

## Bildung von $\alpha$ -Mannosidase durch *Arthrobacter*

Werner Hampel

Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie,  
Technische Universität Wien, A-1060 Wien, Österreich

(Eingegangen 23. Dezember 1978. Angenommen 23. April 1979)

### *Formation of $\alpha$ -Mannosidase by *Arthrobacter* sp.*

The production of yeast cell wall mannan degrading  $\alpha$ -mannosidase was studied in shake flask experiments as well as in a highly instrumented, computer-coupled bioreactor. The enzyme is predominantly excreted into the culture liquid upon submerged cultivation on yeast mannan. Only low activities were detected with mannose or glucose as carbon source whereas the enzyme formation was totally repressed by glycerol. The amount of enzyme produced is proportional to the microbial biomass formed.

Carbon-unlimited cultivation on mannose, the primary product of enzymic digestion, resulted in a specific growth rate of  $0.10 \text{ h}^{-1}$ , a specific oxygen uptake rate  $Q_{O_2} = 3.7 \text{ mmol/g} \cdot \text{h}$  and a respiratory quotient of  $RQ = 1.0$ . Addition of yeast mannan (0.5%) to nutrient-depleted bacterial cells resulted in an almost complete utilization of this substrate, with 55% of substrate carbon being converted to biomass and 37% to carbon dioxide. The yield coefficient on mannan was  $Y_{x/s} = 0.51 \text{ (g/g)}$ . Enzyme formation started with a delay of 30–40 min and stopped with termination of growth. Due to the increased production of mannose by the action of the enzyme the specific growth rate increased from 0.05 to  $0.10 \text{ h}^{-1}$ , thus enabling computations of maintenance and yield coefficients for oxygen and carbon dioxide metabolism.

(*Keywords: Arthrobacter sp.; Computer assisted cultivation; Enzyme formation;  $\alpha$ -Mannosidase; Microbial growth parameters*)

### Einleitung

Mannose-haltige Homoglykane (Mannane) sind als wichtige strukturelle Komponenten von Hefezellwänden nachgewiesen worden. Diese Polysaccharide sind hochverzweigt und bestehen aus einer  $\alpha$ -1,6-glykosidisch verknüpften Hauptkette und  $\alpha$ -1,2- bzw.  $\alpha$ -1,3-verknüpften Seitenketten. Zusätzlich können die Mannoseeinheiten der Seitenkette in 6-Stellung über Phosphodiesterbrücken miteinander verbunden sein<sup>1</sup>. Unterschiede zwischen verschiedenen Hefen finden

sich in unterschiedlichem Phosphorgehalt<sup>2</sup> oder unterschiedlichen Anteilen der  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- und  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen im Mannan. In der Hefezellwand kommt das wasserlösliche Mannan in einem Ausmaß von 40—45% vor und ist als Antigen-wirksame Komponente der Zellwand anzusehen.

Der enzymatische Abbau des Mannans erfolgt durch  $\alpha$ -Mannosidasen, die als Exoenzyme zur Bildung von Mannose führen. Derartige Enzyme sind neben  $\beta$ -Glucanasen, Proteinasen und Chitinasen Bestandteil von Zellwand-lytischen Enzymgemischen, wie sie von zahlreichen Mikroorganismen gebildet werden<sup>2-4</sup>. So ist in letzter Zeit wiederholt über verschiedene Stämme der Gattung *Arthrobacter* berichtet worden, die offensichtlich besonders hohe lytische Aktivität gegen Hefezellwandpräparationen, ja sogar gegen lebende Hefezellen aufweisen<sup>5-14</sup>.

Die Suche nach derartigen Zellwand-lytischen Enzymen ist zunächst durch das wissenschaftliche Interesse an der Herstellung von Hefeprotoplasten bzw. an den Enzymen selbst stimuliert worden, um damit die Struktur der Hefezellwand aufzuklären. Die Möglichkeit, diese Enzyme in größerer Menge herzustellen, hat auch zu Betrachtungen über Anwendungen in technischem Maßstab geführt. Die Unverdaulichkeit von mikrobiellen Zellwänden ist ein gewichtiges Problem bei der Verwendung von Mikroorganismen als Futter- und Nahrungsmittel. Es hat daher nicht an Vorschlägen gefehlt, diese Probleme zu umgehen; so wurde beispielsweise die Anwendung Zellwand-lytischer Enzympräparationen in einem Vorbehandlungsprozeß diskutiert<sup>15</sup>.

Für die Gewinnung derartiger Enzympräparationen in optimaler Ausbeute ist eine genaue Kenntnis der zur Enzymbildung führenden Bedingungen Voraussetzung. Die Verwendung Computer-gekoppelter, hochinstrumentierter Bioreaktoren bietet den Vorteil, daß nicht nur direkt meßbare Kulturparameter mit hoher Datendichte erfaßt werden können, sondern auch die Ermittlung von Prozeßvariablen aus den Meßwerten von sogenannten „Gateway“-Sensoren möglich ist<sup>16,17</sup>. In Kombination mit absatzweise durchgeführten chemischen und enzymatischen Bestimmungsverfahren können auf solche Art tiefere Einblicke in das physiologische Geschehen eines Mikroorganismus im allgemeinen bzw. in den Verlauf der Enzymbildung im speziellen gemacht werden.

Die vorliegende Arbeit soll über Experimente berichten, die dazu dienen, die Bildung von  $\alpha$ -Mannosidase durch *Arthrobacter sp.* zu studieren. Das Bakterium wurde durch Selektivkultur mit Hefemannan und Hefezellwand als einzige Kohlenstoffquelle aus Erdproben isoliert<sup>8,9</sup>.

## Material und Methoden

### *Organismenmaterial und Züchtungsbedingungen*

Die Anzüchtung des *Arthrobacter*-Stammes erfolgte in vollsynthetischer Nährlösung mit 1% Glucose als Kohlenstoffquelle unter Verwendung von 400 ml Inokulumkultur<sup>16</sup>. Die Nährlösung des Inokulums hatte folgende Zusammensetzung: 5 g/l Hefemannan, 3,5 g/l Ammonsulfat, 0,12 mol/l Kaliumphosphatpuffer *pH* 6,5, 0,2 g/l Magnesiumsulfat  $\cdot 7$  aq., 20 ml/l Spurenelementlösung<sup>18</sup>, 0,3 mg/l Biotin und 6,5 mg/l Thiaminhydrochlorid. Die Kohlenstoffquelle, die Spurenelementlösung sowie die Vitamine wurden getrennt sterilisiert bzw. durch Filtration entkeimt und unter aseptischen Bedingungen mit der Grundlösung vereinigt. Beimpft wurde mit einer Abschwemmung aus einer Schrägagarkultur und anschließend 48 h am Kreisschüttler (250 Upm., 25 mm Hub) gezüchtet.

Die Züchtung der Bakterienkultur erfolgte in einem Bioreaktor mit Standard-Turbinen Rührsystem (Labroferm F-5; New Brunswick Scientific Co.; New Brunswick, N. J.) bei 610 Upm. Rührerdrehzahl, 111.1 l/h (Mannose) bzw. 142.5 l/h (Mannan) Belüftungsrate und 30 °C Thermostatentemperatur.

Hefemannan wurde durch Extraktion mit Citratpuffer aus kommerzieller Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gewonnen und über Kupferkomplexe gereinigt<sup>19</sup>.

### *Analytische Methoden*

Wie bereits beschrieben<sup>16</sup> wurde der Bioreaktor mit *pH*-Elektrode, Gelöstsauerstoffelektrode und automatischer Alkalidosierung sowie Meßmöglichkeiten für Belüftungsrate, Abluftzusammensetzung (Sauerstoff, Kohlendioxid), Trübung, dialysierbares Gesamtkohlenhydrat (Anthrone-Methode) und Ammoniak-Stickstoff (Phenol-Hypochlorit-Methode) ausgerüstet.

Bei dem Experiment mit Mannan als Kohlenstoffquelle wurden in zeitlichen Abständen von 10 min dem Bioreaktor jeweils 10 ml Flüssigkeit händisch entnommen und in der bakterienfreien Lösung (Zentrifugation bei 12 000  $\times$  g und 10 min Dauer) das vorhandene Gesamtkohlenhydrat (Phenol-Schwefelsäure-Methode<sup>20</sup>) bestimmt.

Bestimmung der  $\alpha$ -Mannosidaseaktivität: Die Bestimmung wurde mit Hefemannan als Substrat durchgeführt. 0,7 ml gepufferte Mannanlösung (2,5 mg/ml Mannan gelöst in *M*/15-Kaliumphosphatpuffer *pH* 6,5) und 0,3 ml Kulturflüssigkeit wurden bei 30 °C vermischt und nach einer Inkubationsdauer von 30 min bzw. 60 min die Menge gebildeter reduzierender Zucker nach Farbbildung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure<sup>21</sup> photometrisch bestimmt. Als Aktivitätseinheit (Unit) wurde jene Aktivität definiert, die in einer Minute 1  $\mu$ mol Mannose freisetzt.

### *Datenerfassung*

Die Erfassung kontinuierlich gemessener Kulturparameter erfolgte mit Hilfe eines bereits ausführlich beschriebenen Systems, dessen zentrale Einheit aus einem programmierbaren Tischrechner (Hewlett Packard HP 9830) bestand<sup>22</sup>. Jede Meßstelle wurde pro Minute einmal registriert und die digitalisierten Meßwerte auf Magnetbandkassette gespeichert. Die Ergebnisse der händisch durchgeführten Bestimmungen (Enzymaktivität, Gesamtkohlenhydrat) wurden den gespeicherten Daten nachträglich durch Eintippen über die Tastatur des Tischrechners hinzugefügt.

### Ergebnisse und Diskussion

Enzymgemische zum lytischen Abbau von Hefezellwand werden bei aerober Züchtung in Nährlösungen mit Hefezellwandpräparationen oder autoklavierter bzw. lebender Hefe als Kohlenstoffquelle induktiv gebildet und in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden. Diese Gemische enthalten neben  $\beta$ -1,3-Glucanase und Proteinase in hohem Ausmaß auch  $\alpha$ -Mannosidase (1,2-1,3- $\alpha$ -D-Mannan-mannohydrolase; E. C. 3.2.1.77)<sup>1,8,14</sup>. Um nun den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Bildung der  $\alpha$ -Mannosidase zu studieren, wurden Versuche in Schüttelkultur

Tabelle 1. *Gebildete  $\alpha$ -Mannosidasemenge und Biomasse bei submerser Züchtung von *Arthrobacter* sp. auf verschiedenen Kohlenstoffquellen*

Kohlenstoffquelle 0,5%	$\alpha$ -Mannosidase- aktivität U/l	gebildete Biomasse g/l	Ausbeutekoeffizient $Y_{x/s}$	
			g/g	g/g-Atom C
Lebende Bäckerhefe <sup>a</sup>	45	n. b. <sup>b</sup>	—	—
Autoklavierte Bäckerhefe <sup>a</sup>	38	n. b. <sup>b</sup>	—	—
Hefezellwand	119	2,46	0,493	13,3
Hefemannan	169	2,33	0,467	12,6
Mannose	22	2,20	0,440	13,2
Glucosemonohydrat	13	2,18	0,436	14,4
Glycerin	0	2,80	0,559	17,2

<sup>a</sup> In 0,5% Trockensubstanz äquivalenter Menge.

<sup>b</sup> n. b. = nicht bestimmt.

unternommen. Neben den nach 48 h Kulturdauer gebildeten Enzymmengen sind in Tab. 1 — soweit sinnvoll — auch die gebildete Biomasse und der Ausbeutekoeffizient angegeben. Wie ersichtlich bewirken vor allem die polymeren Kohlenhydrate der Hefezellwand die Bildung von  $\alpha$ -Mannosidase in erhöhtem Ausmaß. Interessanterweise werden jedoch auch bei Züchtung auf den Monosacchariden Glucose und Mannose geringe Enzymmengen in die Nährlösung ausgeschieden. Hingegen wird durch Glycerin als Kohlenstoffquelle die Bildung von  $\alpha$ -Mannosidase vollständig reprimiert. Die Mengen an gebildeter Biomasse und die ermittelten Ausbeutekoeffizienten entsprechen etwa den mit anderen *Arthrobacter*-Stämmen und vergleichbaren Substraten gefundenen Werten<sup>1, 12, 14</sup>.

Um den Einfluß der Konzentration der Kohlenhydratquelle auf die Enzyymbildung zu untersuchen, erfolgten submerse Kultivierungen des

Bakteriums mit steigenden Konzentrationen an Hefemannan. Zur Verhinderung eines zu starken Abfalls des  $pH$ -Wertes — verursacht durch Assimilation der physiologisch sauren Stickstoffquelle — bzw. zum Vermeiden einer Stickstofflimitierung wurde in den Nährlösungen die Menge an Phosphat bzw. Ammonsulfat verdoppelt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe nach 48 h Kulturdauer sind in Tab. 2 wiedergegeben. Mit zunehmender Mannankonzentration steigt auch die Menge an gebildeter Bakterienmasse. Der Ausbeutekoeffizient ist hierbei jedoch nicht konstant, sondern zeigt mit steigender Biomassekonzentration eine leicht fallende Tendenz. Auch die Menge an

Tabelle 2. *Einfluß der Konzentration der Kohlenstoffquelle auf die Bildung von  $\alpha$ -Mannosidase und Biomasse*

Mannan	gebildete Biomasse	Ausbeute koeffizient	$pH$ -Wert zu Züchtungs- ende	$\alpha$ -Mannosidase	
g/l	g/l	g/g		U/l	U/g
2,4	1,15	0,48	6,85	63	55
5,0	2,35	0,47	6,80	142	60
7,2	3,10	0,43	6,70	214	69
10,0	4,32	0,43	6,60	293	68
12,8	5,63	0,44	6,40	365	65

gebildeter  $\alpha$ -Mannosidase erhöht sich mit zunehmender Konzentration des Hefemannans. Die Werte des Enzymbildungskoeffizienten — gebildete Einheiten Enzym pro g gebildeter Biomasse — deuten in ihrer Korrelation zur Konzentration der Kohlenstoffquelle eine Sättigungscharakteristik an. Das Auftreten eines derartigen Zusammenhanges ist für induzierbare Enzyme nachgewiesen worden<sup>23,24</sup>. Untersuchungen über die Wirkungsweise von  $\alpha$ -Mannosidase unter Verwendung gereinigter Enzympräparate aus *Arthrobacter GJM-1* haben ergeben<sup>1</sup>, daß das Enzym vorwiegend 1,2- und 1,3- $\alpha$ -glykosidische Bindungen in Hefemannan unter Freisetzung von Mannose hydrolysiert. Auch mit Enzympräparaten aus Kulturflüssigkeiten des hier verwendeten *Arthrobacter*-Stammes konnte in orientierenden Versuchen die vorwiegende Bildung von Monosacchariden beim lytischen Abbau von Hefezellwand gezeigt werden<sup>25</sup>. Somit sind Kenntnisse über die Verwertung von Mannose durch das untersuchte Bakterium notwendige Voraussetzungen für die Interpretation von Resultaten, die bei Züchtung auf Hefemannan erhalten werden. Aus diesem Grunde wurde zunächst der Versuch unternommen, das physiologische Verhalten von

*Arthrobacter sp.* in Nährlösungen mit Mannose als einzige Kohlenstoffquelle aufzuklären.

Hiezu diente eine — nach Anzüchtung auf 45 g Glucose — substratverarmte Kultur des Bakteriums, der 15 g Mannose (gelöst in 50 ml Wasser) plötzlich zugesetzt wurden. Der Verlauf der gemessenen Versuchsparameter in der anschließenden weiteren Kulturentwicklung ist graphisch in Abb. 1 wiedergegeben und zeigt ein ähnliches Bild wie bei Zusatz von Glucose zu einer substratverarmten Züchtung<sup>16</sup>. Das zugesetzte Kohlenhydrat wird ohne Adaptationsphase sofort aufgenommen. Eine spezifische Zuckeraufnahmerate von  $Q_s = 0,73 \text{ mmol/h} \cdot \text{g TS}$  wurde für Mannose zu Versuchsbeginn ermittelt\*; dies ist annähernd ein Viertel des für Glucose unter vergleichbaren Bedingungen gefundenen Wertes<sup>16</sup>. Aus dem Verlauf der Atmungsgrößen (Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung, Atmungsquotient) ist weiters erkennbar, daß in der ersten Phase der Kultivierung noch nicht die volle Atmungskapazität der Bakterienkultur vorliegt; diese wird erst nach 30 Minuten Versuchsdauer erreicht. Somit liegt vor diesem Zeitpunkt bei voll ausgebildeter Zuckeraufnahme eine erniedrigte Substratzehrung vor, so daß es zur intrazellulären Anhäufung von Metaboliten kommt. Die volle Atmungskapazität beträgt auf Mannose  $Q_{\text{CO}_2} = 3,7 \text{ mmol/h} \cdot \text{g TS}$  bei einem Respirationsquotienten von 1,0. Vergleichsweise wurden für Glucose als Kohlenstoffquelle um 50% höhere Atmungskoeffizienten gefunden<sup>16</sup>. Mit Erschöpfen des Kohlenhydrats sinkt die Atmung rasch ab. In dieser Phase der Verwertung intrazellulärer Verbindungen steigt der Atmungsquotient vorübergehend auf 1,2, was auf einen Abbau von Carboxylgruppen-hältigen Metaboliten (e.g. Zuckersäuren, Verbindungen des Citronensäurecyclus, etc.) schließen läßt.

Auf Grund von Bilanzierungen ist errechenbar, daß 46,5% des Kohlenhydratkohlenstoffs veratmet und 50,1% in Bakterientrockensubstanz übergeführt werden (Elementaranalyse der Trockensubstanz: 42,71% Kohlenstoff, 6,66% Wasserstoff, 10,43% Stickstoff, 1,87% Phosphor); eine Menge von 4,4% des Substratkohlenstoffs konnte zudem durch Bestimmung des *TOC*-Wertes in der Kulturlösung aufgefunden werden. Damit ergeben sich die Ausbeutekoeffizienten für Mannose mit  $Y_{x/s} = 84,4$  (g Trockensubstanz pro mol Mannose) und  $Y_{x/o} = 14,9$  (g Trockensubstanz pro g-Atom verbrauchtem Sauerstoff).

---

\* Verwendete Abkürzungen: *DO* = Gelöstsauerstoff, *S* = Zucker, *GKH* = Gesamtkohlenhydrat, *RQ* = Atmungsquotient, *TS* = Trockensubstanz, *KOH* = zudosiertes Alkali, *CER* = Kohlendioxidbildungsrate, *GR* = Wachstumsrate, *SUR* = Zuckeraufnahmerate, *NUR* = Stickstoffaufnahme, *AFR* = Säurebildungsrate, *EFR* = Enzymbildungsrate,  $\mu_N$  = spezifische Stickstoffeinbaureate,  $\mu_t$  = spezifische Wachstumsrate.

ORDINATENSKALA :  
Versuchsparameter

Ordinatskala  
von bis

000000	pH-Wert	5,5
000000	Gelbstauerstoff (% s.Sat.)	100,0
000000	Abluft-CO <sub>2</sub> (Vol-%)	0,0
000000	Atmungsquotient (RQ)	2,0
000000	Trockersubstanz (g/l)	1,5
000000	Gesamtstickstoffwert (g/l)	2,0
000000	ammoniakalischer Stickstoffwert (g/l)	0,0
000000	zudosierte Kallilauge (mval/l)	100,0

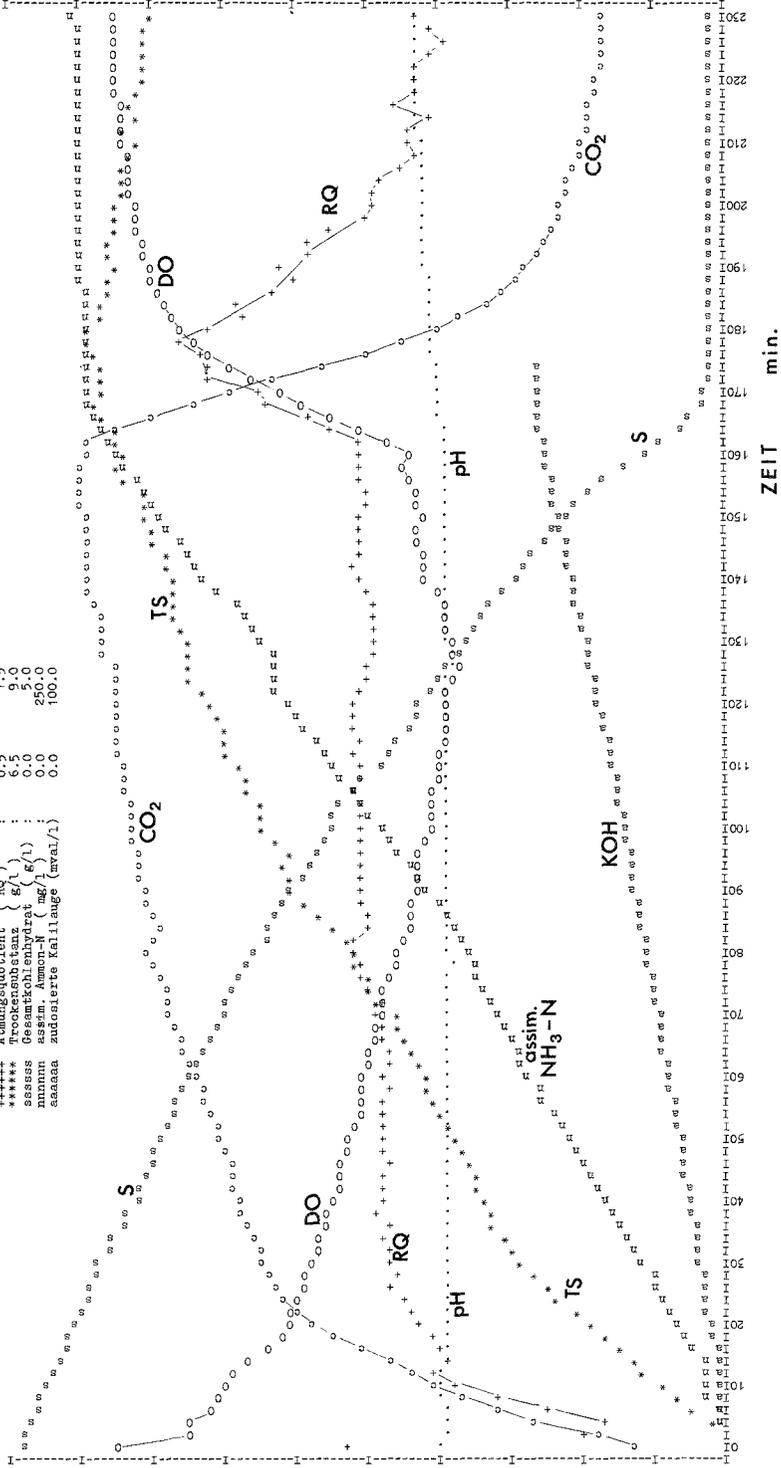


Abb. 1. Verlauf der Kulturparameter nach Dosierung von 0,5% Mannose zu einer substratverarmten Kultur von *Arthrobacter sp.*

Keine Übereinstimmung war zwischen der assimilierten Ammoniak-Stickstoffmenge (17,7 mg-Atom N/l) und der zur Aufrechterhaltung des  $pH$ -Wertes notwendigen, zudosierten Alkalimenge (26,2 mval/l) zu beobachten. Die wesentlich erhöhte Alkalimenge ist offenbar darauf zurückzuführen, daß sauer reagierende Stoffwechselprodukte gebildet werden. Diese können sowohl intrazellulär gespeichert oder extrazellulär mit der Bakterienzelle assoziiert sein<sup>26</sup>, als auch in das Kulturmedium ausgeschieden werden.

Unter Verwendung von Regressionspolynomen ermittelte Kulturparameter sind für den Bereich der Zellvermehrung in Abb. 2 gezeigt. Daneben ist noch die aus der Abluftzusammensetzung und der Belüftungsrate berechnete Kohlendioxidbildungsrate ( $CER$ ) sowie die spezifische Wachstumsrate ( $\mu_t$ ) und die auf den Gesamtstickstoffgehalt bezogene Stickstoffeinbaurrate ( $\mu_N$ ) wiedergegeben. Letztere hatte während der gesamten Wachstumsphase einen konstanten Wert von  $0,103 \text{ h}^{-1}$ . Die spezifische Wachstumsrate ( $\mu_t$ ) ist unmittelbar nach Zusatz der Mannose infolge intrazellulärer Substratanhäufung verhältnismäßig groß. Zu diesem Zeitpunkt besitzt die Bakterienzelle wohl eine voll ausgebildete Zuckeraufnahme, jedoch nur beschränkte Atmungsfähigkeit. Erst nach 40 min Versuchsdauer entspricht die spezifische Wachstumsrate annähernd der Stickstoffeinbaurrate und fällt schließlich im letzten Drittel der Wachstumsphase weiter ab.

Die Zuckeraufnahmerate zeigt im Verlauf der Züchtung eine wesentlich stärkere relative Zunahme als es dem Wachstum entspricht; sie steigt ferner knapp vor Ende der Wachstumsphase plötzlich an. Dieser Verlauf ist eventuell auf regulatorische Effekte im zellulären Zuckeraufnahmemechanismus zurückführbar. Stickstoffaufnahmerate ( $NUR$ ) und Säurebildungsrate ( $AFR$ ) zeigen eine dem Wachstum entsprechende Zunahme.

Um nun die durch Hefemannan induzierte Enzymbildung mit physiologisch gleichartigen Organisationsmaterial studieren zu können, wurde zunächst das Bakterium erneut mit 30 g Glucosemonohydrat als Kohlenstoffquelle hergeführt und anschließend ebenfalls substratverarmt (Kulturflüssigkeitsvolumen: 3,33 l). Dieser Bakterienkultur wurden 15 g Hefemannan (gelöst in 100 ml Wasser) zugesetzt. Neben den kontinuierlich gemessenen Kulturparametern ( $pH$ , Abluftzusammensetzung, zudosierte Alkalimenge, Konzentration an niedermolekularem Kohlenhydrat, Ammoniak-Stickstoff und Gelöstsauerstoff) wurden in Zeitabständen von 10 min jeweils 10 ml Kulturflüssigkeit entnommen und in der bakterienfreien Lösung Gesamtkohlenhydrat sowie  $\alpha$ -Mannosidaseaktivität bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Kulturvariablen ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Das zugesetzte Hefemannan (äquivalent 4,50 g/l Mannose) wird

innerhalb von 310 min fast vollständig verwertet, wobei 2,23 g/l-Bakterienmasse gebildet werden. Hieraus berechnet sich der Ausbeutekoeffizient mit  $Y_{x/s} = 0,51$  (g gebildete Bakterientrockensubstanz pro g verwertetes Mannan). Unter Verwendung des Ergebnisses der Elementaranalyse eines zu Wachstumsende isolierten Bakterien-

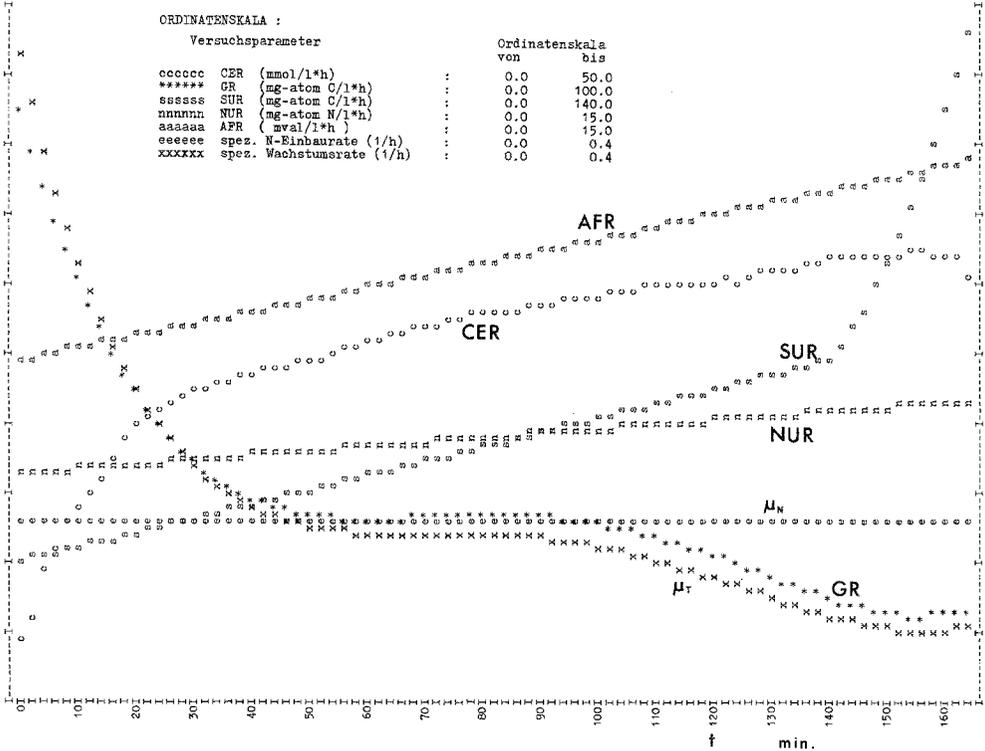


Abb. 2. Metabolische Raten in der Wachstumsphase von *Arthrobacter sp.* auf 0,5% Mannose

trockenpräparates (44,82% Kohlenstoff, 6,25% Wasserstoff, 11,03% Stickstoff, 2,50% Phosphor) ist berechenbar, daß 55,3% des Substratkohlenstoffs in Biomasse übergeführt werden. Eine Menge von 56,2 mmol/l (d. s. 37,3% des Substratkohlenstoffs) wird weiters als Kohlendioxid in die Gasphase abgegeben; dies ergab sich durch numerische Integration des zeitlichen Verlaufs des Kohlendioxid-

gehalten in der Fermenterabluft. In der Kulturflüssigkeit wurde zum Versuchszeitpunkt  $t = 340$  min ein *TOC*-Gehalt von 103 mg C/l bzw. ein Gehalt an hochmolekularem (nichtdialysierbarem) Gesamtkohlenhydrat von 0,23 g/l (berechnet als Mannose) analytisch festgestellt; somit sind offenbar 5,5% des Mannan-Kohlenstoffs bis zu diesem Zeitpunkt unverwertet geblieben.

Für die Verwertung des Hefemannans wurden 59,6 mmol/l Sauerstoff aus der Luft aufgenommen, womit sich der auf Sauerstoff bezogene Ausbeutekoeffizient mit  $Y_{x/o} = 18,7$  (g Biomasse pro g-Atom verbrauchtem Sauerstoff) ergibt, sowie ein durchschnittlicher Atmungsquotient von  $RQ = 0,94$  errechnet.

In der Wachstumsphase assimilierte das Bakterium ferner 17,5 mg-Atom N/l aus physiologisch sauren Ammonsalzen, so daß zur Aufrechterhaltung des *pH* in der Kulturflüssigkeit Alkali zudosiert werden mußte (16,4 mval/l).

Niedermolekulares (dialysierbares) Kohlenhydrat war nur zu Beginn des Versuches, unmittelbar nach Zusatz des Hefemannans, mit einer maximalen Konzentration von 0,26 g/l (berechnet als Mannose) nachweisbar. Dieses offenbar in der Hefemannanpräparation als Verunreinigung enthaltene Kohlenhydrat wurde innerhalb von 30 min assimiliert. Im weiteren Verlauf des Versuches konnten mit der verwendeten Analysenmethodik (Nachweisgrenze bei etwa 50 mg Mannose/l) keine niedermolekularen Kohlenhydrate nachgewiesen werden, so daß die weitere Entwicklung des Bakteriums unter Limitierung durch das assimilierbare Kohlenhydrat erfolgte. Eine Konzentration von 28 U/l an  $\alpha$ -Mannosidase wurde bereits zu Versuchsbeginn aufgefunden. Diese Enzymmenge ist offenbar bereits während der Herführung des Bakteriums in die Nährlösung ausgeschieden worden. Mit Beendigung des Wachstums konnte eine Enzymkonzentration von 154 U/l gemessen werden; so daß sich aus diesem Versuch der Enzymbildungskoeffizient mit  $Y_{p/x} = 56,5$  (Aktivitätseinheiten an gebildetem Enzym pro g gebildeter Biomasse) ergibt.

Die durch Anpassung von Polynomen ermittelten Stoffwechselraten (Wachstumsrate, Stickstoffaufnahme, Säurebildungsrate, Enzymbildungsrate) und die spezifische Wachstumsrate ( $\mu_t$ ) bzw. die auf den Stickstoffgehalt der Biomasse bezogene Stickstoffeinbaurrate ( $\mu_N$ ) sind graphisch in Abb. 4 wiedergegeben. In den ersten 90 min des Versuches sind bei Vergleich der Stoffwechselraten miteinander größere Unterschiede erkennbar, die offenbar durch das Vorliegen niedermolekularer, sofort assimilierbarer Kohlenhydrate im zugesetzten Hefemannan verursacht sind. Ähnlich wie bei Züchtung auf Monosacchariden tritt hier eine rasche Zunahme der Biomasse ein, die vermutlich vorwiegend auf die Bildung von Speicherkohlenhydraten zurückführbar ist. Es liegt

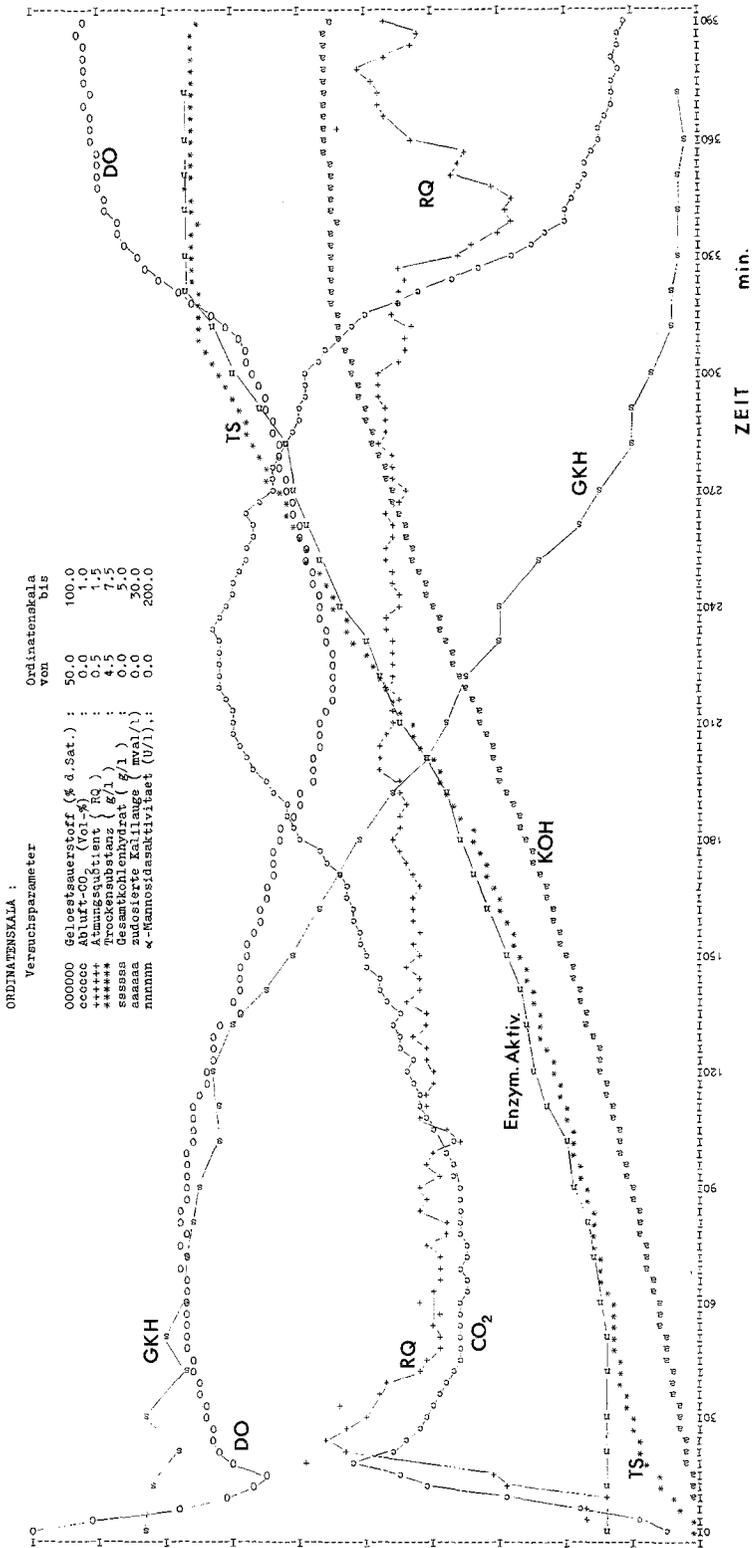


Abb. 3. Verlauf verschiedener Kulturparameter nach Dosierung von 0,5% Hefemannan zu einer substratverarmten Kultur von *Arthroabacter sp.*

somit zunächst keine Limitierung des Wachstums durch assimilierbare Kohlenhydrate vor. Jedoch ist die eingebrachte Menge an niedermolekularem Kohlenhydrat sehr gering, so daß infolge der hohen Bakterien-dichte diese Kohlenstoffquelle sehr bald verbraucht ist. Weitere Bildung von assimilierbaren Zuckern erfolgt aus dem hochmolekularen Hefemannan durch Wirkung der  $\alpha$ -Mannosidase. Die vorhandene Enzymmenge ist jedoch zunächst noch gering, so daß das Bakterienwachstum durch die Geschwindigkeit der Mannosebildung begrenzt ist. Ab diesem Zeitpunkt zeigen die Stoffwechselraten einen nahezu gleichförmigen Verlauf. Durch die nun einsetzende Bildung von  $\alpha$ -Mannosidase wird vermehrt assimilierbares Kohlenhydrat gebildet und demzufolge erhöht sich auch die spezifische Wachstumsrate des Mikroorganismus. Dies konnte bis zu einem Wert von  $\mu = 0,105 \text{ h}^{-1}$  nachgewiesen werden.

Mit dem Erreichen einer solchen spezifischen Wachstumsrate — dieser Wert gibt das auf Mannose maximal erzielbare Wachstum an — wird durch die vorhandene  $\alpha$ -Mannosidase bereits soviel an Mannose gebildet wie die Bakterien maximal verwerten können. Ab diesem Zeitpunkt tritt jedoch offenbar eine zunehmende Verminderung der Enzymwirkung ein, da bei weiterhin steigender Enzymkonzentration die Stoffwechselraten absinken. Wie Untersuchungen mit gereinigten Präparaten von  $\alpha$ -Mannosidase aus *Arthrobacter* ergeben haben<sup>1</sup>, ist dieses Enzym nur befähigt, die  $\alpha$ -1,2- und  $\alpha$ -1,3-glycosidisch verknüpften Seitenketten des Mannan zu hydrolysieren, jedoch nicht das  $\alpha$ -1,6-verknüpfte Grundgerüst zu spalten. Mit Hefemannan als Substrat war daher nur ein 64%iger Abbau erreichbar.

In der hier beschriebenen Züchtung ist das zugesetzte Mannan zum Versuchszeitpunkt  $t = 210 \text{ min}$  zu 55—60% verwertet. Dieses Ausmaß der Umsetzung und die Befunde von Jones und Ballou<sup>1</sup> unterstützen die Annahme, daß die verminderte Enzymwirkung auf einen weitgehenden Abbau der Seitenketten des Hefemannans zurückführbar ist und somit eine Sättigung der  $\alpha$ -Mannosidase mit adäquatem Substrat nicht mehr gegeben ist. Die hydrolytische Spaltung der Hauptkette des Hefemannans, das ja in diesem Experiment zu 95% verwertet wird, erfolgt anscheinend durch andere, bisher noch nicht untersuchte und charakterisierte Enzyme. Einen Hinweis hierauf haben auch electrophoretische Untersuchungen von Kulturfiltraten aus Züchtungen von *Arthrobacter* gebracht<sup>25</sup>.

Da im vorliegenden Versuch keine Nebenprodukte in nennenswertem Ausmaß gebildet werden und zudem durch Limitierung des assimilierten Kohlenhydrats die spezifische Wachstumsrate im Bereich von 0,05 bis  $0,105 \text{ h}^{-1}$  verändert werden konnte, wurde versucht, die Korrelation zwischen den spezifischen Gasstoffwechselkoeffizienten

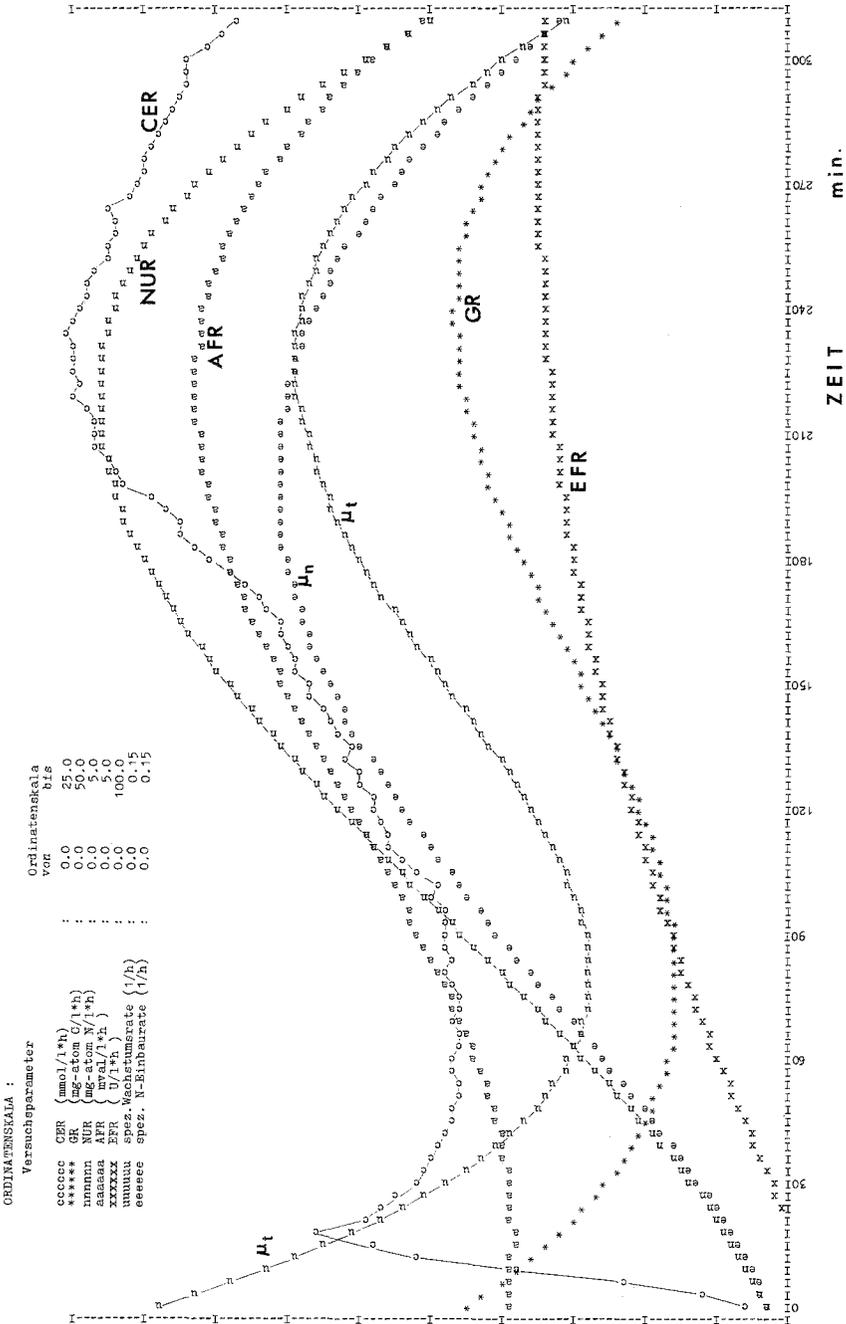


Abb. 4. Metabolische Raten in der Wachstumsphase von *Arthrobacter sp.* auf 0,5% Hefemanna

( $Q_{O_2}$ ,  $Q_{CO_2}$ ) und der spezifischen Wachstumsrate ( $\mu_t$ ) herzustellen<sup>26</sup> gemäß:

$$Q_{CO_2} = m_{CO_2} + \frac{1}{Y_{x/CO_2}} \cdot \mu$$

Hierin ist  $m$  der Koeffizient, der den Anteil des endogenen Stoffwechsels an der Atmung wiedergibt (mmol  $CO_2/g \cdot h$ ), während  $\mu/Y_{x/CO_2}$  den Anteil für die Bildung von Biomasse darstellt.

Durch Quasilinearisierung<sup>28</sup> konnte im Bereich von  $t = 30$  bis 320 min Versuchsdauer diese Korrelation sowohl für  $Q_{O_2}$  als auch für  $Q_{CO_2}$  sichergestellt und folgende Koeffizienten berechnet werden:

$$\begin{aligned} \text{Kohlendioxid: } m_{CO_2} &= 0,57 \text{ mmol/g} \cdot h \\ Y_{x/CO_2} &= 55,3 \text{ g/mol.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Sauerstoff: } m_{O_2} &= 0,77 \text{ mmol/g} \cdot h \\ Y_{x/O_2} &= 58,8 \text{ g/mol.} \end{aligned}$$

Diese Koeffizienten ermöglichen die indirekte Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate bzw. der Veränderung der Zellkonzentration bei Messung der Abluftzusammensetzung von einem Bioreaktor<sup>29</sup>. Hierdurch ist es möglich, die gebildete Biomasse annähernd zu ermitteln, vor allem dann, wenn infolge fester Nährmediumbestandteile oder stark gefärbter Kulturlösungen, eine Anwendung turbidometrischer und gravimetrischer Methoden zur Bestimmung der Biomasse nicht möglich ist.

### Literatur

- 1 H. J. Jones und C. E. Ballou, J. Biol. Chem. **244**, 1043 (1969).
- 2 H. J. Phaff, in: The Yeasts, Vol. 2 (A. H. Rose und J. S. Harrison, Hrsg.), S. 135—210. Academic Press. 1971.
- 3 T. Sugimori, Y. Uchida und Y. Tsukada, Agric. biol. Chem. **36**, 669 (1972).
- 4 D. Blechschmidt und R. Tröger, Z. allgem. Mikrob. **14**, 245 (1974).
- 5 K. Doi, A. K. Doi und T. Fukui, J. Biochem. (Tokyo) **70**, 711 (1971).
- 6 K. Kitamura, T. Kaneko und Y. Yamamoto, Arch. Biochem. Biophys. **145**, 402 (1971).
- 7 T. Kaneko, K. Kitamura und Y. Yamamoto, Agric. biol. Chem. **36**, 2589 (1972).
- 8 W. Klinger, Dissertation, Techn. Univ. Wien 1972.
- 9 W. Klinger und M. Röhr, Zbl. Bakt., I. Ref. **230**, 397 (1972).
- 10 J. Müllner und M. Röhr, Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Yeast Symp., Vienna (H. Klaushofer und U. B. Sleytr, Hrsg.), Institute of Food Technol., Univ. Agriculture, B 22 (1974).
- 11 J. Müllner und M. Röhr, Zbl. Bakt., I. Ref. **240**, 299 (1974).
- 12 B. I. Rowley und A. T. Bull, Biotechn. Bioeng. **19**, 879 (1977).
- 13 M. Vrsanska, Z. Kratky und B. Biely, Z. allgem. Mikrobiol. **17**, 391 (1977).
- 14 M. Vrsanska, P. Biely und Z. Kratky, Z. allgem. Mikrobiol. **17**, 465 (1977).
- 15 C. O. Carenberg und C. G. Heden, Biotechn. Bioeng. **12**, 167 (1970).
- 16 W. Hampel, Mitt. Versuchsst. Gärungsgew. Wien **33**, im Druck.

- <sup>17</sup> *W. Hampel, W. Wöhler, H. P. Bach und M. Röhr*, Mitt. Versuchsst. Gärungsgew. Wien **33**, 13 (1979).
- <sup>18</sup> *E. A. Wolin, M. J. Wolin und R. S. Wolfe*, J. biol. Chem. **238**, 2882 (1963).
- <sup>19</sup> *S. Peat, W. J. Whelan und T. E. Edwards*, J. Chem. Soc. **29**, 34 (1961).
- <sup>20</sup> *M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers und F. Smith*, Anal. Chem. **28**, 350 (1956).
- <sup>21</sup> *L. Miller*, Anal. Chem. **31**, 426 (1959).
- <sup>22</sup> *W. Hampel, H. P. Bach und M. Röhr*: Workshop Computer Applications in Fermentation Technology 1976 (R.P. Jefferis, Hrsg.), S. 47. Weinheim: Verlag Chemie. 1977.
- <sup>23</sup> *B. G. Haughton und H. K. King*, Biochem. J. **80**, 268 (1961).
- <sup>24</sup> *M. Röhr und W. Hampel*, Mh. Chem. **97**, 1787 (1966).
- <sup>25</sup> *J. Müllner*, Dissertation Techn. Univ. Wien 1976.
- <sup>26</sup> *J. Preiss*, J. biol. Chem. **239**, 3119 (1963).
- <sup>27</sup> *S. J. Pirt*, Principles of Microbe and Cell Cultivation. Oxford: Blackwell. 1975.
- <sup>28</sup> *M. Reuss, R. P. Jefferis und J. Lehmann*: Workshop Computer Applications in Fermentation Technology 1976 (R.P. Jefferis, Hrsg.), S. 107. Weinheim: Verlag Chemie. 1977.
- <sup>29</sup> *D. W. Zabriskie und A. E. Humphrey*. AIChE Journal **24**, 138 (1978).