich zur Referenz 2 erzielt werden. Als Problem bei den Kultivierungen erwies sich die teilweise große Verdünnung des Mediums durch die hohen Mengen an zugesetzter Peroxid-Lösung.

Mit dem System  $H_2O_2/MnO_2$  gelang es, die Produktausbeuten in einem guten, annähernd gleichen Konzentrationsbereich zu etablieren, was in den Referenzsystemen nicht möglich war. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Zeitpunkt des sehr hohen Sauerstoffbedarfs konnte die Begasung mit Druckluft sehr gut unterstützen, wodurch der Einsatz sehr nützlich und empfehlenswert ist.

Der Einsatz des perfluorierten Kohlenwasserstoffs Hostinert 216 wurde in vier Kultivierungen im Bioreaktor mit unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. In allen Kultivierungen im Zwei-Phasen-System konnte der Gelöstsauerstoffgehalt im Medium über 50 % gehalten werden, wobei mit 0,75 vvm äußerst geringe Begasungsraten notwendig waren. Dennoch trat auch hier nach 80 h die Bildung von Ethanol auf, was auf anaerobe Bedingungen hindeutete. Der Grund dafür muß in einem langsamen Sauerstofftransport aus dem Medium und/oder aus der Hostinert-Phase zu den Zellen liegen, wobei die dichte Mycelstruktur den Transport in das Mycelinnere behindern könnte.

In allen Kultivierungen mit Hostinert-Zusatz lagen die Biotrockenmassen im Bereich zwischen den Referenzkulturen, wobei keine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen war. Des Weiteren war bei den vier Fermentationen ein Maximum des Gesamtalkaloidgehaltes am 10. Kultivierungstag zu beobachten, wohingegen die Referenzkulturen dieses nicht aufwiesen. Als Ursache wurde die Metabolisierung der Produkte durch die vom Organismus produzierten, degradierenden Enzyme angenommen. Ähnliche Verläufe waren ebenfalls bei den Ergotaminkonzentrationen zu beobachten, wobei auch bei der Referenz ein Maximum durchlaufen wurde, das zeitgleich mit denen der Hostinert-Kultivierungen auftrat. Da der Gesamtalkaloidgehalt der Referenz auch nach dem Maximum der Ergotaminkonzentration weiterhin anstieg, deutete dies darauf hin, daß in dieser Kultivierung ab der 250. Stunde vorwiegend die pharmakologisch nicht relevanten niederen Lysergsäurederivate oder Clavinalkaloide gebildet wurden.

Der Vergleich der Gesamtalkaloidgehalte mit denen der Referenzen zeigte, daß die maximalen Konzentrationen um 10-35 % deutlich über Referenz 1 lagen, aber nur 74-90 % der in Referenz 2 erzielten Konzentrationen erreichten. Die erzielte, maximale Alkaloidkonzentration konnte dabei in zwei Kultivierungen mit 20 % (v/v) Hostinert reproduziert werden. Ebenso erreichten beide Kultivierungen vergleichbare Ergotaminkonzentrationen, die zudem im Bereich der Referenzkultivierung R2 lagen.

Eine Steigerung der Ergotaminkonzentration um 13 bzw. 7 % im Vergleich zur Referenz 2 wurde in den Kultivierungen mit 10 bzw. 40 % (v/v) Hostinert erzielt. Dadurch konnten bei den Fermentationen mit PFC-Zugabe der Anteil des Hauptproduktes Ergotamin am Gesamtalkaloidgehalt (27-31 %) deutlich gegenüber den Referenzen (11-21 %) gesteigert werden, wobei eine Konzentrationsabhängigkeit nicht zugeordnet werden konnte.

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Kultivierungen von *Claviceps purpurea* im Rührkesselreaktor unter Zusatz eines perfluorierten Kohlenwasserstoffs zeigten zum einen ein einfacher handhabbares Kultivierungssystem, da keine hohen Begasungsraten eingestellt und somit Überdruck im Reaktor vermieden werden konnte. Zum anderen konnten sehr gute, reproduzierbare Ausbeuten erhalten werden, wobei die Konzentration des Hauptproduktes Ergotamin gegenüber Referenzkultivierungen auch mit geringen Hostinert-Konzentrationen von 10 % (v/v) deutlich gesteigert werden konnten.

Als weitere Vorteile erwiesen sich die Möglichkeit der vollständigen Abtrennung des perfluorierten Kohlenwasserstoffs vom Kulturmedium und die dadurch ermöglichte Wiederverwendung. Somit lassen sich der Chemikalienverbrauch und Recyclingkosten minimieren.

Die genaue zeitliche Bestimmung der aufgetretenen Konzentrationsmaxima ist für eine industrielle Anwendung äußerst wichtig, um den Prozeß rechtzeitig vor dem Abbau der Produkte zu beenden und somit die Kosten minimal zu halten. Daher wurde in dieser Arbeit die Zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie angewendet, um on-line und in-time Aussagen über den Produktionsverlauf treffen zu können. Dabei konnten bei den on-line-Messungen die Biomasse und Alkaloidgehalte bis zur 200. Stunde anhand der Fluoreszenzintensitäten der Bereiche „Flavine“ und „Alkaloide“ beschrieben werden. Aufgrund der starken Zunahme der Biomasse, die die Eindringtiefe des Anregungslichtes negativ beeinflusste, und den hohen Alkaloidgehalten, wodurch Quench-Effekte auftraten, fielen die RFI nach 200 h ab. Ein weiterer Grund dafür lag in einem möglichen Überschreiten des Fluoreszenzsättigungsbereiches.

Bei off-line-Messungen konnte bei 1:1000 Verdünnungen der Kultivierungsüberstände der Gesamtalkaloidgehalt linear mit den RFI-Werten des Bereiches „Alkaloide“ korreliert werden, da die Intensitäten aufgrund der hohen Verdünnung den Sättigungsbereich nicht überschritten. Der Proteingehalt ließ sich anhand der RFI „Proteine“ sehr gut beschreiben.

Als Beispiel wurde anhand einer Kultivierung mit Hostinertzugabe, in denen die on-line Beobachtung durch instrumentenbedingte, große Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten sehr erschwert wurde, ein chemometrisches Modell entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells wurden für die verschiedenen off-line ermittelten Parameter Vorhersagen berechnet und mit den Konzentrationen verglichen. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den vorhergesagten und ermittelten Gesamtalkaloidkonzentrationen. Trotz der schlechten Qualität der in das Modell einbezogenen Daten konnte die für den Prozeß entscheidende Ergotaminkonzentration über den gesamten Kultivierungsverlauf sehr gut wiedergegeben werden.

In dieser Arbeit konnten zwei verschiedene Methoden etabliert werden, die die konventionelle Sauerstoffversorgung über Druckluftbegasung erfolgreich unterstützten. Die teilweise gesteigerten Produktausbeuten zeigen, daß durch Veränderung der Sauerstoffzufuhr Produktivitätssteigerungen möglich sind. Des weiteren konnten teilweise Produktkonzentrationen erzielt werden, die über denen für diesen Stamm in der Literatur angegebenen Ausbeuten lagen.

Das Kultivierungssystem Hostinert/Medium besitzt gegenüber der Sauerstoffversorgung durch Zugabe von Wasserstoffperoxid den Vorteil, daß eine geringe Begasungsrate während des gesamten Kultivierungsprozesses ausreicht und eine Erhöhung nicht notwendig ist, so daß lediglich die Rührergeschwindigkeit kontinuierlich gesteigert werden muß. Damit ist der Regelaufwand deutlich geringer als bei der Methode mit Wasserstoffperoxid-Zugabe. Außerdem werden im Laufe der Kultivierung keine Lösungen zusätzlich in den Reaktor gegeben, wo-

durch Verdünnungen oder andere Probleme (wie z.B. das Überlaufen des Reaktors oder Überdruck) auftreten.

Dennoch konnten in den Kultivierungen mit diesen beiden Methoden die erzielten Produktausbeuten in vergleichbaren Bereichen etabliert werden, während die Referenzkultivierungen deutliche Produktivitätsunterschiede aufwiesen, so daß ihr Einsatz sehr effektiv ist.

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Sauerstoffversorgung über Wasserstoffperoxid mit höher konzentrierter  $H_2O_2$ -Lösung (beispielsweise 30 %-ig) durchgeführt werden. So könnten die aufgetretenen hohen Verdünnungsraten verhindert werden. Des weiteren ist es erforderlich, Präzisionspumpen einzusetzen, die kleinste Mengen kontinuierlich zudosieren können, damit der Gelöstsauerstoffgehalt relativ konstant und auf höherem Niveau gehalten werden kann. Bei der Übertragung dieses Systems auf Fermentationsanlagen im Produktionsmaßstab muß der hier entwickelte Regler auf die anderen Reaktordimensionen angepaßt werden. Dabei muß berücksichtigt werden, inwieweit die hier durchgeführte Zugabe der Wasserstoffperoxidlösung über den Reaktordeckel sinnvoll ist oder andere Methoden entwickelt werden sollten.

Die Kultivierung von *Claviceps purpurea* in einem Zwei-Phasen-System zeigt eine weitere Möglichkeit auf, den Sauerstoffeintrag ins Medium zu verbessern. Dabei ist das hier verwendete Reaktorsystem noch nicht optimal, da trotz hoher Gelöstsauerstoffkonzentrationen in der Flüssigkeit eine zeitweilige Sauerstofflimitierung vorlag. In weiteren Untersuchungen müßte ein System verwendet werden, in dem der Gelöstsauerstoffgehalt nicht nur an einer, sondern an mehreren Stellen in der Flüssigkeit gemessen wird. Dazu würde sich die Anwendung faseroptischer Sauerstoffsensoren anbieten, die aufgrund der geringeren Größe der Glasfasern gegenüber herkömmlichen Elektroden in größerer Anzahl im Reaktor eingebaut werden könnten. Dadurch ließen sich genauere Informationen auch über die Durchmischung im Reaktor gewinnen. Zur weiteren Optimierung könnten andere Rührer verwendet werden, die für eine bessere Vermischung der beiden Phasen sorgen, wobei wiederum die Scherstreißanfälligkeit des Pilzes berücksichtigt werden muß. Des weiteren könnte ein alternatives Reaktorsystem verwendet werden, bei dem das Medium ebenso wie im Rührkesselreaktor begast und die Hostinert-Phase sauerstoffgesättigt von oben auf das Medium gesprüht wird. Dadurch läßt sich die Hostinert-Phase fein verteilen, wodurch der Sauerstoffübergang beschleunigt werden könnte. Im Gegensatz zu der von MERKEL [1996] verwendeten Anlage sollte die Kulturbrühe hingegen leicht gerührt werden, um ein Oberflächenwachstum zu vermeiden.

Eine vielversprechende Methode zur Prozeßbeobachtung stellt der Einsatz der Zweidimensionalen Fluoreszenzspektroskopie dar. Der Schwerpunkt weiterführender Untersuchungen sollte in der multivariaten Modellierung liegen, die einen vielversprechenden Weg zur Vorhersage des Fermentationsverlaufs anhand des gesamten Fluoreszenzspektrums aufgezeigt hat.

## 6 Literaturverzeichnis

- ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B.; Oxygen supply to immobilized cells, 3. Oxygen supply by hemoglobin or emulsions of perfluorochemicals, *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 16: 165-170, 1982
- AMICI, A.M.; MINGHETTI, A.; SCOTTI, T.; SPALLA, C.; TOGNOLI, L.; Production of ergotamine by a strain of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., *Experientia*, 22: 415-416, 1966
- ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FERNI, G.; PENCO, S.; PENNELLA, P.; POL, C.; Ergotamine production and metabolism of *Claviceps purpurea* strain 275 FI in stirred fermenters, *Can J Microbiol*, 16: 923-931, 1970
- ARCAMONE, F.; CHAIN, E.B.; FERRETTI, A.; MINGHETTI, A.; PENNELLA, P.; TONOLO, A.; VERO, L.; Production of a new lysergic acid derivative in submerged culture by a strain of *Claviceps paspali*; Stevens & Hall. *Proc Royal. Soc. London Ser., B* 155: 26-54, 1961
- BEACCO, E.; BIANCHI, M.L.; MINGHETTI, A.; SPALLA, C.; Directed biosynthesis of analogues of ergot peptide alkaloids with *Claviceps purpurea*, *Experientia*, 34: 1291-1293, 1978
- BELGARDT, K.H.; Modellbildung des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* in Rührkesselreaktoren, Dissertation, Universität Hannover, 1984
- BERDE, B.; STÜRMER, E.; In: Ergot alkaloids and related compounds (Berde, B.; Schild, H.O.; eds.), Springer Verlag, Berlin, 1978
- BETHKE, H.; DELZ, B.; STICH, K.; Determination of the content and purity of ergotamine preparations by means of high-pressure liquid chromatography, *J Chromatogr*, 123: 193-203, 1976
- BOEHL, D.; Diplomarbeit, Universität Hannover, 1998
- BOEHL, D.; Laufende Dissertation, Universität Hannover, 1999
- CD RÖMPP, 9., erweiterte und überarb. Aufl. d. Römpp Chemie Lexikons auf CD-ROM, Version 1.0, Hrsg.: Falbe, J.; Regitz, M.; Thieme-Verlag, Stuttgart, 1995
- CHO, Y.K.; BAILEY, J.E.; Enzyme immobilization on activated carbon: Alleviation of enzyme deactivation by hydrogen peroxide, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 19, 769-775, 1977
- COTY, V.F.; GORRING, R.L.; HEILWEIL, I.J.; LEAVITT, R.I.; SRINIVASAN, S.; Growth of microbes in an oil-continuous environment, *Biotechnol Bioeng*, 13: 825-842, 1971
- CRUEGER, W.; CRUEGER A.; *Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*, 3., neu bearb. Aufl., R. Oldenbourg Verlag, 1989
- DAMIANO, D.; WANG, S.S.; Novel use of a perfluorocarbon for supplying oxygen to aerobic submerged cultures, *Biotechnol Lett*, Vol. 7 (2): 81-86, 1985
- DELLWEG, H.; *Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren*, VCH, Weinheim, 1987
- DIDEK-BRUMEC, M.; GABERC-POREKAR, V.; ALACEVIC, M.; Relationship between the claviceps life cycle and productivity of ergot alkaloids, *Critical Reviews in Biotechnology*, 16(3): 257-299, 1996
- DUVNJAK, Z.; LILLY, M.D.; The immobilization of Glucose oxidase to manganese oxide, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 18, 737-739, 1976
- EICH, E.; PERTZ, H.; Ergot alkaloids as lead structures for differential receptor systems, *Pharmacia*, 49: 867-877, 1994

- ELIBOL, M.; MAVITUNA, F.; Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Appl Microbiol Biotechnol*, 43: 206-210, 1995
- ELIBOL, M.; Use of perfluorocarbon in the culture of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Techniques*, Vol. 10, No. 12: 987-990, 1996
- ESSER, K.; DÜVELL, A.; Biotechnological exploitation of the ergot fungus (*claviceps purpurea*), *Process Biochem*, 19: 142-148, 1984
- ESTLER, C.J.; *Pharmakologie und Toxikologie: Lehrbuch für Mediziner, Veterinärmediziner, Pharmazeuten und Naturwissenschaftler*, 4., vollst. neu bearb. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart, 1995
- FLIEGER, M.; WURST, M.; SHELBY, R.; Ergot alkaloids- sources, structures and analytical methods, *Folia Microbiol*, 42 (1), 3-30, 1997
- FLOSS, H.G.; Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds, *tetrahedron*, 32: 873-912, 1976
- FLOSS, H.G.; GÜNTHER, H.; MOTHE, U.; BECKER, I.; Isolierung von Elymoclavin-o-β-D-fruktosid aus Kulturen des Mutterkornpilzes, *Z Naturforsch*, 22b: 399-402, 1967
- FLOSS, H.G.; MOTHE, U.; Über den Einfluß von Tryptophan und analogen Verbindungen auf die Biosynthese von Clavinalkaloiden in saprophytischer Kultur, *Arch Mikrobiol*, 48: 213-221, 1964
- GEBLER, J.C.; POULTER, C.D.; Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *claviceps purpurea*, *Arch Biochem Biophys*, 296: 308-313, 1992
- GIL'MANOV, V.; FLIEGER, M.; DYMSHITS, V.; Note: Influence of hydrocarbons on some *Claviceps* cultures, *J Appl Bacteriol*, 81: 678-680, 1996
- GRÖGER, D.; FLOSS, H.G.; Biochemistry of ergot alkaloids- achievements and challenges, In: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Vol. 50 (Cordell, G.A. ed.), 171-215, Academic Press, London, 1998
- HO, C.S.; JU, L.K.; BADDOUR, R.F.; Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of n-hexadecane, *Biotechnol Bioeng*, 36: 1110-1118, 1990
- HOLST, O.; ENFORS, S.O.; MATTIASSON, B.; Oxygenation of immobilized cells using hydrogen-peroxide; a model study of *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone; *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 14: 64-68, 1982
- IBRAHIM, M.; SCHLEGEL, H.G.; Efficiency of bovine liver catalase as a catalyst to cleave H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added continually to buffer solutions, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 22, 1895-1906, 1980b
- IBRAHIM, M.; SCHLEGEL, H.G.; Oxygen supply to bacterial suspensions of high cell densities by hydrogen peroxide, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 22, 1877-1894, 1980a
- JU, L.K.; LEE, J.F.; ARMIGER, W.B.; *Biotechnol Prog*, 7: 323-329, 1991
- JUNKER, B.H.; HATTON, T.A.; WANG, D.I.C.; Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: 1. Experimental observations, *Biotechnol Bioeng*, 35: 578-585, 1990
- KELLER, U., *Biosynthesis of ergot alkaloids*, *Med Aromat Plants- Ind Profiles*, Harwood Academic Publishers, 1999
- KELLER, U.; HAN, M.; STÖFFLER-MEILICKE, M.; D-Lysergic acid activation and cell-free synthesis of D-lysergyl peptides in enzyme fractions from the ergot fungus *claviceps purpurea*, *Biochemistry*, 27: 6164-6170, 1988

- KELLER, U.; Highly efficient mutagenesis of *Claviceps purpurea* by using protoplast, Appl Environ microbiol, Vol 46, No. 3: 580-584, 1983
- KOBEL, H.; SANGLIER, J.J.; Ergot alkaloids, In: Biotechnology, Vol 4 (Rehm, H.J.; Reeds, G.; Eds.), 569-609, VCH Weinheim, 1986
- KOBEL, H.; SANGLIER, J.J.; Formation of ergotoxine alkaloids by fermentation and attempts to control their biosynthesis; In: Antibiotics and other secondary metabolites, biosynthesis and production, (Hütter, R.; Leisinger, T.; Nuesch, J.; Wehrli, W.; Eds.), FEMS Symposium No. 5, pp. 233-242, Academic Press, New York, 1978
- KOPP, B.; REHM, H.J.; Alkaloid production by immobilized mycelia of *Claviceps purpurea*, Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 18: 257-263, 1983
- KOPP, B.; REHM, H.J.; Semicontinuous cultivation of immobilized *Claviceps purpurea*, Appl Microbiol Biotechnol, 19: 141-145, 1984
- KOZLOVSKII, A.G.; SOLOV'ÉVA, T.F.; SLOKOSKA, L.; GRIGOROV, I.; Factors affecting the biosynthesis of alkaloids by cultures of *Claviceps* CP II, Appl Biochem Microbiol, 22: 456-461, 1986
- KREN, V.; Bioconversions of ergot alkaloids, In: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology 44, Bioreactor Systems and Effects, (Fiechter, A.; Ed.), pp. 123-144, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1991
- KREN, V.; Enzymatic and chemical glycosylations of ergot alkaloids and biological aspects of new compounds, Top Curr Chem, 186: 45, 1997
- KREN, V.; LUDVIK, J.; KOFRONOVA, O.; KOZOVA, J; REHACEK, Z.; Physiological activity of immobilized cells of *Claviceps fusiformis* during long-term semicontinuous cultivation, Appl Microbiol Biotechnol, 26: 219-116, 1987
- KREN, V.; PAZOUTOVA, S.; RYLKO, V.; SAJDL, P.; WURST, M.; REHACEK, Z.; Extracellular metabolism of sucrose in a submerged culture of *Claviceps purpurea*: formation of monosaccharides and clavine alkaloids, Appl Environm Microbiol, 48 (4): 826-829, 1984
- KRUPINSKI, V.M.; ROBBERS, J.E.; FLOSS, H.G.; Physiological study of ergot: Induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level, J Bacteriol, 125 (1): 158-165, 1976
- KYBAL, J.; SIKYTA, B.; Renaissance der Oberflächenkultur: Produktion von Mutterkornalkaloiden und Sporenbildung, Acta Biotechnol, 6 (3): 245-251, 1986
- LOHMEYER, M.; DIERKES, W.; REHM, H.J.; Influence of inorganic phosphate and immobilization on *Claviceps purpurea*, Appl Microbiol Biotechnol, 33: 196-201, 1990
- LOHMEYER, M.; SANDER, B.; Cultivation of immobilized cells of *Claviceps purpurea* in bioreactors, J Ferm Bioengineering, 76 (5): 376-381, 1993
- LOHMEYER, M.; TUDZYNSKI, P.; *Claviceps* Alkaloids, In: Fungal Biotechnology, (Anke, T., ed.), 173-185, Chapman & Hall, Weinheim, 1997
- LOWE, K.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture, Trends in Biotechnol, 16: 272-277, 1998
- MANTLE, P.G.; TONOLO, A.; Relationship between the morphology of *Claviceps purpurea* and the production of alkaloids, Trans Br Mycol Soc, 51: 499-505, 1968
- MAROSE, S.; Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenz, Dissertation, Universität Hannover, 1999
- MATSUMURA, M.; OBARA, M.; YOSHITOME, H.; KOBAYASHI, J.; Oxygen equilibrium distribution and its transfer in an air-water-oil system, J Ferment Technol, 50: 742-750, 1972



- MATTIASSON, B.; ADLERCREUTZ, P.; Perfluorochemicals in biotechnology, Trends in Biotechnol, 5: 250-254, 1987
- MCMILLAN, J.D.; WANG, D.I.C.; Ann New York Acad Sci, 506: 569-582, 1987
- MERKEL, K.; Vergleichende Untersuchung verschiedener Kultivierungssysteme zur Produktion von Ergotalkaloiden mit *Claviceps purpurea* D1-nic, Fortschr.-Ber. VDI, Reihe 17, Nr. 136, VDI Verlag, Düsseldorf, 1996
- MICHELON, L.E.; KELLEHER, W.J.; The spectrophotometric determination of ergot alkaloids. A modified procedure employing paradimethylaminobenzaldehyd, Lloydia, 26 (3): 192-201, 1963
- MILICIC, S.; KREMSEK, M.; GABERC-POREKAR, V.; DIDEK-BRUMEC, M.; SOCIC, H.; The effect of aeration and agitation on *Claviceps purpurea* dimorphism and alkaloid synthesis during submerged fermentation, Appl Microbiol Biotechnol, 31: 134-137, 1989
- MIMURA, T.; KAWANO, T.; KODAIRA, R.; Biochemical engineering analysis of hydrocarbon fermentation: 1- oxygen transfer in the oil-water system, J Ferment Technol, 47: 229-236, 1969
- MUKHERJEE, J.; MENGE, M.; Progress and prospects of ergot alkaloid research, In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (Scheper, T.; Ed.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, zur Publikation akzeptiert
- MÜLLER, E.; LOEFFLER, W.; Mykologie: Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner, 5. durchgesehene Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1992
- NIES, D.; SCHLEGEL, H.G.; Use of catalase from *Escherichia coli* in model experiments for oxygen supply of microorganisms with hydrogen peroxide, Biotechnol Bioeng, Vol 26, 737-741, 1984
- OTTO, M.; Chemometrie, Statistik und Computereinsatz in der Analytik, VCH, Weinheim, 1997
- PERTOT, E.; ROZMAN, D.; MILICIC, S.; SOCIC, H.; Morphological differentiation of immobilized *Claviceps paspali* mycelium during semi-continuous cultivation, Appl Microbiol Biotechnol, 28: 209-213, 1988
- PUC, A.; SOCIC, H.; Carbohydrate nutrition of *Claviceps purpurea* for alkaloid production related to the osmolality of media, European J Appl Microbiol, 4:283-287, 1977
- REHACEK, Z., New trends in ergot alkaloid biosynthesis, Proc Biochem, 18: 22-33, 1983
- REHACEK, Z.; Physiological controls and regulation of ergot alkaloid formation, Folia Microbiol, 36 (4): 323-342, 1991
- REHACEK, Z.; SAJDL, P.; Ergot alkaloids: chemistry, biological effects, biotechnology; in: Bioactive molecules, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam, 1990
- REISS, M.; Untersuchungen zur submersen Produktion von Ergotalkaloiden durch native und immobilisierte Mycelien von *Claviceps purpurea* bei konventioneller und alternativer Sauerstoffversorgung, Dissertation, Universität Hohenheim, 1990
- REUSS, M.; Oxygen transfer and mixing: Scale-up implications, In: Biotechnology, 2. Edition, Vol. 3, (Rehm, H.J.; Reed, G.; Eds.), pp. 185-217, VCH, Weinheim, 1993
- ROBBERS, J.E.; EGGERT, W.W.; FLOSS H.G.; Physiological studies on ergot: Time factor influence on the inhibitory effect of phosphat and the induction effect of tryptophan on alkaloid production, Journal of Natural Products-Lloydia, 41 (2): 120-129, 1978

- ROBBERS, J.E.; ROBERTSON, L.W.; HORNEMANN, K.M.; JINDRA, A.; FLOSS, H.G.; Physiological studies on ergot: Further studies on the induction of alkaloid synthesis by tryptophan and its inhibition by phosphate, *J Bacteriol*, 112 (2): 791-796, 1972
- ROLS, J.L.; CONDORET, J.S.; FONADE, C.; GOMA, G.; Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors, *Biotechnol Bioeng*, 35: 427-435, 1990
- ROLS, J.L.; GOMA, G.; Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersion, *Biotechnol Lett*, Vol 13, Nr. 1: 7-12, 1991
- ROLS, J.L.; GOMA, G.; Enhancement of oxygen transfer rates in fermentation using oxygen-vectors, *Biotech Adv*, 7: 1-14, 1989
- SCHÄFER, H.; BAYER, T.; BUCHHOLZ, R.; KÜHLEIN, K.; SCHLINGMANN, M.; WULLBRANDT, D.; New process for indirect gas supply by means of perfluorinated polyethers, *Chem Eng Technol*, 14: 127-134, 1991
- SCHEPER, TH.; Bioanalytik: Messung des Zellzustandes und der Zellumgebung in Bioreaktoren, Vieweg Verlag, Braunschweig, 1991
- SCHLEGEL, H.G.; Aeration without air: Oxygen supply by hydrogen peroxide, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 19, 413-424, 1977
- SCHLEGEL, H.G.; Allgemeine Mikrobiologie, 7., überarb. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1992
- SCHMAUDER, H. P., Mutterkorn-vom Fluch zum Segen für die Menschheit, *Biosphäre*, 20, 1998
- SCHMAUDER, H.P., Saprophytic production of ergot alkaloids, In: Supplement to Cultivation and Utilization of Medicinal Plants, (Handa, S.S.; Kaul, M.K. (eds.), Regional Research Laboratory (CSIR), Jammu, India, pp. 145-170, 1996
- SCHÜGERL, K.; Bioreaktionstechnik: Reaktionstechnik mit Mikroorganismen u. Zellen, Band 1, 1. Auflage, Otto Salle Verlag, Frankfurt/Main, 1985
- SOCIC, H.; GABERC-POREKAR, V.; DIDEK-BRUMEC, M.; Biochemical characterization of the inoculum of *Claviceps purpurea* for submerged production of ergot alkaloids, *Appl Microbiol Biotechnol*, 21: 91-95, 1985
- SONNLEITNER, B.; HAHNEMANN, U.; Robust oxygen supply by controlled addition of hydrogen peroxide to microbial cultures, *Bioproc Eng*, 17: 215-219, 1997
- SPALLA, C.; MARNATI, M.P.; Genetic aspects of the formation of ergot alkaloids, In: Antibiotics and Other Secondary Metabolites, (Hütter, R.; Leisinger, T.; Nüesch, J.; Wehrli, W.; eds.), pp. 219-232, Academic Press, London, 1978
- TONOLO, A.; Production of peptide alkaloids in submerged culture by a strain of *Claviceps purpurea*, *Nature*, 209: 1134, 1966
- TSAI, H.F.; WANG, J.H.; GEBLER, C.J.; SCHÄRDLE, C.L.; The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 216: 119-125, 1995
- UDVARDY, E.N., Consideration of the development of an ergot alkaloid fermentation process, *Proc Biochem*, 15: 5-8, 1980
- VINING, L.C.; Effect of tryptophan on alkaloid biosynthesis in cultures of a *Claviceps* species, *Can J Microbiol*, 16: 473-480, 1970

---

YAMAMOTO, S.; HONDA, H.; SHIRAGAMI, N.; UNNO, H.; Enhancement of autotrophic growth rate of *Alcaligenes eutrophus* in a medium containing perfluorocarbon under low oxygen partial pressure, *Biotechnol Lett*, Vol. 14, No. 8: 733-736, 1992

## 7 Anhang

### 7.1 Medienzusammensetzungen

#### 7.1.1 T2 Medium (für die Stammhaltung auf Agarplatten)

**Tabelle 7.1**

Zusammensetzung des T2 Mediums nach AMICI [1967].

Substanz	Menge
Saccharose	100,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
L-Asparagin	10,0 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
KCl	0,12 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20,0 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15,0 mg
Nicotinsäureamid	0,08 mg
Agar-Agar	20,0 g
Leitungswasser	ad 1000 mL
pH (einstellen mit HCl)	5,2

#### 7.1.2 Medien für die Flüssigkulturen

**Tabelle 7.2**

Zusammensetzung der Medien für die Flüssigkulturen nach Amici [1967].

Substanz	InOc-Medium (Vorkultur)	T25-Medium (Hauptkultur)
	Menge	Menge
Saccharose	100,0 g	300,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g	0,5 g
Citronensäure-1-hydrat	10,0 g	15,0 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,0 g	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g	0,5 g
KCl	0,12 g	0,12 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	7,0 mg	7,0 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6,0 mg	6,0 mg
Nicotinsäureamid	0,75 mg	0,75 mg
Leitungswasser	ad 1000 mL	ad 1000 mL
pH (einstellen mit NH <sub>3</sub> )	5,2	5,2

## 7.2 Reagenzien für den BIORAD DC Protein Assay

Reagenz A: wässrige Lösung aus 1-5 % NaOH, < 1 % Natriumtartrat, < 1 % CuSO<sub>4</sub>

Reagenz B: wässrige Lösung aus < 1 % LiSO<sub>4</sub>, Na-Salz der Wolframsäure, < 1 % Na-Salz der Molybdänsäure, < 1 % Phosphorsäure

## 7.3 Reagenzien für den Photometertest nach van Urk

Reagenz 1: 100 mg p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 mL halbkonz. Schwefelsäure

Reagenz 2: 10 mg Natriumnitrit in 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (frisch anzusetzen)

## 7.4 Verwendete Chemikalien

Aceton, reinst	Fluka
Acetonitril, HPLC-grade	Fluka
Agar-Agar, hochrein	Merck
Ammoniak	Fluka
Ammoniumcarbonat	Fluka
L-Asparagin	Sigma
BSA (bovine serum albumin)	Pierce
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Merck
Chloroform	Fluka
Citronensäure-1-hydrat	Fluka
Dekan	Fluka
Desmophen 3900	Bayer
p-Dimethylaminobenzaldehyd	Fluka
Eisensulfat-Heptahydrat	Fluka
α-Ergokryptin	Sigma
Ergotamintartrat	Sigma
Ethanol	Fluka
Fructose	Fluka
Glucose, HPLC grade	Fluka
Hexan	Fluka
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Katalase (bovine liver)	Sigma
Konz. Schwefelsäure	Fluka
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka
Mangandioxid	Fluka
Methanol, HPLC-grade	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Natriumnitrit	Riedel-de-Haen
Natronlauge	Fluka
Nicotinsäureamid	Sigma
Nonan	Fluka
Paraffin	Fluka
Perchlorsäure/Perchlorat	Merck
Saccharose	Merck
Salzsäure	Fluka
Siliconöl	Wacker
Toluol	Fluka
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck

## 7.5 Kenndaten von Hostinert 216<sup>®</sup>

Hostinert 216<sup>®</sup> gehört zu den von der Fa. Hoechst produzierten Inertflüssigkeiten aus der Reihe der Perfluorpolyether. Einige Kenndaten dieses perfluorierten Kohlenwasserstoffs sind Tabelle 7-3 zu entnehmen.

**Tabelle 7-3.**

Kenndaten von Hostinert 216 [SCHÄFER ET AL., 1991].

Empirische Formel	C <sub>16</sub> F <sub>34</sub> O <sub>4</sub>
Molare Masse	902 g/mol
Siedepunkt (1013 mbar)	+216 °C
Schmelzpunkt	-108 °C
Viskosität (+ 20 °C)	1,84 g/cm <sup>3</sup>
Sauerstofflöslichkeit (bei 1 bar O <sub>2</sub> )	0,51 mL O <sub>2</sub> /mL
Flammpunkt	Nicht brennbar
Zündtemperatur	> 650 °C
Mischbarkeit mit H <sub>2</sub> O, EtOH	Nicht mischbar

## 7.6 HPLC-System zur Zuckerbestimmung

Die verschiedenen Zucker werden mit Hilfe des in Tabelle 7.3 aufgeführten HPLC-Systems analysiert.

**Tabelle 7-4.**

Komponenten des HPLC-Systems für die Zuckerbestimmung.

Vorsäule	Micro Guard Cation H Cartridge (BIORAD)
Trennsäule	Aminex HPX-87H (BIORAD)
Autosampler	LaChrom L-7200 (Merck Hitachi)
Pumpe	LaChrom L-1000 (Merck Hitachi)
Degasser	LaChrom L-7612 (Merck Hitachi)
Säulenofen	LaChrom L-7350 (Merck Hitachi)
RI-Detektor	LaChrom L-7490 (Merck Hitachi)
Datenaufnahme- und Steuerungssoftware	LaChrom Interface D-7000 (Merck Hitachi) D-7000 HPLC System Manager (Hitachi)

Detektiert werden die Substanzen Citronensäure ( $t_R=8,3$  min.), Glucose ( $t_R=9,4$  min.), Fructose ( $t_R=10,1$  min) und Ethanol ( $t_R=22,2$  min.). Die Trennbedingungen sind in Tabelle 7-5 dargestellt.

**Tabelle 7-5.**

Chromatographische Bedingungen der Zuckeranalyse.

Parameter	Einstellungen
Eluent	6,5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flußrate	0,6 mL/min.
Temperatur	65 °C
Injektionsvolumen	20 µL
Range (RI-Detektor)	32

## 7.7 HPLC-System zur Bestimmung der Ergotalkaloide

Die Analyse der Ergotalkaloide erfolgt mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie. Die chromatographischen Bedingungen dieser Analytik sind in Tabelle 7-6, das dazu verwendete HPLC-System in Tabelle 7-7 aufgeführt.

**Tabelle 7-6.**

Chromatographische Bedingungen der Ergotalkaloid-Bestimmung.

Parameter	Einstellungen
Eluent	55 % CH <sub>3</sub> CN, 45 % H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , 500 mg/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Flußrate	1,0 mL/min.
Temperatur	Raumtemperatur
Injektionsvolumen	20 µL
Wellenlänge (UV)	320 nm

**Tabelle 7-7.**

Komponenten des HPLC-Systems für die Ergotalkaloidanalytik.

Vorsäule	Euro BioSelect 300-5C <sub>15</sub>
Trennsäule	ET Nucleosil 100-5C <sub>18</sub> , Macherey-Nagel
Autosampler	Pharmacia LKB, Autosampler 2157, Pharmacia
Pumpe	SDS 9404, Schambeck SFD GmbH
Degasser	GT-103, Gastorr
UV-Detektor	ERC-7215, ERMA CR. Inc.
Datenaufnahme- und Steuerungssoftware	Chromatographie Datensystem ANDROMEDA 1.6 (CSW), Dr. H. Göckemeyer

## 7.8 Prozeßanalytik

### 7.8.1 pH-Wert

Der pH-Wert wird mit einer autoklavierbaren Einstabmeßkette (Fa. Mettler-Toledo) gemessen. Diese besteht aus einer Glas- und einer Vergleichselektrode, die zusammen eine galvanische Zelle bilden.

sche Kette bilden. Die eigentliche Meßgröße stellt die Spannung (Summe der Grenzflächenpotentiale in der Lösung) dar, die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Sie liefert über die Nernst'sche Gleichung den pH-Wert.

Die Elektrode wird vor dem Autoklavieren mit zwei kommerziellen Pufferlösungen (pH 4,1 und 7,0, Fa. Mettler-Toledo) kalibriert. Zwischen den einzelnen Messungen wird die Elektrode in 3 M KCl-Lösung gelagert. Zur Regenerierung wird eine kommerzielle Pepsin/HCl-Lösung (Fa. Mettler-Toledo) verwendet.

### **7.8.2 Gelöstsauerstoffgehalt**

Zur Messung des Gelöstsauerstoffgehaltes im Kulturmedium wird eine autoklavierbare Elektrode (Fa. Mettler-Toledo) eingesetzt. Der Sauerstoff-Partialdruck wird nach dem Clark-Prinzip (Polarographisches Prinzip) gemessen, wobei der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflon-Membran diffundiert. Diese Membran trennt die Meßlösung von den Elektroden (Ag-Anode und Pt-Kathode). An der Kathode wird der Sauerstoff reduziert, an der Anode Silber oxidiert.

Vor jedem Einsatz wird die Membran auf mögliche mechanische Schäden überprüft und gegebenenfalls ausgewechselt. Nach jeder Kultivierung wird die Elektrolytlösung (Fa. Mettler-Toledo) erneuert.

Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren durch eine Zwei-Punkt-Kalibration kalibriert (Details s. Kapitel 3.3).

### **7.8.3 Abgaskohlendioxid und –sauerstoff**

Die Abgasanalyse wird mit dem Abgasanalytensystem EGAS 2 der Firma Hartmann & Braun (Frankfurt a.M.) durchgeführt. Das Gesamtsystem zur Meßgasaufbereitung besteht aus dem Meßgaskühler mit Kondensatauffanggefäß zum Trocknen des Meßgases, der Meßgasfördereinheit mit Überwachung von Fluß und Feuchtigkeit und den Analysegeräten zur Messung von Kohlendioxid und Sauerstoff.

Der Sauerstoffgehalt wird elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Der Sauerstoffsensoren besteht im wesentlichen aus einer elektrochemischen Zelle mit Festelektrolyten aus sauerstoffionenleitender Zirkondioxidkeramik, auf deren Innen- und Außenfläche poröse elektronenleitende Schichten als Elektroden (Hauptbestandteil Platin) aufgebracht sind. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 0,4-1,0 V wird in der Festelektrolytzelle ein Gleichstromsignal erzeugt, das der Sauerstoffionenkonzentration des zu messenden Gases direkt proportional ist.

Ein auf Kohlendioxid sensibilisiertes, einstrahliges IR-Photometer nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen.

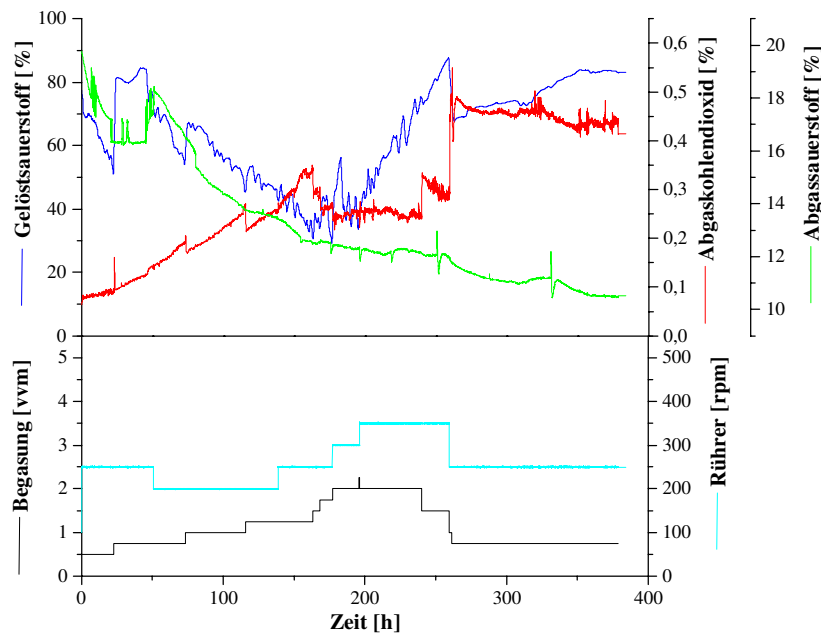
Die Kalibrierung der Analysengeräte erfolgt automatisch mit einer Kalibrationsküvette und Umgebungsluft, die mit Hilfe einer Absorptionsmittelpatrone von Wasser (mittels Blaugel)



und Kohlendioxid (mittels Natriumhydroxid auf Träger) befreit ist, oder manuell mit Prüfgas der Zusammensetzung 1,95 % CO<sub>2</sub>, 19,0 % O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>.

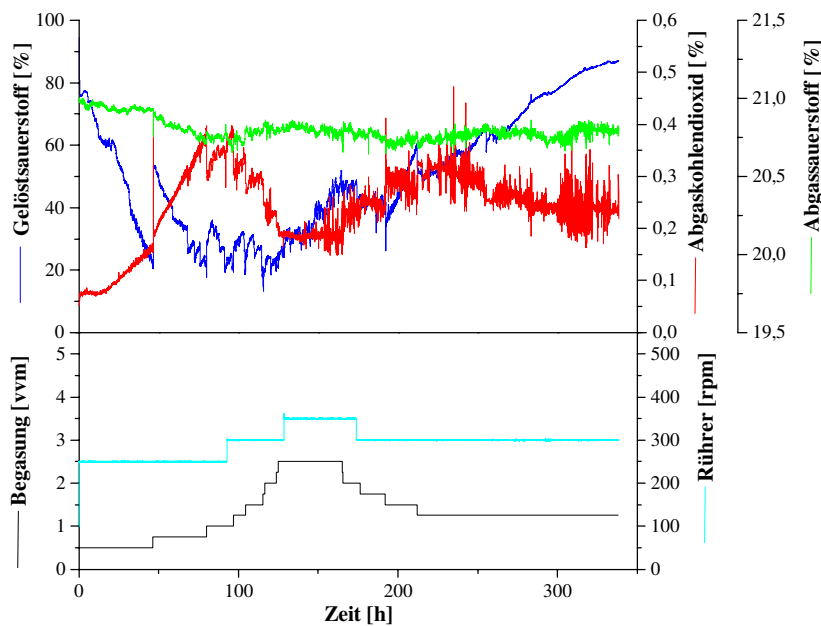
## 7.9 Abgasdaten verschiedener Bioreaktorkultivierungen

In Kapitel 4.6 wurden die on-line ermittelten Abgasdaten nicht für alle durchgeführten Kultivierungen im Bioreaktor dargestellt, da nur auf die wichtigsten Veränderungen eingegangen wurde. Der Vollständigkeit halber sind in den folgenden Abbildungen die Abgasdaten der Kultivierungen ohne Antischaummittel F1 und F2 dargestellt.



**Abbildung 7-1.**

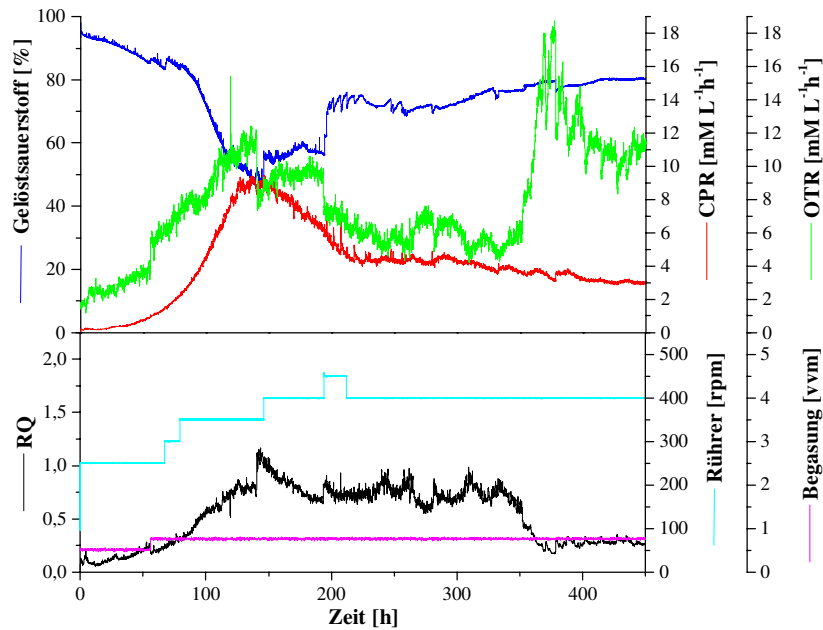
Darstellung der on-line Daten für die Kultivierung mit Scheibenrührern und ohne Antischaummittel (F1).



**Abbildung 7-2.**

Darstellung der on-line Daten für die Kultivierung mit Paddelrührern und ohne Antischaummittel (F2).

Abbildung 7-3 beinhaltet die aus den Abgasdaten berechneten Werte für CPR, OTR und RQ, sowie die Parameter Gelöstsauerstoff, Begasung und Rührergeschwindigkeit für die Kultivierung PFC 1 mit 20 % (v/v) Hostinert.



**Abbildung 7-3.**

Vergleichende Darstellung der Parameter  $pO_2$ , CPR, OTR und RQ sowie der eingestellten Rührergeschwindigkeiten und Begasungsraten für eine Kultivierung mit 20 % (v/v) Hostinert (PFC1).

## 7.10 Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
BTM	Biotrockenmasse
ca.	circa
CPR	Kohlendioxidproduktionsrate
d	Tag
Ex./Em.	Wellenlängenpaar Exzitations-/Emissionswellenlänge
g	Gramm
h	Stunde
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	Entmineralisiertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap.	Kapitel
L	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
nm	Nanometer
OTR	Sauerstoffaufnahme
PFC	perfluorierter Kohlenwasserstoff
$pO_2$	Gelöstsauerstoffgehalt

---

RFI	relative Fluoreszenzintensität
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rührerdrehzahl)
RQ	Respirationsquotient
RSD	Relative Standardabweichung
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
$t_R$	Retentionszeit
v/v	Volumenanteil
vgl	vergleiche
vvm	Volumen Gaszufuhr pro Volumen Kulturlösung und Minute

# Lebenslauf

Name Miriam Menge  
Geburtstag 22.03.1972  
Geburtsort Peine  
Familienstand ledig

## *Schulausbildung*

1978 – 1982 Grundschule Nordenham-Abbehausen und Nordenham-Atens  
1982 – 1984 Orientierungsstufe Nordenham-Mitte  
1984 – 1991 Gymnasium Nordenham, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## *Hochschulbildung*

10/1991 – 11/1996 Studium der Chemie an der Universität Hannover  
09/93 Vordiplom  
05/1996 – 11/1996 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover  
11/1996 Abschluß als Diplom-Chemikerin

## *Dissertation*

Seit 02/1997 Promotion in Technischer Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

## *Stipendium*

03/1997 – 12/1998 Inhaberin eines Stipendiums des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs „Chemische und technische Grundlagen der Naturstofftransformation“

## *Tätigkeiten*

Seit 01/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover