



In Kooperation mit:



Bericht

Thema:

**Aufbau, Charakterisierung, Integration und
Optimierung einer Anlage zur kontinuierlichen
Kultivierung von Mikroorganismen mit
integrierter Abgas, pH und Gelöstsauerstoff
Onlinemessung**

von:

David Bittner

erstellt am: 24.10.2011

Betreuung:

Prof. Dr. Ing. Frank Eiden

Dr. Holger Müller (Blue Sens gas Sensor GmbH)

Inhalt

1	Einleitung	3
2	Problemstellung und Zielsetzung	4
3	Struktur der Arbeit.....	4
4	Theoretische Grundlagen / Stand des Wissens	5
4.1	Organismus und Reaktoren	5
4.2	Sensorik	6
5	Material und Methoden.....	9
5.1	Geräte:	9
5.2	Chemikalien	9
5.3	Kulturbedingungen.....	10
5.4	Analysenmethoden	10
5.5	Fermenter Abbildung:	13
6	Versuchsdurchführung Ergebnisse und Diskussion	15
6.1	kLa Wertbestimmung mit der Natriumsulfitmethode	15
6.1.1	Durchführung.....	15
6.1.2	Ergebnisse	16
6.1.3	Interpretation	17
6.1.4	Fehlerbetrachtung	19
6.1.5	Fazit kLa Wertbestimmung	19
6.2	Fermentation	19
6.2.1	aerobe Fermentation	20
6.2.1.1	Durchführung	20
6.2.1.2	Ergebnisse	20
6.2.1.3	Interpretation	23
6.2.2	anaerobe Fermentation	26
6.2.2.1	Durchführung	26
6.2.2.2	Ergebnisse	26
6.2.2.3	Interpretation	27
6.2.3	Fehlerbetrachtung	28
6.2.4	Fazit Fermentation	30
6.3	Regulation und Prozessoptimierung	30
6.3.1	pH Regulation mit NaOH	30
6.3.1.1	Durchführung	31
6.3.1.2	Ergebnisse	31
6.3.1.3	Interpretation	33
6.3.2	fedbatch-Fermentation mit Glucose	34
6.3.2.1	Durchführung	34
6.3.2.2	Ergebnisse	34
6.3.2.3	Interpretation	35
6.3.3	Prozessoptimierung durch pH Regulation und gleichzeitiger fedbatch-Fermentation	35
6.3.3.1	Durchführung	35
6.3.3.2	Ergebnisse	36
6.3.3.3	Interpretation	37
6.3.4	Fehlerbetrachtung Prozessoptimierung	37
6.3.5	Fazit Prozessoptimierung	38
7	Zusammenfassung, Schlussbetrachtung und Ausblick	38
7.1	Zusammenfassung & Schlussbetrachtung	38
7.2	Ausblick	39
8	Danksagung	40
9	Literaturverzeichnis	41

1 Einleitung

In der Biotechnologie und Bioprozesstechnik wird die Fermentation für die Anzucht und Nutzung von Mikroorganismen zur Gewinnung von Metaboliten genutzt. Diese stellen im Rahmen ihres Wachstums Stoffwechselprodukte aus Substraten, für eine Vielzahl von unterschiedlichen Verwendungszwecken her. Diese Produkte werden von den unterschiedlichsten Institutionen benötigt und finden dort ihre Verwendung. Die Bandbreite reicht dabei von der Lebensmittel- über die Pharma- und Kosmetik- bis hin zur Chemieindustrie aber auch Umweltanalytik und Getränkeherstellung und viele weitere profitieren von den Möglichkeiten der Biotechnologie. Da einige Prozesse teilweise wesentlich kostengünstigere Synthesemethoden bereitstellen aber auch im Hinblick auf die Schonung der Umwelt gegenüber der Petrochemie im Vorteil sind ist die Forschung und Entwicklung im Bereich Biotechnologie heutzutage geradezu unerlässlich geworden. [1; 3-6; 8; 9; 22]

Die Fermentation wird in Bioreaktoren durchgeführt, welche es in den unterschiedlichsten Variationen Größen und Arbeitsweisen gibt. In der Industrie werden Große Bioreaktoren genutzt um eine möglichst große Ausbeute der gewünschten Metabolite zu erzielen. Die dort verwendeten Prozesse wurden schon weit im Vorfeld erforscht, optimiert und auf den Großen Maßstab übertragen. [3; 22]

Im kleineren Labormaßstab hingegen, werden neue Prozesse ausgetestet und entwickelt. Die gängigsten Bioreaktoren sind kleine Glasfermenter im Maßstab bis zu 10 Litern. Dabei handelt es sich um Glasgefäße welche meist doppelwandig sind um eine Temperierung des Nährmediums zu ermöglichen. In diesen Gefäßen befinden sich entweder spezielle Rührwerke, welche das Medium rühren um eine optimale Sauerstoffversorgung und eine Durchmischung des Mediums zu gewährleisten, oder aber die Gefäße stehen selbst auf Magnetischen Rührplatten, welche einen magnetischen Rührfisch rotieren lassen und die Durchmischung des Mediums zu erzielen. [20-22]

Eine andere Art ist die Nutzung von sogenannten Schüttelkolben. Im klassischen Sinne sind dies Erlenmeyerkolben in den unterschiedlichsten Größen, welche in einem Maßstab zwischen 0,2 und 2 Litern liegen. Diese werden dann auf Schüttlern befestigt, um so durch Einstellung der Schüttelrate eine Durchmischung des Mediums zu gewährleisten. Das Schütteln ist die schonendste Art der Durchmischung, da zusätzliche mechanische Scherkräfte durch Rührwerke ausbleiben. [1; 3-6] Schüttelkolben werden gern genutzt um neue Prozesse zu erforschen, ohne dabei große Mengen an teuren Nährmedien verbrauchen zu müssen. Diese Kolben gibt es in speziellen Ausfertigungen um einen Anschluss von Sensoren zur Kontrolle des Prozesses zu ermöglichen. Je nach Prozess und Art des Mikroorganismus ist es dabei wichtig, Abgas- (O_2 , CO_2 , CH_4 etc.), pH-, Gelöstsauerstoffwerte oder aber auch spezielle Parameter wie z.B. die Konzentration von Ethanol zu messen und anhand dieser Daten einen direkten Einblick in den Verlauf des Prozesses zu gewinnen um diesen dann zu kontrollieren und ggf. zu optimieren. [11-14]

Um neue Prozesse und Systeme zu entwickeln, nutzt man häufig Modellorganismen. Über diese Organismen wurden in der Regel schon viele Informationen durch ausgiebige Versuchsreihen gesammelt. So ist von dem in dieser Versuchsreihe genutzten Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bereits das komplette Genom, sowie Stoffwechselwege bei den unterschiedlichsten Versuchsbedingungen bekannt. Dies vereinfacht eine optimale Nutzung und Auswertung der erhaltenen Werte. [2]

Messungen von pH-Wert und Gelöstsauerstoff waren bisher mit dem von der Firma BlueSens gassensor GmbH entwickelten System nicht möglich, da deren Hauptfokus auf der Abgasanalytik lag. Schwerpunkt der Arbeit war, herauszufinden wie man die Online Messung und Integration der neuen Messparameter am besten in das vorhandene System einbinden kann und welchen Vorteil eine integrierte Messtechnik für Prozessoptimierung zeigt.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Schwerpunkt des Forschungsprojektes war, ein bereits entwickeltes System für die Fermentation mit integrierter Messtechnik, einer Schüttelplatte der Firma BlueSens Gassesnor GmbH Herten, mit weiteren Funktionen auszustatten und diese anschließend an experimentellen Versuchen auszutesten.

Bisher war es im Rahmen der Möglichkeiten der Firma BlueSens nur möglich, eine Prozesskontrolle und Online Messung mit den von der BlueSens eigens hergestellten Sauerstoff und Kohlendioxid Abgassensoren durchzuführen, welche an Schüttelkolben oder aber auch an Glasfermentern angebracht werden können.

In dem Projekt sollte nun auch eine pH und Sauerstoffflüssigphasen Online Messung ermöglicht werden und mit Hilfe dieser neuen Funktionen, anhand von Versuchen an dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe), eine mögliche Prozessüberwachung und Optimierung zu betrachten. Mit einer eigens aufgebauten, eingestellten und später auch getesteten Konstruktion wurden im Laufe des Projektes Versuche umgesetzt, welche in diesem Praxisphasenbericht erklärt und dargestellt werden.

3 Struktur der Arbeit

Die Struktur der ausgeführten Forschungssarbeit gliedert sich in vier Hauptabschnitte.

Der erste Punkt ist der Aufbau des Systems. Hier gab es Überlegungen wie das Vorhaben umzusetzen sein muss, um im Nachhinein ein funktionstüchtiges System zu haben, mit dem die geplanten Durchführungen realisiert werden konnten. Dazu war es zunächst wichtig, die neue Schüttelplatte aufzubauen und die vorhandene Mess- Hard- und Software auf der neuen dieser zu integrieren. Es wurden daher Messverstärker benötigt, welche in der Lage sind die Messsignale für die pH- und die Gelöstsauerstoff- Messung umzuwandeln und diese Signale an den von der BlueSens entwickelten Multiplexer der sogenannten BaccCom weiterzuleiten. Die Signale wurden anschließend mit Hilfe der ebenfalls von der BlueSens entwickelten Computersoftware FermVis ausgewertet, um die erhaltenen Messwerte für den Benutzer sichtbar zu machen. Dafür war es notwendig die vorhandene Hard- und Software auf die neuen Parameter pH und pO₂ umzuprogrammieren, um die ermittelten Ergebnisse auswerten zu können. Dafür wurden die pH und pO₂ Messelektroden an das neue System angeschlossen und kalibriert. Um eine optimale Befestigung der Sensoren an die eigens für die Versuchsreihe angefertigten Schüttelkolben zu gewährleisten, wurden spezielle Halterungsprototypen aus PVC gebaut und an der Konstruktion befestigt.

Abbildung 1: Halterungsprototypen für die Messelektroden



Der nächste Schritt war die Charakterisierung der Laborgeräte, um für darauffolgende Fermentationen eine optimale Versuchsgrundlage zu schaffen. Dies wurde mit der Natriumsulfitmethode realisiert. Mit dieser Methode war es möglich die Sauerstofftransferrate und die daraus resultierenden volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten zu berechnen, aus denen man im Anschluss die optimale Schüttelrate und Kolbenfüllmenge erhalten hat.

Der dritte Teil der Arbeit befasste sich mit ersten Fermentationstestläufen und einer Versuchsplanung, welche aerobe und anaerobe Fermentationen beinhaltete. Diese Fermentationen wurden anschließend mit dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* in einem Maßstab von 1000ml und 2000ml Schüttelkolben durchgeführt und die jeweiligen Ergebnisse ausgewertet.

Der vierte und letzte Teil der Arbeit bestand aus einer Prozessregulation im Rahmen einer Prozessoptimierung. Hierbei wurde zunächst dem Nährmedium der Hefen eine alkalische Lösung zugeführt, um so den pH-Wert zu regulieren und diesen in einem optimalen Bereich für das Wachstum der Hefen zu halten. Dies erfolgte bei unterschiedlichen pH-Werten, um zu erkennen mit welcher Konzentration der Lösung eine Regulation am sensitivsten zu bewerkstelligen ist. Im nächsten Schritt wurde eine „fedbatch“ Fermentation im Schüttelkolben durchgeführt, um zu beobachten wie sich die Hefen bei einer Fütterung mit Glucose verhalten. Nachdem diese Versuche erfolgt sind, ist im Rahmen einer Prozessoptimierung ein „fedbatch“ mit gleichzeitiger pH Regulation durchgeführt worden um zu beobachten, wie sich dieser Einfluss auf das Verhalten des Mikroorganismus auswirkt.

4 Theoretische Grundlagen / Stand des Wissens

4.1 Organismus und Reaktoren

Der Organismus *Saccharomyces cerevisiae* oder auch bekannt als Wein- und Backhefe ist ein Pilz, welcher eukaryontischer Natur ist und zu der Gattung der Sprosspilze (Ascomyceten) gehört.[1; 2; 5] Dieser Organismus zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass er unter hohen Zuckeranteilen im Nährmedium Ethanol und CO₂ unter alkoholischer Gärung als Produkt erzeugt und wird daher neben dem Einsatz beim Backen zur Alkoholherstellung in der Getränkeindustrie verwendet [1; 2]. Hefe gilt als ein sehr beliebter Modellorganismus in der angewandten biologischen Forschung, da sein komplettes Genom bereits entschlüsselt ist und sein Stoffwechsel ebenfalls komplett erforscht ist. Hefen setzen ihr Substrat aerob durch Atmung und anaerob durch alkoholische Gärung um d.h. unter Sauerstoffanwesenheit aber auch unter Sauerstoffabwesenheit. [1; 2] Bei hohen Zuckeranteilen kommt es durch den sogenannten Crabtree-Effekt auch unter aeroben Bedingungen zur Alkoholproduktion und somit einem anaeroben Metabolismus der Zellen. Die Hefen nutzen den überschüssigen Zucker dann nicht nur für das eigene Wachstum und die Zellstoffwechsel, sondern produzieren Ethanol [1; 22].

Hefen sind in den unterschiedlichsten Variationen erhältlich. Zum einen gibt es sie freiverkäuflich in der Form von gepressten Hefewürfeln, aber auch als Trockensubstanz. Für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten gibt es genetisch modifizierte Industriehefen, welche beispielsweise zu einer besonders hohen Ethanolproduktion oder Biomassen Produktion in der Lage sind. In dieser Versuchsreihe wurden ausschließlich normal erhältliche Trockenhefen verwendet, da im Rahmen dieses Projektes in erster Linie die Funktionalität der neuen Messparameter überprüft werden sollten, wofür normale Hefen bestens geeignet sind. Hefen in Würfelform wurden nicht verwendet, da diese im Gegensatz zu Trockenhefen keine gute Löslichkeit im Medium vorweisen bzw. keine reproduzierbaren Massen darstellen.

Als Reaktoren wurden Schüttelkolben gewählt, da diese besonders gut für Fermentationen im kleinen Labormaßstab für Forschungsarbeiten geeignet sind. Sie zeichnen sich besonders durch ihre schonende Durchmischung der Fermentationsflüssigkeit aus, da diese

nur durch das Schütteln der Gefäße erreicht wird. Weitere Mechanische Scherkräfte wie sie bei der Durchmischung mit Rührwerken oder Pumpensystemen in Glasfermentern vorkommen, entfallen. Ein weiterer Vorteil der Schüttelkolben ist die kurze Fermentationszeit und die Möglichkeit mehrere Fermentationen gleichzeitig ablaufen lassen zu können, sowie der einfach gehaltene Versuchsaufbau und der niedrige Platzverbrauch. Der Verbrauch von Nährmedien ist im Gegensatz zu Glasfermentern weitaus geringer, was bei einer Vielzahl von Versuchen die Kosten gering hält.

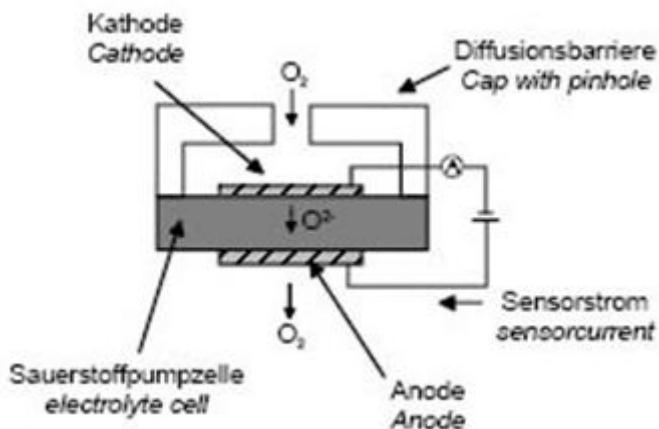
4.2 Sensorik

O₂ Abgassensor

Die Sensorik besteht einerseits aus der Abgasanalytik der BlueSens Sensoren welche den Abgaswert und zum anderen aus pH und pO₂ Sonden, welche den Zustand in der Flüssigphase wiederspiegeln.

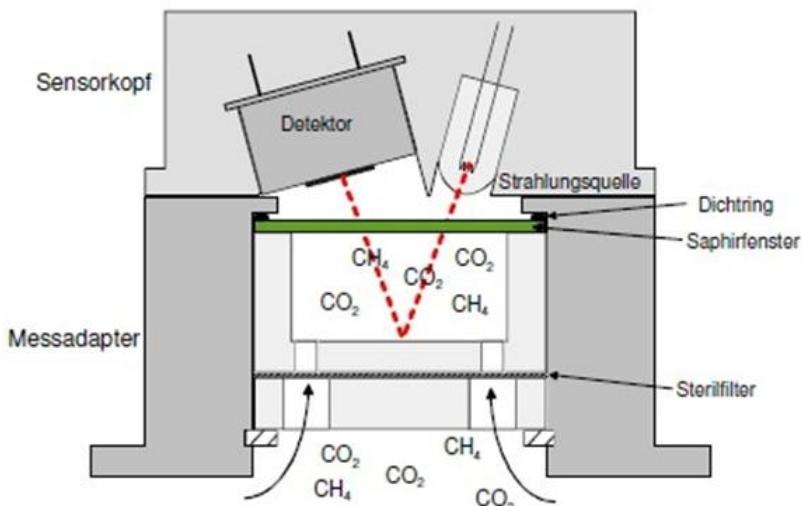
Die Abgassensorik der BlueSens gas Sensor GmbH ist im Vergleich zu invasiven Sensoren sehr unempfindlich in Bezug auf Wartungs- und Reinigungsintensität, gibt jedoch nur Auskunft über die Konzentration der Abgaswerte der kultivierten Mikroorganismen. Die Sensoren messen die Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in der Gasphase des Reaktors. Der Sauerstoffsensor hat eine Messzelle aus festem Zirkoniumoxid-Elektrolyt und arbeitet nach dem Prinzip einer Lambda Sonde. Legt man an die Zelle eine Spannung an, werden Sauerstoffionen von der Kathode zur Anode gepumpt. Wird nun die Kathode mit einer Gas-Diffusionsbarriere abgedeckt und die Spannung erhöht, stellt sich ein Sättigungsstrom ein, welcher als Maß für die Umgebungssauerstoffkonzentration darstellt. [30]

Abbildung 2: Messprinzip des O₂ Sensors



CO₂ Abgassensor

Der Kohlenstoffdioxid Sensor hingegen arbeitet mit einem photometrischen Messprinzip und misst die Abschwächung der Lichtintensität im Absorptionsspektrum von CO₂. Der Lichtstrahl wird vom Messadapter reflektiert und die Abschwächung der Lichtintensität des Analytgases wird dabei vom Detektor gemessen. Durch eine lichtdurchlässige Scheibe wird ein austreten der Probenatmosphäre nach außen verhindert, was ein verschmutzen der optischen Bauteile verhindert. Durch eine Beheizung des Messadapters durch den Sensorkopf wird ein austrocknen der Feuchtigkeit vermieden. [29]

Abbildung 3: Messprinzip des CO₂ Sensors

pH-Elektrode

Die neu eingeführten invasiven Sensoren pH und pO₂ sind was Reinigung und Wartung betrifft empfindlicher, da sie sich während der Fermentation direkt in der Flüssigphase befinden und daher sehr schnell verschmutzen.

Die pH-Glaselektrode misst die Wasserstoffionenaktivität in Lösung. Sie arbeitet nach dem Prinzip einer Einstabmesskette und ist aus einem inneren Rohr und einem äußeren Mantel aufgebaut. Der äußere Mantel dient dabei als Referenzelektrode und enthält einen Silberdraht und Silberchlorid welche eine Silber-Silberchloridelektrode darstellen, die dann wiederum in einem Elektrolyten (Kaliumchlorid) gebettet ist. Das innere Rohr enthält ebenfalls eine Silber-Silberchloridelektrode mit Kaliumchlorid und einem zusätzlichen Phosphatpuffer, welcher auf einem festen pH-Wert eingestellt ist. Beide Elektroden sind mit der zu messenden Lösung verbunden, wobei das innere Rohr über eine Glasmembran und die Referenzelektrode über ein Diaphragma aus poröser Keramik von der umgebenden Flüssigkeit getrennt sind. Taucht man nun die Messkette in die zu messende Lösung ein, entsteht ein elektrisches Potential an der Glasmembran des inneren Rohres, welches der Nernst-Gleichung folgt. Man erhält eine Elektrode, welche in Probenlösung getaucht ist und eine andere Elektrode, welche in die innere Lösung mit bekanntem pH eintaucht. Aus der Spannungsdifferenz dieser beiden Messungen ergibt sich nun der pH-Wert. [16; 23]

Nernst Gleichung:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{z_e F} \ln \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}}$$

E Elektrodenpotential

E° Standardelektrodenpotential

R Universelle oder molare Gaskonstante, R = 8,31447 J mol⁻¹ K⁻¹ = 8,31447 C V mol⁻¹ K⁻¹

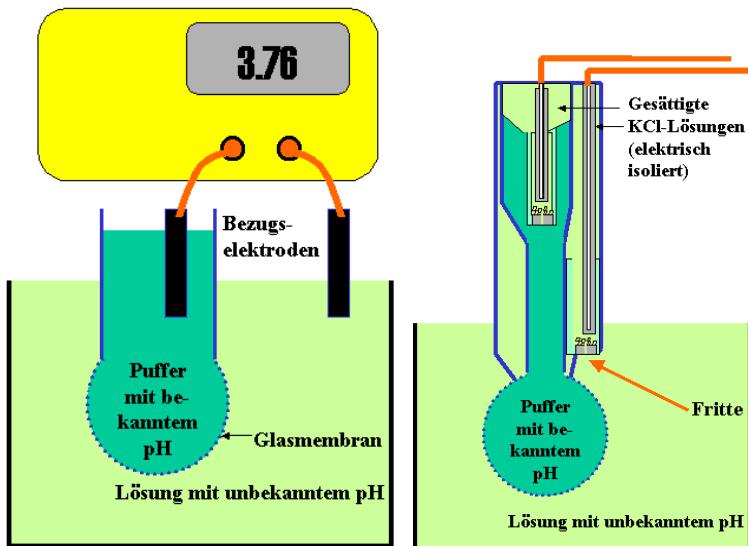
T absolute Temperatur (=Temperatur in Kelvin)

z_e Anzahl der übertragenen Elektronen (auch Äquivalentzahl)

F Faraday-Konstante, F = 96485,34 C mol⁻¹ = 96485,34 J V⁻¹mol⁻¹

a Aktivität des betreffenden Redox-Partners

Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer pH-Einstab-Messkette in einer Glaselektrode



pO₂-Sensor

Die invasiven amperometrischen Gelöstsauerstoffsensoren arbeiten mit dem Clarkprinzip, benannt nach seinem Entwickler Leland Clark. Der Sensor besteht aus einer Arbeitselektrode (Kathode) aus Platin und einer Referenzelektrode (Anode) aus Silber und einer Sauerstoffdurchlässigen Membran. Diese Membran trennt die Elektroden vom Messmedium. In dem Membrankörper befindet sich eine Elektrolytlösung, durch die die beiden Elektroden in Verbindung stehen. Über einen Transmitter wird eine konstante Spannung an die Kathode angelegt. Die Sauerstoffmoleküle aus dem zu messenden Medium diffundieren daraufhin durch die Membran zu den Elektroden und werden dann an der Kathode reduziert. Zeitgleich findet an der Anode eine Oxidation statt bei der das Silber der Anode als Silberionen in den Elektrolyten abgegeben wird. Dadurch wird der Elektrolyt erst leitend (Ionenleitfähigkeit) und eine Verbindung der Anode und Kathode ist gewährleistet. Der nun erzeugte Strom wird vom Transmitter gemessen und ist proportional zum Sauerstoffpartialdruck (pO₂) im Medium. [19]

Für die Reduktions- und Oxidationsreaktionen an den Elektroden gilt:

Reduktion an der Kathode:



Oxidation an der Anode:

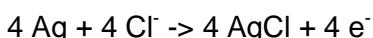
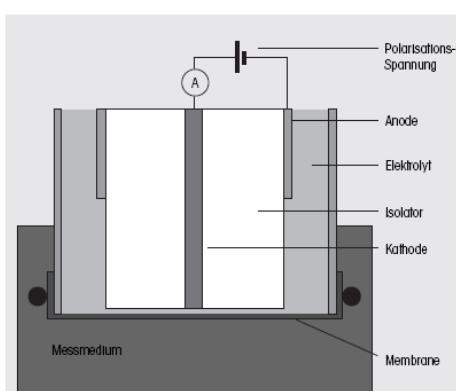


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer Clark Elektrode



5 Material und Methoden

5.1 Geräte:

- Schüttler Infors HT Orbitron
- Selbstgebaute Schüttelplatte mit zugehörigen Klammerhorden zur befestigung der Kolben auf der Platte (2x 2000ml, 4x 1000ml)
- Selbstgebaute Sensorbefestigung aus PVC
- BaccCom Messumformer BlueSens gas Sensor GmbH
- Abgassensoren CO₂, O₂ (je 4x) BlueSens gas Sensor GmbH
- FermVis pH Software BlueSens gas Sensor GmbH
- Mettler Toledo pH Elektroden InPro 3250 (2x)
- Mettler Toledo pO₂ Sensoren InPro 6800 (2x)
- Meinsberg Messverstärker pH MV3010 (2x)
- Meinsberg Messverstärker O₂ MV3030 (2x)
- Schüttelkolben 1000 ml ohne Schikane (2x), GL 25 Schraubverschluss (2x), GL 40 Schraubverschluss (3x)
- Schüttelkolben 2000 ml ohne Schikane (2x), GL 25 Schraubverschluss (2x), GL 40 Schraubverschluss (3x)
- Schraubkappen GL40 mit Metallring, Gummiring und Teflonmembran (8x)
- Schraubkappen GL40 mit Gummiring und Teflonmembran (4x)
- Schraubkappen GL25 mit Gummidichtung offen und geschlossen
- Spritzen mit Kanülen
- Schläuche
- Diverse Schottflaschen 1000ml & 500 ml
- Messzylinder
- Pumpe
- Waage Mettler Toledo PL3001-S
- Spatel
- Autoklav Systec V-65
- Diverse Bechergläser

5.2 Chemikalien

- Natriumsulfit
- NaOH Perlen
- Malzextrakt
- Hefeextrakt
- Trypton
- D-Glucose (Wasserfrei)
- Trockenhefe

5.3 Kulturbedingungen

- Komplexmedium :
 - 1,5 g Hefeextrakt
 - 1,5 g Malzextrakt
 - 2,5 g Trypton
 - auf 0,5 L VE-Wasser
- Glucose:
 - 20 g/L
 - 30 g/L
 - 40 g/L
- Raumtemperatur (25 °C)
- 7 g Trockenhefe (1 Päckchen) auf einen Kolben
- 1000 ml und 2000 ml Schüttelkolben
- unsteril
- aerob: nicht begast austausch durch Sterilbarriere (Teflonmembran)
- anaerob: Gasentweichung über Schläuche in Wasser
- Füllmenge:
 - 1 l Kolben, 250 ml (200 ml Startmenge bei fedbatch)
 - 2 l Kolben, 400 ml
- Schüttelrate:
 - 200 rpm
 - Bei fedbatch und ph Regulation – 150 rpm

5.4 Analysenmethoden

5.4.1 Natriumsulfitmethode zur bestimmung des kLa Wertes im Schüttelkolben

Mit der Natriumsulfitmethode ist es möglich, den Sauerstoffeintrag von der Gasphase in die Flüssigphase im Kolben zu ermitteln.

Die Sauerstoffaufnahme in Flüssigphase ergibt sich durch eine Oxidationsreaktion, bei der das Natriumsulfit in Lösung mit dem aufgenommenen Sauerstoff aus der Gasphase im Luftdicht verschlossenen Kolben, zu Natriumsulfat reagiert. Bei dieser Reaktion wird der Sauerstoff im Kolben verbraucht, dieser Verbrauch kann dann wiederum mit Sauerstoffabgassensoren gemessen werden.

Die Reaktion läuft nach folgender Reaktionsgleichung ab:



Diese Methode wird angewandt, um aus den gemessenen Werten die Sauerstoffaufnahme und daraus dann die Volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten (kLa Werte) zu berechnen. Im Anschluss erhält man daraus die optimalen Reaktionsbedingungen für Fermentationen im Gefäß. Dabei wird die ganze Prozedur bei unterschiedlichen Füllvolumina

und Rotationsgeschwindigkeiten durchgeführt, um somit gemessen mit den Abgassensoren die optimale Sauerstoffaufnahme in Lösung zu ermitteln.

Nach einer Abnahme von drei Volumenprozent Sauerstoff im Kolben wird die Reaktion abgebrochen und bei weiteren Bedingungen wiederholt.

Im Anschluss errechnet man dann aus den so erhaltenen Werten, die OTR (Oxygentransferrate) und daraus schließlich den kLa für die individuelle Reaktion.

Die OTR ergibt sich aus folgender Formel:

Verbrauchter Sauerstoff in mol/l ($c(O_2\text{mol})$):

$$c(O_2\text{mol}) = [c(O_2\text{-Anfang}) - c(O_2\text{-Messung})]/100 \times [V(\text{Kolben}) - V(\text{Natriumsulfatlösung})]/(24,47 \times V(\text{Natriumsulfatlösung}))$$

Legende:

$c(O_2\text{-Anfang})$ = 20,97 Vol.-%;

24,47 l/mol = molares Volumen des idealen Gases bei Standardbedingungen

$c(O_2\text{-Messung})$ = Messwert O_2 [Vol.%]

$V(\text{Kolben})$: komplettes Kolbenvolumen

$V(\text{Natriumsulfatlsg.})$ = Füllvolumen der Natriumsulfatlösung

Hieraus ergibt sich aus folgender Formel der kLa Wert pro Stunde:

$$K_L a = \frac{OTR}{L_{O_2} \cdot p_{g,O_2} \cdot (y_{O_2}^* - y_{O_2,L})}$$

kLa: volumetrischer Sauerstofftransferkoeffizient [1/h]

OTR: Sauerstofftransferrate [mol/L/h] (Abnahme des Sauerstoffgehalts pro Zeit)

L_{O_2} : Sauerstofflöslichkeit im Sulfitsystem (0,00078) [mol/L/bar]

p_{g,O_2} : Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase von Wasser (0,209) [bar]

$y_{O_2}^*$: O_2 -Molenbruch im Gas an der Phasengrenze (1,0) [mol/mol]

$y_{O_2,L}$: O_2 -Molenbruch in der Flüssigkeit (0,0 da mit Natriumsulfat entfernt) [mol/mol]

5.4.2 Fermentation

Alle Fermentationen werden mit handelsüblicher Trockenhefe durchgeführt. Der Organismus *Saccharomyces cerevisiae* nutzt dabei die Nährstoffe des Komplexmediums und die Glucose als Nahrungsquelle und produziert unter Sauerstoffverbrauch, Kohlenstoffdioxid und Ethanol. Die grundlegenden Versuche werden mit den Sauerstoff- und CO_2 - Abgassensoren gemessen. Die zusätzlichen Werte für die Parameter pH und pO_2 werden mit den jeweiligen Elektroden ermittelt und können visuell und online mit Hilfe der modifizierten „FermVis pH“ Software verfolgt und im Nachhinein ausgewertet werden.

Um einen optimalen Sauerstofftransfer zu gewährleisten, werden die Füllmengen und Schüttelraten mit den Einstellungen durchgeführt, die bei der Charakterisierung des Systems zu den besten kLa Werten geführt haben.

Es werden aerobe und anaerobe Fermentationen durchgeführt. Bei den aeroben Versuchen erfolgt der Sauerstoffaustausch über den oberen GL40 Schraubverschluss welcher mit einer Teflonmembran, die als Sterilbarriere dient, verschlossen ist. Die anaeroben Versuche wurden in komplett geschlossenen Kolben durchgeführt. Ein Druckausgleich ist über einen Schlauch gegeben, welcher durch die Verschlusskappe des GL40 Schraubverschlusses vom Kolben ausgehend in ein mit Wasser gefülltes Glasgefäß geleitet wird.

Die aeroben Fermentationen wurden in 1000ml und 2000ml Kolben durchgeführt. Alle darauffolgenden Versuche konnten jedoch aufgrund von Glasbruch der 2000ml Kolben nur noch mit den 1000ml Kolben durchgeführt werden. Alle Fermentationen liefen unsteril ab.

Aus den erhaltenen Werten werden nach der Durchführung der Versuche die Sauerstofftransferrate und die Kohlenstoffdioxidtransferrate berechnet (aus dessen Quotient sich im Anschluss der Respirationsquotient ergibt).

Die Werte werden mit folgenden Formeln errechnet:

OTR

$$No_2 = ((O_2\text{ambient} - O_2)/100)/V_{\text{mol}} * (V_{\text{flask}} - V_{\text{sample}})$$

$$DNo_2 = (No_2 - No_2\text{old}) + (No_2\text{old} * DKO_2 * t)$$

$$OTR = DNo_2 / (V_{\text{sample}} * t)$$

CTR

$$NCO_2 = ((CO_2 - CO_2\text{ambient})/100)/V_{\text{mol}} * (V_{\text{flask}} - V_{\text{sample}})$$

$$DNCO_2 = (NCO_2 - NCO_2\text{old}) + (NCO_2\text{old} * DKCO_2 * t)$$

$$CTR = DNCO_2 / (V_{\text{sample}} * t)$$

$$RQ = CTR/OTR$$

Legende:

OTR	=	Sauerstofftransferrate (Oxygen transfer rate) [mol/l h]
CTR	=	Kohlenstoffdioxidtransferrate (Carbon dioxide transfer rate) [mol/l h]
Vflask	=	Volumen Schüttelkolben (z.B. 1,22 l) in Liter
Vsample	=	Füllvolumen (z.B. = 0,05 l) in Liter
VMol	=	Volumen von 1 Mol gas = 22,4 l/mol
CO ₂ ambient	=	Konzentration von CO ₂ in der Atmosphäre [Vol.%] (Umgebungsluft 0,04 Vol.%)
O ₂ ambient	=	Konzentration von O ₂ in der Atmosphäre [Vol.%] (Umgebungsluft 20,97 Vol.%)
CO ₂	=	Konzentration von CO ₂ im Schüttelkolben [Vol.%]
O ₂	=	Konzentration von O ₂ im Schüttelkolben [Vol.%]
NCO ₂	=	gemessene Stoffmenge CO ₂ [mol]
NCO ₂ old	=	Mole CO ₂ einer vorherigen Messung [mol] (bzgl. Messintervall)
NO ₂	=	gemessene Stoffmenge O ₂ [mol]
NO ₂ old	=	Mole O ₂ einer vorherigen Messung [mol] (bzgl. Messintervall)
DNo ₂	=	Differenz von O ₂ zwischen den Messungen [mol]
DNCO ₂	=	Differenz von CO ₂ zwischen den Messungen [mol]
DKCO ₂	=	Diffusionskonstante von CO ₂ (spezifisch für schüttelkolben) [1/h]
DKO ₂	=	Diffusionskonstante von O ₂ (spezifisch für schüttelkolben) [1/h]
t	=	Messzeit [h]
RQ	=	Respirationsquotient

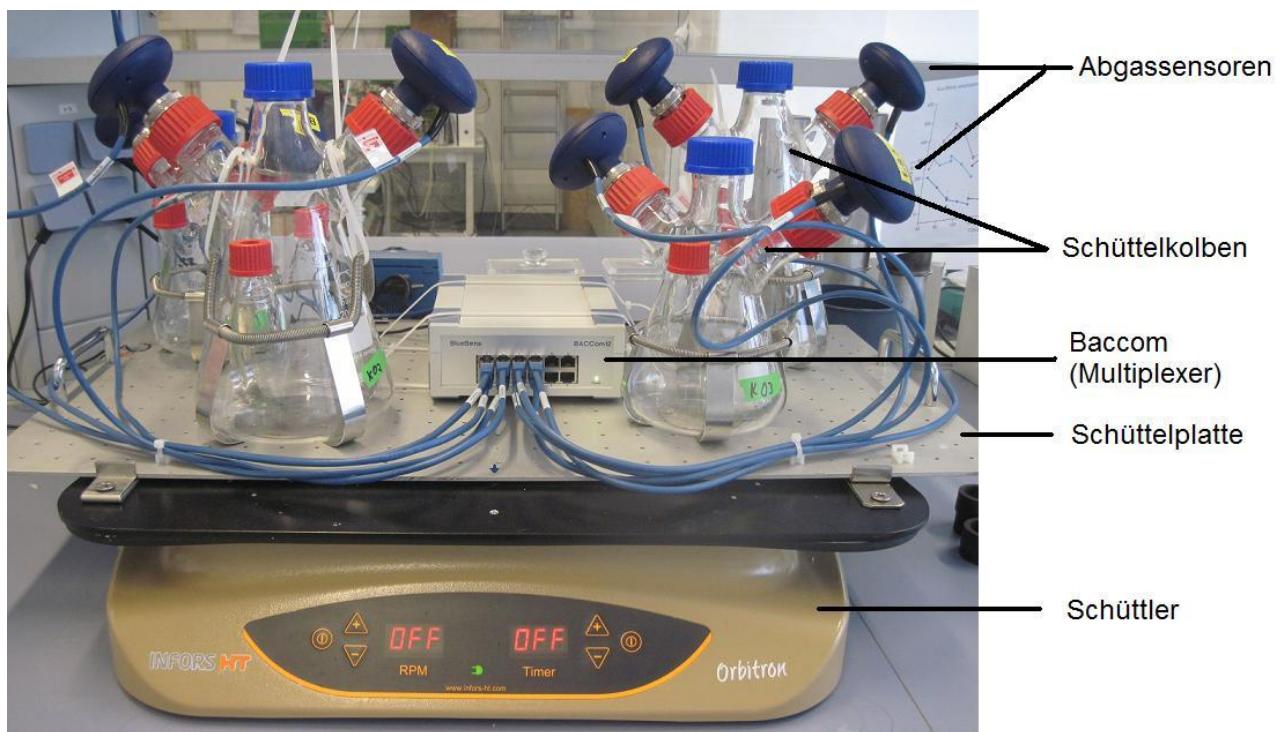
5.4.3 pH Regulation und fedbatch-Fermentation

Zur Durchführung einer möglichen Prozessoptimierung wird mit Hilfe einer Pumpe und einer alkalischen Lösung, in diesem Falle Natronlauge, der pH Wert der Fermentationsflüssigkeit kontrolliert und in einem optimalen Bereich für Hefen zwischen 4,5 und 5 gehalten. Zum weiteren Vergleich wird separat eine fedbatch-Fermentation durchgeführt bei der eine Glucoselösung zugefüttert wird. Hiernach werden diese beiden Methoden vereint um zu beobachten, wie sich die Hefen bei diesen Bedingungen verhalten und ob sich möglicherweise eine Verbesserung der CO₂ Produktion erzielen lässt.

5.5 Fermenter Abbildung:

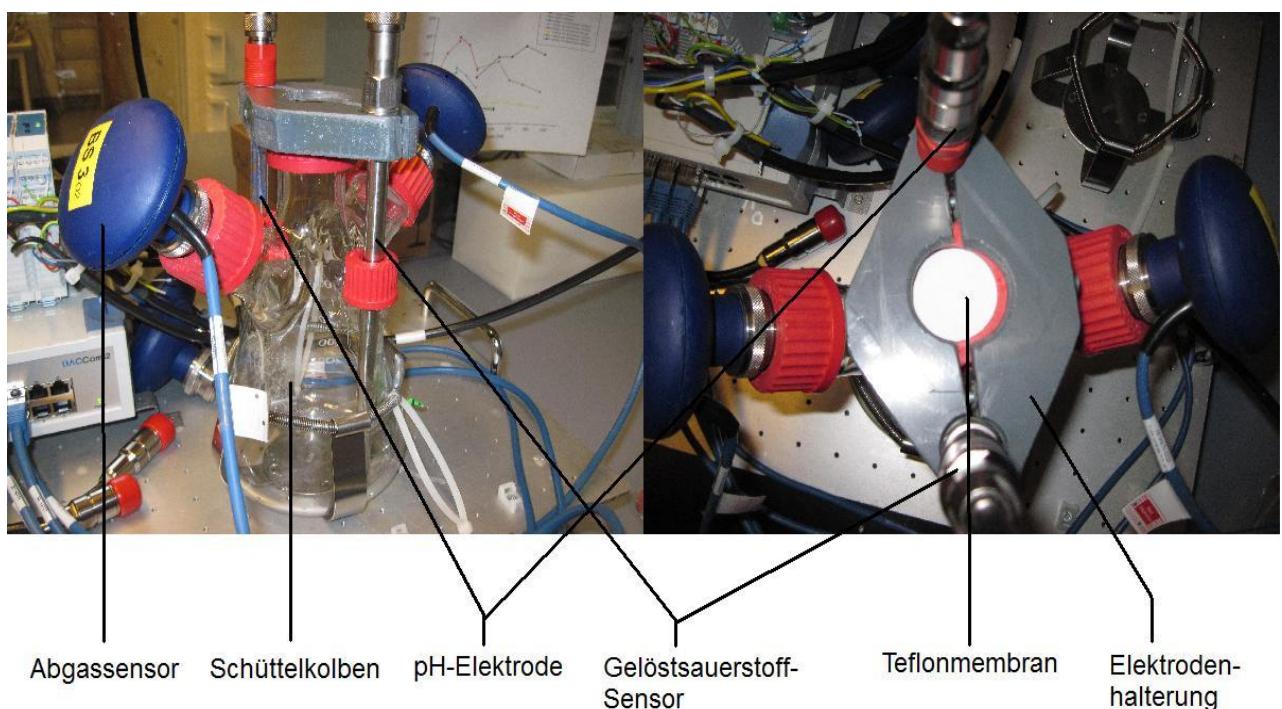
kLa-Wert Messung

Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Ermittlung des kLa



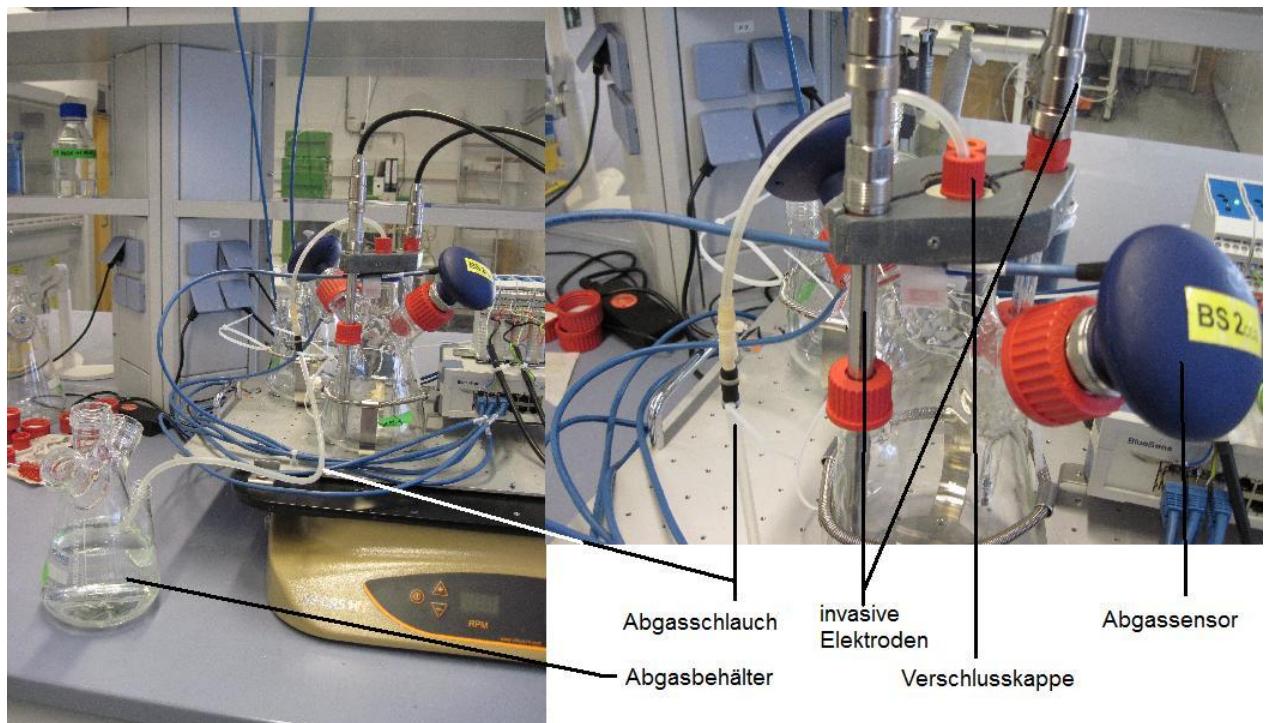
aerobe Fermentation

Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Durchführung aerober Fermentationen



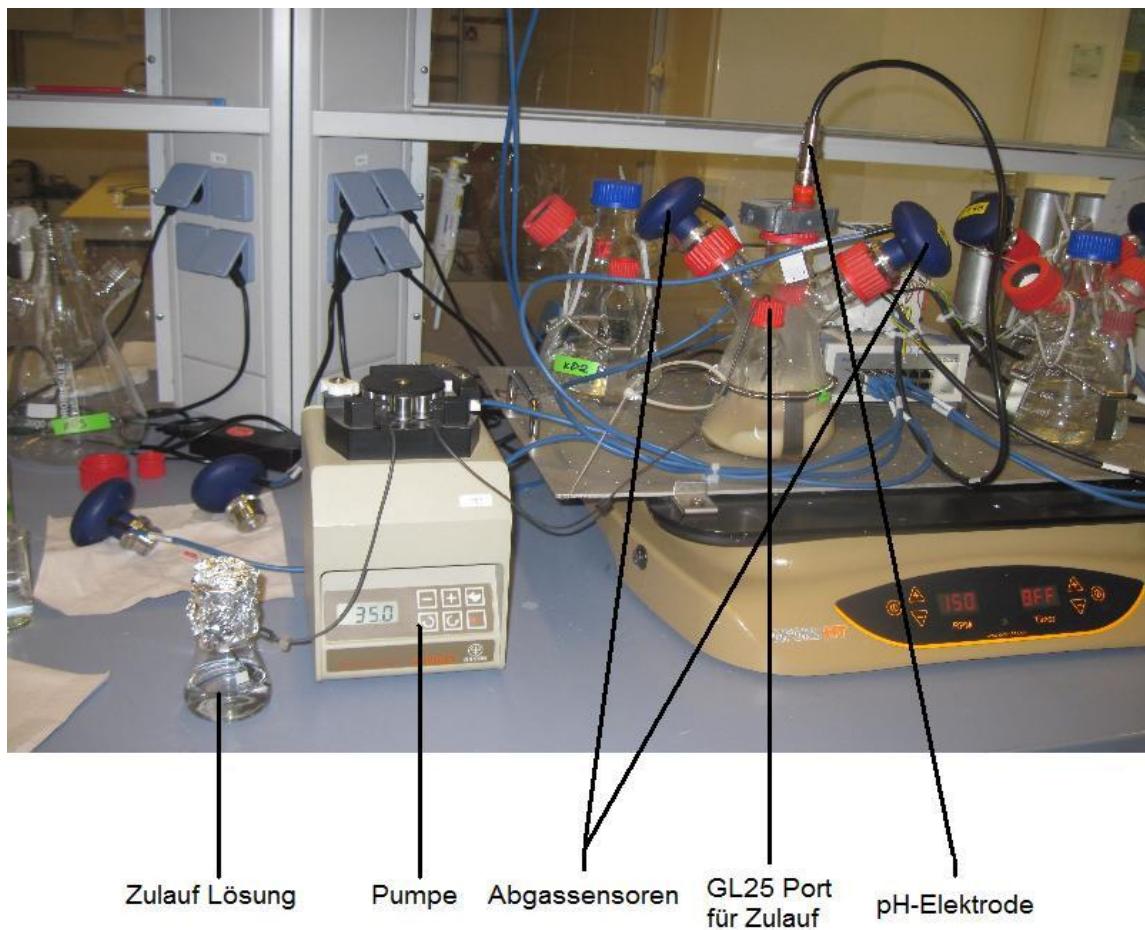
anaerobe Fermentation

Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Durchführung anaerober Fermentationen



pH Regulation und Prozessoptimierung

Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Durchführung einer Prozessoptimierung



6 Versuchsdurchführung Ergebnisse und Diskussion

6.1 kLa Wertbestimmung mit der Natriumsulfitmethode

6.1.1 Durchführung

Der Versuchsaufbau für die Natriumsulfitmethode gliedert sich wie folgt:

Zunächst wird eine Natriumsulfitlösung mit Natriumsulfit im Überschuss angesetzt. So ist gewährleistet, dass man für den gesamten Verlauf einer Messung die gleiche Lösung weiter nutzen kann. Es werden 20 g Natriumsulfit in einer 1 l Flasche eingewogen und mit einem Liter VE-Wasser mit Hilfe eines Messzyinders aufgefüllt und so lange geschüttelt, bis sich das Natriumsulfit komplett gelöst hat.

Im nächsten Schritt werden die Kolben auf der Schüttelplatte befestigt und mit den O₂ und CO₂ Sensoren versehen.

Nun wird die Messung mit Hilfe der FermiVis Software gestartet, um zu überprüfen, ob die Abgassensoren die korrekten Werte für Umgebungsluft (O₂: 20,97 Vol%; CO₂: 0,04 Vol%) anzeigen. Bei Abweichungen sind die Sensoren erneut zu kalibrieren, um eine plausible Messung zu garantieren. Nach Überprüfung des Systems sind die Kolben mit den zuvor gewählten Füllmengen mit Natriumsulfitlösung zu befüllen und luftdicht zu verschließen. Die Schüttelplatte wird auf die jeweilige Schüttelrate eingestellt und die Messung wird gestartet.

Nun wird so lange gemessen, bis der Sauerstoffanteil im Kolben um drei Volumenprozent gesunken ist. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Messung abgeschlossen, die Schüttelplatte wird gestoppt, die Kolben werden geöffnet und es wird so lang gewartet, bis der Sauerstoffwert im Kolben wieder den Ausgangswert für Umgebungsluft angenommen hat.

Jetzt kann man die nächste Messung bei einer anderen Schüttelrate starten und der Vorgang wiederholt sich so lang, bis man für alle gewählten Schüttelraten die passende Messung erhalten hat.

Von allen Durchzuführenden Versuchen sind Doppelbestimmungen anzufertigen um eine korrekte Auswertung der Ergebnisse zu gewährleisten.

Tabelle 1: ausgeliterte gesamtvolumina der Kolben

Gesamtvolume Kolben	
K_01 (1L)	1440 ml
K_02 (2L)	2630 ml
K_03 (1L)	1380 ml
K_04 (2L)	2635 ml

6.1.2 Ergebnisse

Tabelle 2: kLa Werte aller Messungen pro Sekunde

kLA/s

Messung 1		Rührfrequenz [rpm]		
		100	150	200
Kolben	Füllvolumen [ml]			
K_01	150	0,00886054	0,01908423	0,02760397
K_02	200	0,01175725	0,026752	0,06151256
K_03	150	0,00869014	0,01533554	0,02095857
K_04	200	0,01175725	0,02538884	0,0601494

Messung 2		Rührfrequenz [rpm]		
		100	150	200
Kolben	Füllvolumen [ml]			
K_01	200	0,01874344	0,03629412	0,05554874
K_02	300	0,02027699	0,03902043	0,06900994
K_03	200	0,01755068	0,02624082	0,04174675
K_04	300	0,00596382	0,01295001	0,02504805

Messung 3		Rührfrequenz [rpm]		
		100	150	200
Kolben	Füllvolumen [ml]			
K_01	250	0,0199362	0,04276912	0,07326981
K_02	400	0,02198094	0,04651781	0,09337641
K_03	250	0,01789147	0,0269224	0,04617702
K_04	400	0,02232173	0,04481386	0,08792377

In den vorrausgehenden Tabellen sind die höchsten und somit für folgende Versuche zu nutzenden kLa-Werte rot gekennzeichnet.

Abbildung 10: graphische Auftragung der kLa Werte/secunde für 1L Kolben

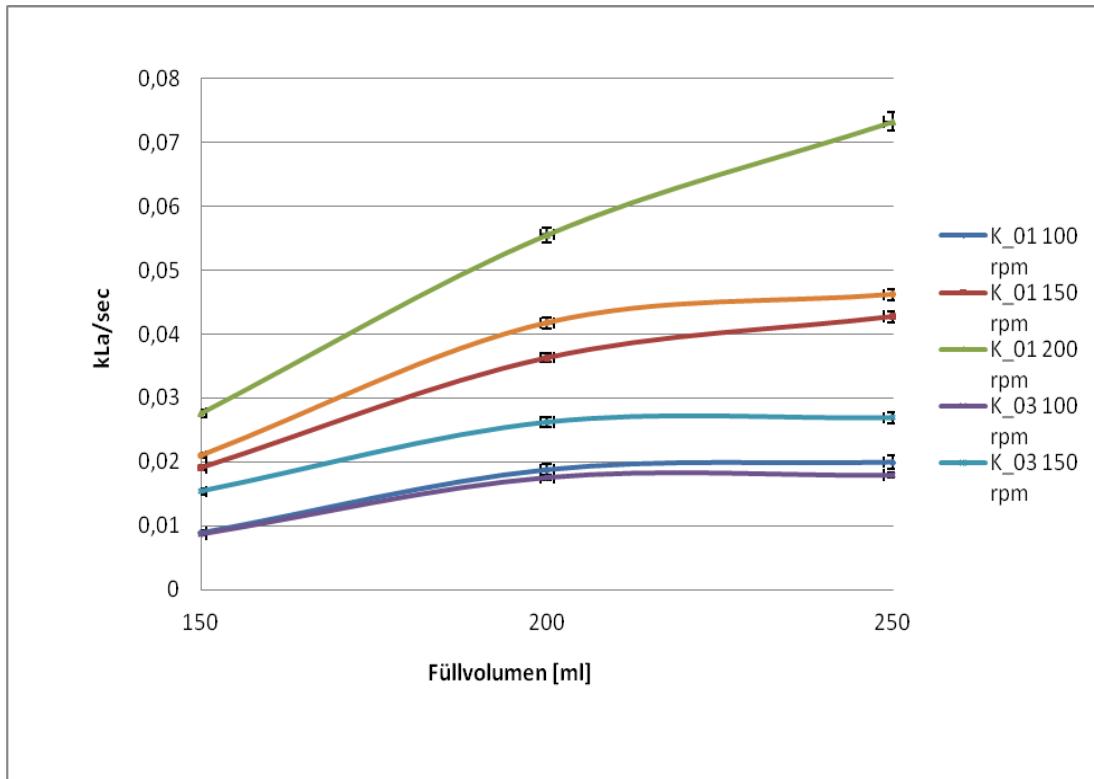
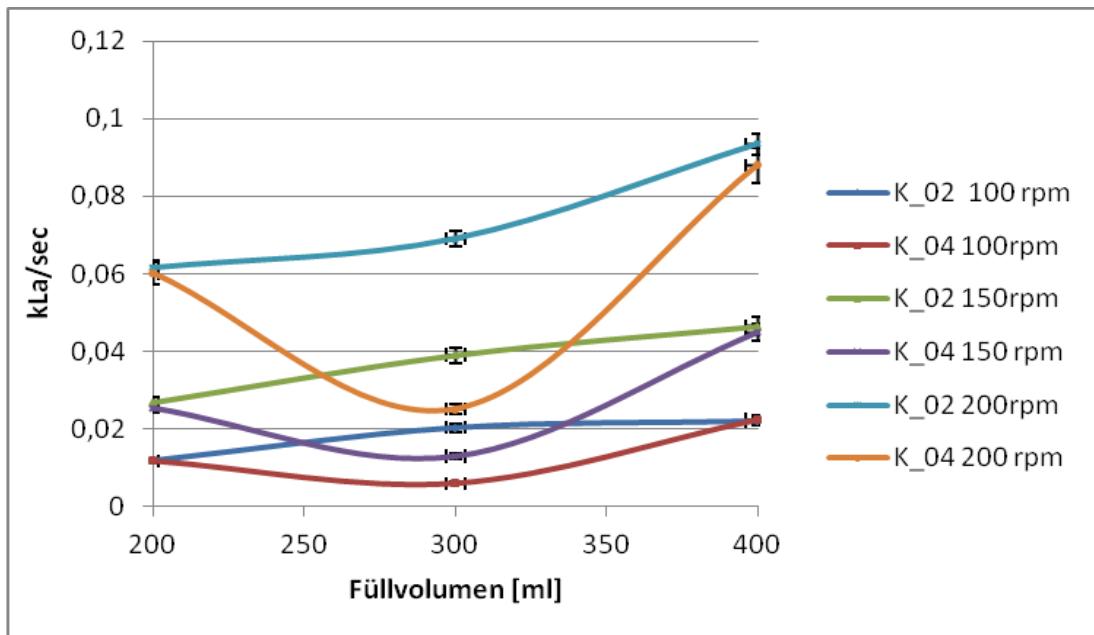


Abbildung 11: graphische Auftragung der kLa Werte/secunde für 2L Kolben



6.1.3 Interpretation

Die in den Abbildungen 10 und 11 aufgetragenen kLa- Werte zeigen deutlich, dass die beste Sauerstoffaufnahme durch das höchste Füllvolumen in Verbindung mit der höchsten Schüttelrate erzielt wurde.

Bei den 1 L Kolben erkennt man allerdings deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Kolben. So ist der Anstieg des kLa-Wertes bei Kolben 01 deutlich steiler als bei Kolben 03.

Dieser Unterschied könnte entweder auf einen Gerätefehler der Sauerstoffsensoren zurückzuführen sein oder aber an der Dichtigkeit der Verschlusskappen liegen. Leichte Unterschiede könnten auch auf ein unterschiedliches Gesamtvolumen zurückzuführen sein, da die Kolben aus Glas gefertigt sind und bei Glasgefäßen aufgrund der handgefertigten Bauweise immer ein Unterschied im Gesamtvolumen besteht. Daher ist es so, dass in Kolben 01 ein größeres Kopfvolumen vorherrscht, wodurch auch mehr Sauerstoff im Kolben ist als in Kolben 03. Da bei den durchgeführten Messungen die gleiche Natriumsulfitlösung genutzt wurde kann der Unterschied nicht auf Konzentrationsunterschiede dieser zurückgeführt werden. Jedoch ist bei beiden Kolben ein Anstieg der kLa Werte bei höheren Füllvolumen und Schüttelraten zu erkennen. Lediglich bei Kolben 03 bei 100 rpm ist der Anstieg des kLa nicht so signifikant wie bei höheren Füllvolumina und Schüttelraten.

Bei den 2 L Kolben wurden ebenfalls durchweg bei den höchsten Füllvolumina und Schüttelraten auch die besten kLa Werte erzielt. Auch hier sieht man wieder einen deutlichen Unterschied zwischen den Kolben, welcher ebenfalls auf einen der verwendeten Sensoren zurückzuführen sein könnte, auch hier gibt es einen durch Glasgeräte vorherrschenden Unterschied im Gesamtvolumen, was der Grund für die unterschiedliche Sauerstoffaufnahme sein könnte. Die Messungen von Kolben 04 bei 300 ml Füllvolumen mussten aufgrund von Messfehlern bei der ersten Messung, dessen Werte dann verworfen werden mussten, an einem anderen Tag wiederholt werden, daher wurde eine andere Natriumsulfitlösung verwendet als bei den anderen Messungen. Die Konzentration dieser Lösung war jedoch bei allen Messungen die gleiche, daher könnte die deutlich zu erkennende Schwankung wieder auf einen Gerätefehler der Sensoren oder des Messumformers zurückzuführen sein.

Bei allen Messungen ist jedoch sehr gut zu erkennen, dass durch eine Erhöhung des Füllvolumens in Verbindung mit einer höheren Schüttelrate die Sauerstoffaufnahme von der Gasphase in die Flüssigphase deutlich gesteigert wurde. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass durch erhöhtes Füllvolumen und erhöhte Schüttelrate die Oberfläche der Flüssigkeit vergrößert wird. Dies hat eine deutlich bessere Sauerstoffaufnahme zur Folge, was sich durch die durchgeführten Versuchen bestätigen ließ.

Durch weiteres Erhöhen des Füllvolumens und der Schüttelrate könnten sich möglicherweise noch höhere kLa-Werte erzielen lassen, jedoch wäre das nicht unendlich weit steigerbar, da durch noch stärkere Schüttelung eine unkontrollierte Verteilung der Flüssigkeit folgen würde. Das hingegen wäre in einer nachfolgenden Fermentation kein guter Umstand für die genutzten Mikroorganismen, da dadurch wieder höhere Scherkräfte entstehen würden, welche die Zellen beschädigen könnten. Ebenfalls würde durch eine weitere Erhöhung des Füllvolumens der Kopfraum im Kolben verringert werden, was weniger Sauerstoff im Kolben bedeuten würde. Das wäre im Vergleich für einen optimalen Sauerstofftransfer in die Flüssigkeit eher kontraproduktiv.

Für die folgenden Fermentationen wurden aufgrund der erhaltenen kLa Werte jeweils immer die Bedingungen gewählt, bei denen die höchsten kLa Werte erzielt wurden. Das war bei den 1 L Kolben eine Füllmenge von 250 ml und bei den 2 L Kolben eine Füllmenge von 400 ml in Verbindung mit einer Schüttelrate von 200 rpm.

6.1.4 Fehlerbetrachtung

Zur Fehlerbetrachtung bei der kLa Wert Bestimmung wurden folgende Gerätefehlerquellen ermittelt welche in die Berechnung für die Konzentration eingeflossen ist. Aus den Abweichungen der Konzentration konnten dann ein maximaler und ein minimaler OTR bestimmt werden, aus denen dann im Anschluss die Abweichung kLa Werte berechnet werden konnte. Die Fehler sind in den Abbildungen 10 und 11 durch Fehlerindikatoren an den Messpunkten gekennzeichnet, durch die man die Abweichung vom Graphen erkennen kann.

Tabelle 3: Fehlerquellen kLa

Gerät	Messabweichung
Messzylinder	± 2 ml
Kolben	± 20 ml
O ₂ Sensor	± 3 % (0,03)

Formel zur Fehlerberechnung:

Maximale O₂ Konzentration:

$$c_{\text{Max}} (\text{O}_2) = ((V_{\text{Kolben, Max}} * c(\text{O}_2) [\text{Vol}-\%]) + (0,03 * c(\text{O}_2) [\text{Vol}-\%])) / 100 / V_m / V_{\text{Kolben, Max}}$$

Minimale O₂ Konzentration:

$$c_{\text{Min}} (\text{O}_2) = ((V_{\text{Kolben, Min}} * c(\text{O}_2) [\text{Vol}-\%]) - (0,03 * c(\text{O}_2) [\text{Vol}-\%])) / 100 / V_m / V_{\text{Kolben, Min}}$$

6.1.5 Fazit kLa Wertbestimmung

Die kLa-Wertbestimmung ist Rückblickend erfolgreich verlaufen. Die Annahme, dass ein größtmöglicher Sauerstoffeintrag in Lösung durch eine hohe Schüttelrate in Verbindung mit einem hohen Füllvolumen ermöglicht wird, hat sich durch die Messungen bestätigt. Mit Hilfe dieser Messungen war es möglich vor den anstehenden Fermentationen eine optimale Bedingung für den Sauerstoffeintrag von der Gasphase in die Flüssigphase zu schaffen.

6.2 Fermentation

Tabelle 4: Übersicht Fermentationsversuche

	Fermentationsversuche				
	Kolbenvolumen	Glucosekonz.	Höchster CO ₂ -Wert	Abbildungen	Seite
aerobe Fermentation	1 L	20 g/L	42,3	12	20
	1 L	30 g/L	43,1	14	21
	1 L	40 g/L	42,8	15	22
	2 L	20 g/L	41,9	13	21
	2 L	40 g/L	41,5	16	22
RQ Vergleich aerob	1L	Alle Konz.	-	17	23
	2L	Alle Konz.	-	18	23
anaerobe Fermentation	1 L	20 g/L	68,2	19	26
	1 L	30 g/L	48,1	20	26
	1 L	40 g/L	70,7	21	27
RQ Vergleich anaerob	1 L	Alle Konz.	-	22	27

6.2.1 aerobe Fermentation

6.2.1.1 Durchführung

Der aerobe Versuchsaufbau (siehe Abb. 7) wird mit offenen Kolben durchgeführt. Die Öffnung für den Sauerstoffaustausch ist hierbei über den oberen GL40 Schraubverschluss gegeben. Dieser wird nur mit einer Teflonmembran abgedichtet, welche eine Belüftung mit Sterilbarriere gewährleisten kann.

Aktive Begasung über ein Pumpensystem wird in dieser Versuchsreihe jedoch nicht genutzt. Die Fermentation wird mit den Abgassensoren (O_2 & CO_2) der BlueSens sowie pH Elektroden und pO_2 Sensoren online über das Programm FermVis-pH verfolgt und ausgewertet.

Als Nährmedium wird immer ein Komplexmedium mit Glucose genutzt die Glucosekonzentrationen werden jedoch variiert.

Es wird zur Animpfung immer eine Packung Trockenhefe (7 g) verwendet. Die aeroben Fermentationen werden in 1000 ml und 2000 ml Kolben durchgeführt. Die nun erhaltenen Messwerte sind in Excel zu übertragen und auszuwerten. Dabei werden OTR, CTR und der daraus folgende RQ berechnet.

6.2.1.2 Ergebnisse

Abbildung 12: aerobe Fermentation 1l Kolben 20g/l Glucose 250ml Füllvolumen 200 rpm

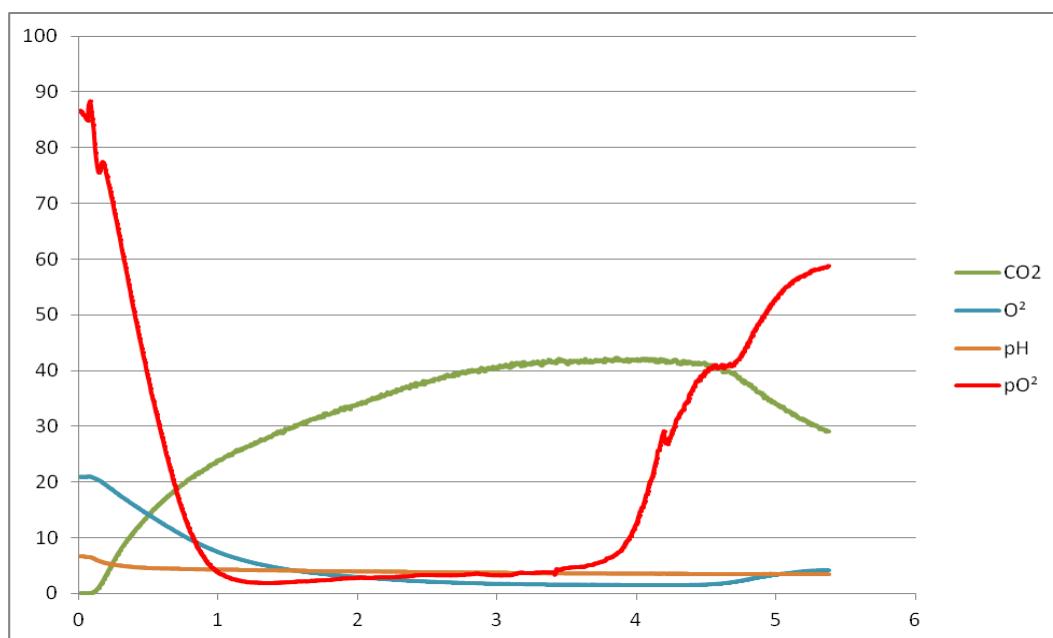


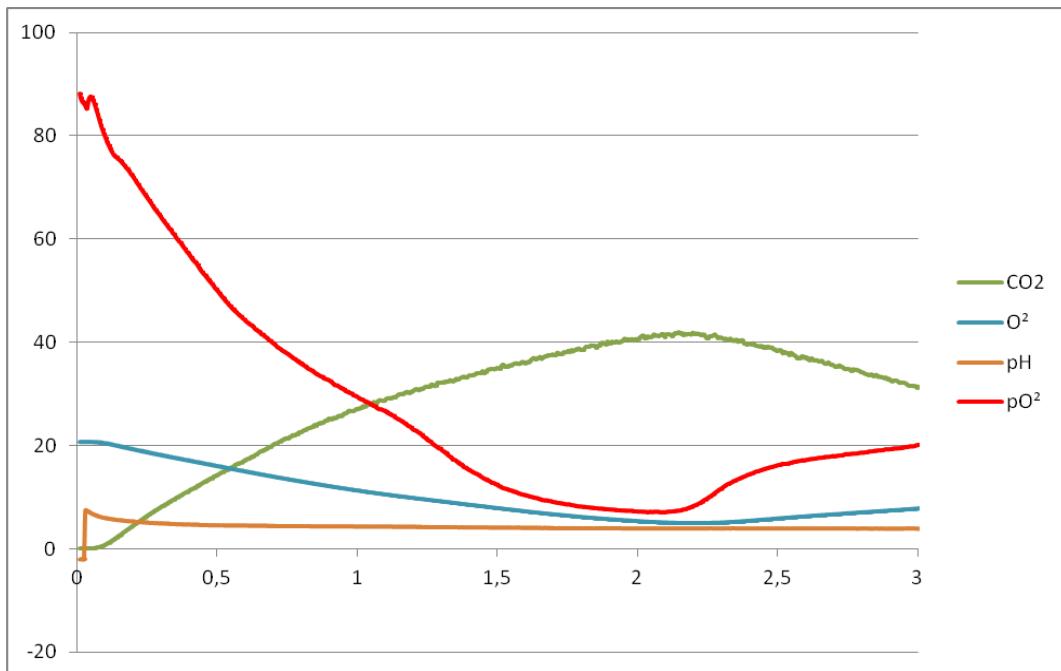
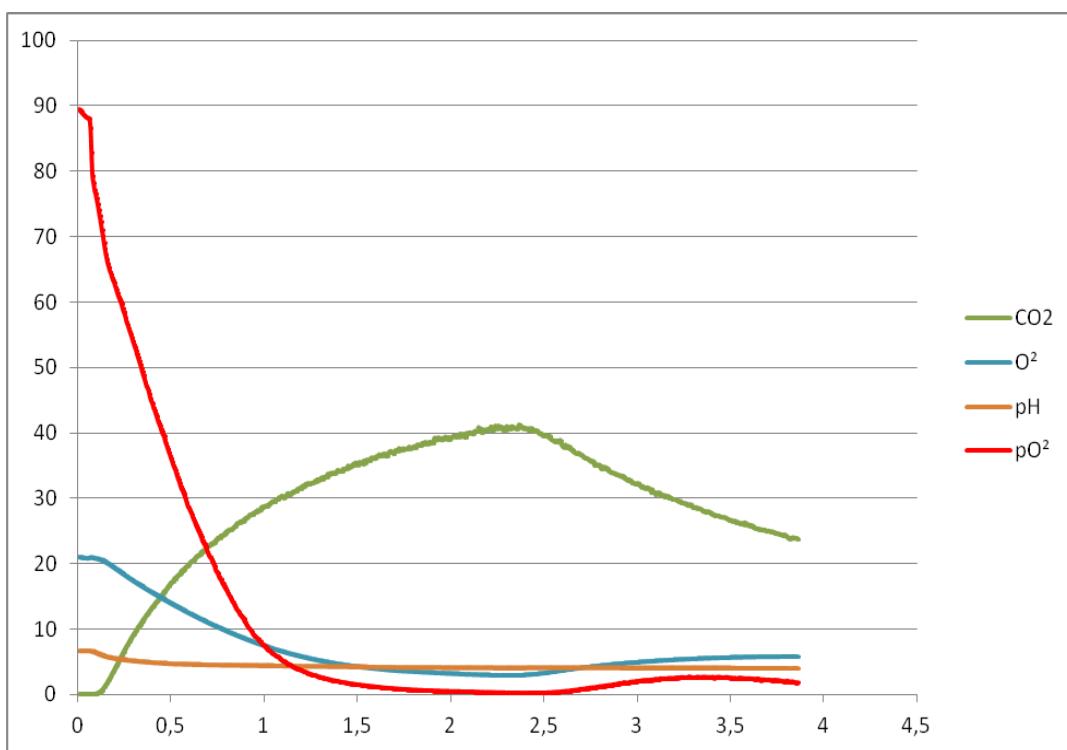
Abbildung 13: aerobe Fermentation 2l Kolben 20g/l Glucose 400ml Füllvolumen 200 rpm**Abbildung 14: aerobe Fermentation 1l Kolben 30g/l Glucose 250ml Füllvolumen 200 rpm**

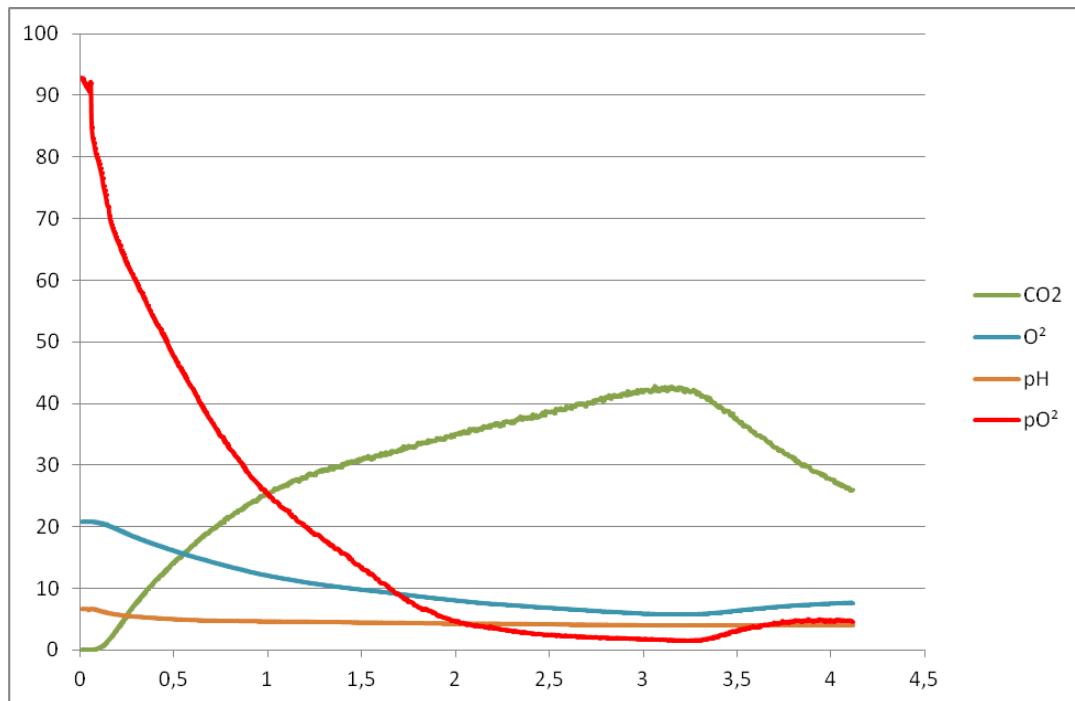
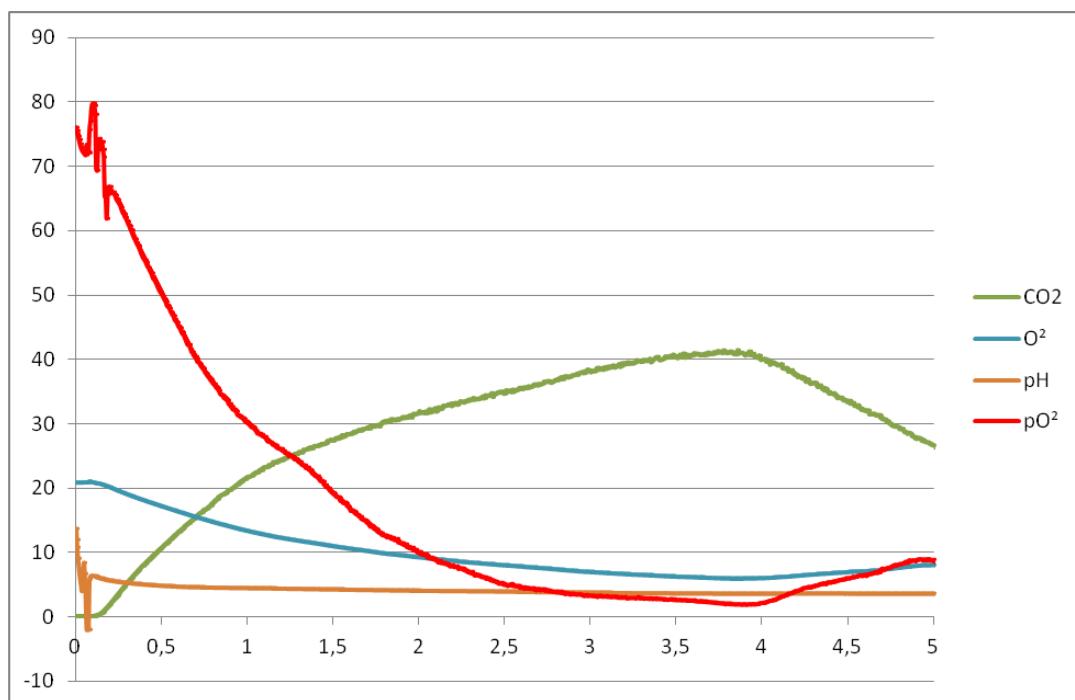
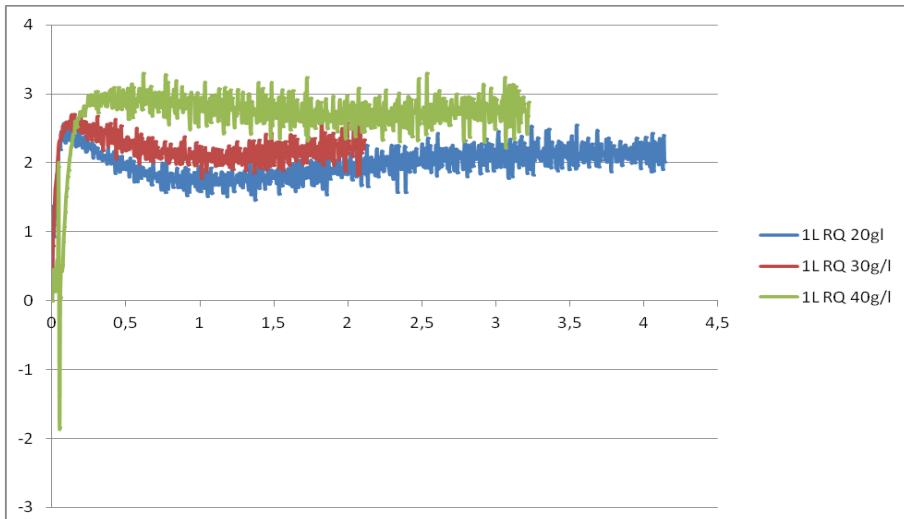
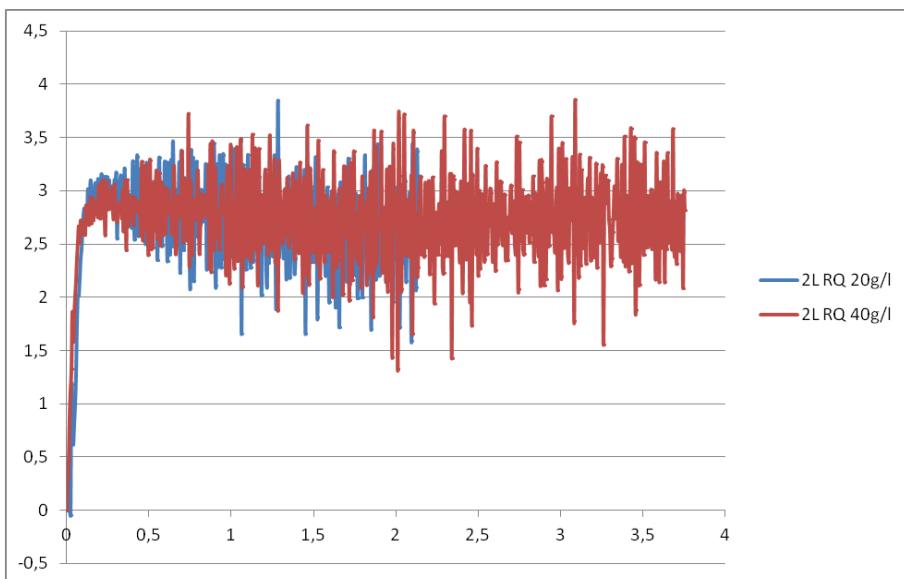
Abbildung 15: aerobe Fermentation 1l Kolben 40g/l Glucose 250ml Füllvolumen 200 rpm**Abbildung 16: aerobe Fermentation 2l Kolben 40g/l Glucose 400ml Füllvolumen 200 rpm**

Abbildung 17: aerobe Fermentation RQ Vergleich 1L**Abbildung 18: aerobe Fermentation RQ Vergleich 2L**

6.2.1.3 Interpretation

Bei den Fermentationen die im Laufe des Projektes durchgeführt wurden, gab es zum ersten Mal nicht nur eine Abgasmessung von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, sondern es wurden zusätzlich zum klassischen Aufbau nun auch pH- und gelöstsauerstoffmessungen mit in die Gesamtmessung einbezogen.

Die aeroben Fermentationen wurden in 1 L und 2 L Schüttelkolben durchgeführt. Die Befüllung mit dem Nährmedium und die Schüttelrate wurden im Hinblick auf die besten kLa-Werte ausgewählt.

Leider kam es bei der zeitlich gesehen letzten Messung bei einer Glucoselösung mit der Konzentration von 30 g/l zum Glasbruch bei beiden 2 L Kolben. Daher konnten bei einer Glucosekonzentration von 30 g/l leider keine Messungen mehr mit den 2 L Kolben durchgeführt werden. Die Variationen mit einer Glucosekonzentration von 20 g/l und 40 g/l liefen jedoch schon vor dem Glasbruch ab, weswegen es hier einen direkten Vergleich zwischen 1 L und 2 L Kolben gibt.

Vergleich 1 L & 2 L Kolben:

1000 ml Kolben 20 g/l Glucose

Bei der ersten Fermentation (Abbildung 12) ist neben dem Verlauf der Abgaswerte O₂ und CO₂ nun auch der Verlauf der beiden neuen Parameter pH und pO₂ zu erkennen.

Bei der Fermentation ist anhand der Sauerstoff- und CO₂-Abgaswerte der typische Verlauf einer Hefefermentation zu beobachten. Der CO₂-Wert steigt kontinuierlich und erreicht nach ungefähr 3,5 Stunden seinen Maximalwert. Dieser hält sich dann ca. eine Stunde konstant und fällt nach ca. 4,5 Stunden ab. Das lässt darauf schließen, dass der Organismus nach dieser Zeit sein Substrat verbraucht hat und kein Produkt mehr erzeugt. Die Plateauphase von einer Stunde könnte durch eine Limitierung des Substrates erklärt werden, welche dazu führt, dass kein CO₂-Anstieg mehr entsteht. Der Abgassauerstoffwert sinkt proportional zum CO₂-Wert und erreicht nach ca. 3,5 Stunden sein Minimum. Der Anstieg des Sauerstoffes nach 4,5 Stunden zeigt ebenfalls, dass der Organismus keinen Sauerstoff mehr veratmet und der Gaswert durch die durchgängig gegebene Öffnung des Kolbens wieder beginnt zu steigen.

An der Gelöstsauerstoffmessung kann man erkennen, dass der Sauerstoff im Medium rapide sinkt, was darauf hindeuten könnte, dass der Metabolismus der Hefen bereits nach kurzer Zeit anaerob verlaufen würde. Der rapide Anstieg des Gelöstsauerstoffes nach ca. 3,5 Stunden jedoch ist als Messfehler zu deuten, welcher durch den Sauerstoffsensor bzw. den Messverstärker ausgelöst wurde. Dieser Wert ist wie deutlich zu erkennen ist, ziemlich unstetig und schwankt deutlich auch beim Anstieg. Da die Hefen zu diesem Zeitpunkt immer noch aktiv sind und der Abgaswert des Sauerstoffes nicht ansteigt, ist dieser rapide Anstieg des Gelöstsauerstoffes nicht plausibel.

Der pH-Wert hingegen sinkt langsam aber kontinuierlich im Laufe der gesamten Fermentation und begibt sich vom neutralen bis leicht sauren Bereich zu Beginn der Fermentation zu einem deutlich sauren Bereich am Ende dieser. Dieser Umstand kann mit dem Crabtree-Effektes erklärt werden. Dabei kommt es durch den hohen Zuckeranteil im Nährmedium dazu, dass der Metabolismus der Hefen anaerob verläuft und die Hefen die Kohlenhydrate nicht nur durch Atmung verwerten, sondern auch unter aeroben Bedingungen alkoholische Gärung betreiben. Bei der Gärung entstehen u.a. organische Säuren als Gärungsnebenprodukte, die den pH-Wert senken.

Anhand des Verlaufes der RQ-Werte die nach Beginn der Fermentation sehr schnell einen Wert über 1 annehmen, kann man erkennen, dass der Metabolismus anaerob abläuft und stützt die Annahme, dass die Hefen die Kohlenhydrate in einer Überschussreaktion zu Ethanol und CO₂ vergären.

2000 ml Kolben 20 g/l Glucose

Die Fermentation im 2 L Kolben (Abbildung 13) läuft zeitlich gesehen deutlich kürzer als erwartet, da mehr Medium für die gleiche Menge an Hefen zur Verfügung steht, sollten diese erwartungsgemäß einen höheren CO₂-Wert erzielen können und für die Verwertung des Substrates eigentlich mehr Zeit benötigen. Auch ein wie schon beim 1 L Kolben beobachtetes Plateau blieb hierbei aus. Dieses Verhalten könnte damit zu erklären sein, dass sich durch eine größere Oberfläche der Flüssigkeit aufgrund des größeren Gefäßes und dem damit gegebenen höheren Sauerstoffanteil im Kopfvolumen des Kolbens logischerweise eine höhere Sauerstofftransferrate ergibt, welche sich direkt in den vorangehenden kLa-Wert Messung gezeigt hat. Allerdings sieht man im direkten Vergleich zum 1 L Kolben, dass der Sauerstoffwert in der Gasphase als auch in Lösung wesentlich langsamer sinkt als im kleineren Volumen. Die Werte für den RQ hingegen liegen wie auch schon bei der Fermentation im 1 L Kolben, deutlich über 1 was wiederum auf den Crabtree-Effekt hinweist und damit auf einen größtenteils anaeroben Metabolismus der Hefen bzw. ein deutliches Zeichen für die alkoholische Gärung ist. Der pH-Wert verläuft ähnlich wie bei der Fermentation im 1 L Kolben und sinkt kontinuierlich und langsam von einem pH von ca. 6 bis zu einem Wert von 3,7, was wiederum ein Indiz für die Gärung ist.

Variation der Glucosekonzentration und ihre Auswirkung auf den Prozess

In weiteren Versuchen wurde die Fermentation bei gleichen Bedingungen wiederholt mit dem Unterschied in der Konzentration der Zuckerlösung.

Die Erhöhung der Zuckerkonzentration hatte vor allem den Zweck zu überprüfen, wie sich diese Veränderung auf die Produktkonzentration, gemessen an der CO₂-Bildungsrate, auswirken würde.

Bei den 1 L Kolben erkennt man anhand der gemessenen Abgaswerte für CO₂ nur leichte bis keine Verbesserungen durch Erhöhung der Glucosekonzentration auf 30 g/l (Abbildung 14) gegenüber der Fermentation mit niedrigerer Glucosekonzentration (20 g/l). Die Fermentationszeit hingegen ist im Vergleich zu der etwas niedrigeren Glucosekonzentration von 20 g/l (Abbildung 13) nur halb so lang. Anhand der Abgaswerte sieht man, dass die CO₂ Produktion nach ungefähr einer Stunde leicht abflacht, nimmt man dazu jetzt den Verlauf der Sauerstoffkurven, erkennt man deutlich, dass diese zu genau diesem Zeitpunkt ihr Minimum erreichen. Somit scheint der Sauerstoff in dieser Zeit von den Hefen veratmet gewesen zu sein und der Stoffwechsel liefe demnach ab diesem Zeitpunkt ausschließlich unter alkoholischer Gärung, was laut Literatur ([1] Haas & Pförtner 2008) eine Verminderung der Biomasseproduktion zur Folge hat. Die CO₂- und Ethanol-Produktionen hingegen nehmen kontinuierlich zu, was der Gleichmäßige Anstieg des gemessenen CO₂-Wertes bestätigen würde. An den Sauerstoffkurven (O₂ Gas und pO₂) sieht man gegen Ende der Fermentation deutlich den Zusammenhang zwischen Gasphasen Sauerstoff und Gelöstsauerstoff. Sobald das Substrat verbraucht ist und der CO₂ Wert wieder sinkt, steigen beide Sauerstoffkurven wie zu erwarten parallel an.

Eine Erhöhung der Glucose auf 40 g/l (Abbildung 15) hingegen verursacht einen leichten Anstieg der CO₂ Produktion. Die Fermentationszeit und der Verlauf der Kurve verlängern sich hierbei hingegen um knapp eine Stunde. Der CO₂ Wert verläuft anfangs recht steil und flacht dann nach ungefähr einer Stunde etwas ab bis er dann nach etwas über drei Stunden sein Maximum bei ca. 42 Vol% erreicht hat. Das Abflachen der Kurve könnte man damit deuten, dass die Hefen bei der hohen Glucosekonzentration in der Limitierung arbeiten was einen eher geringfügigen Anstieg der CO₂-Werte zur Folge hat.

Der Vergleich der RQ-Werte (Abbildung 17) zeigt deutlich eine Ähnlichkeit aller drei Glucosekonzentrationen, wobei der Wert mit Erhöhung der Zuckerkonzentration auch steigt. Dies könnte wieder auf den Crabtree-Effekt hindeuten. Je mehr Zucker eingesetzt wird, desto mehr Zucker müssen die Hefen in einer Überschussreaktion abbauen, da sie nicht das ganze Substrat für die Versorgung der eigenen Lebensfunktionen benötigen, verwerten Sie auch unter aeroben Bedingungen den Zucker über die Alkoholische Gärung zu CO₂ und Ethanol. Was die RQ Werte, welche alle deutlich über 1 liegen bestätigen. Abgesehen von der Höhe der Werte unterscheiden diese sich auch wie schon die Fermentationen in ihrer zeitlichen Spannweite was wie zu erwarten mit den gemessenen Werte korreliert.

Bei den 2 L Kolben wurde aufgrund des Glasbruches nur eine Messung mit einer 40 g/l Glucose zum Vergleich durchgeführt (Abbildung 16). An dieser erkennt man deutlich einen Unterschied zur Messung bei 20g/l Glucose. Die Fermentationszeit verdoppelt sich hier, was darauf hindeutet, dass die Hefen auch doppelt so viel Zeit brauchen um das Substrat zu verwerten. Der CO₂ Wert hingegen erreicht nahezu den gleichen Höchstwert. Ebenso sind alle anderen Verläufe gleich bis auf die Zeitspanne in der die Fermentation abläuft.

Auch der Vergleich zwischen den RQ Werten (Abbildung 18) zeigt deutlich, dass die Messungen parallel verlaufen und sich wieder nur im Hinblick auf die Fermentationsdauer unterscheiden. Somit könnte man vermuten, dass sich eine Erhöhung der Glucosekonzentration nur auf den zeitlichen Ablauf bei der Fermentation im 2L Maßstab auswirkt, da Füllmengen, rpm, Medien und Hefemenge die gleichen waren. Eine Umsetzung des Substrates zugunsten der Produktbildung ließ sich merkwürdigerweise nicht erzielen.

6.2.2 anaerobe Fermentation

6.2.2.1 Durchführung

Der anaerobe Versuchsaufbau (siehe Abb. 8) unterscheidet sich im Aufbau zu den aeroben Versuchen (Abb. 7) nur darin, dass der obere GL40 Schraubverschluss nun mit einem geschlossenen Deckel versehen wird wodurch ein Schlauch geführt wird, welcher in ein Glasgefäß, in diesem Fall ein weiterer Schüttelkolben geführt wird, um den im Kolben entstehenden Überdruck abzulassen aber gleichzeitig eine Zufuhr von Sauerstoff in den Kolben zu unterbinden. Hierbei werden ebenfalls Abgassensoren (O_2 & CO_2), pH und pO^2 Elektroden am Kolben angeschlossen.

6.2.2.2 Ergebnisse

Abbildung 19: anaerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 200 rpm 20g/l Glucose

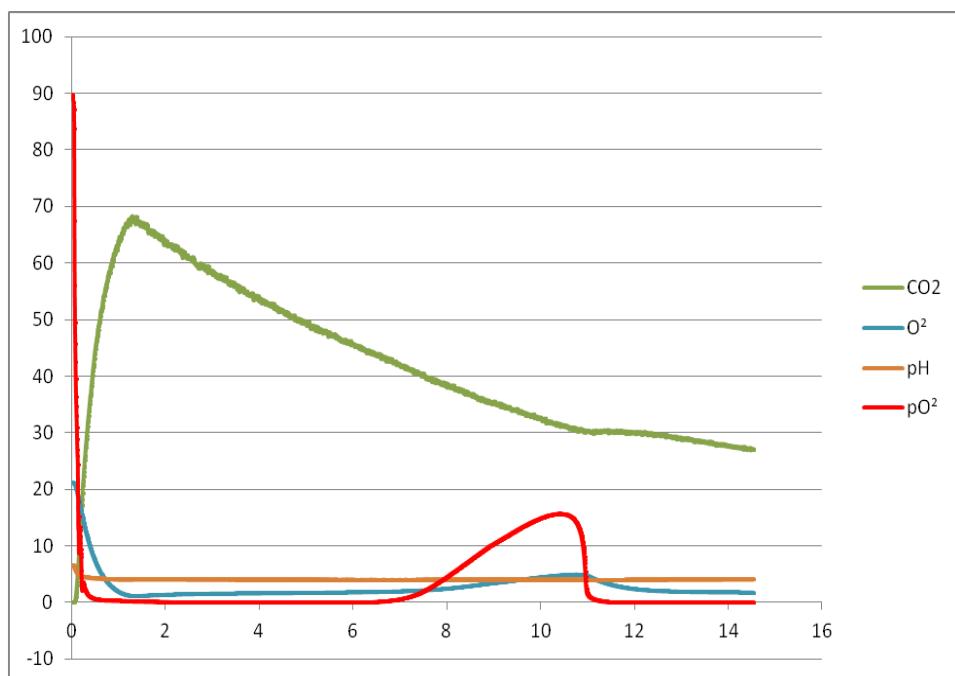


Abbildung 20: anaerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 200 rpm 30g/l Glucose

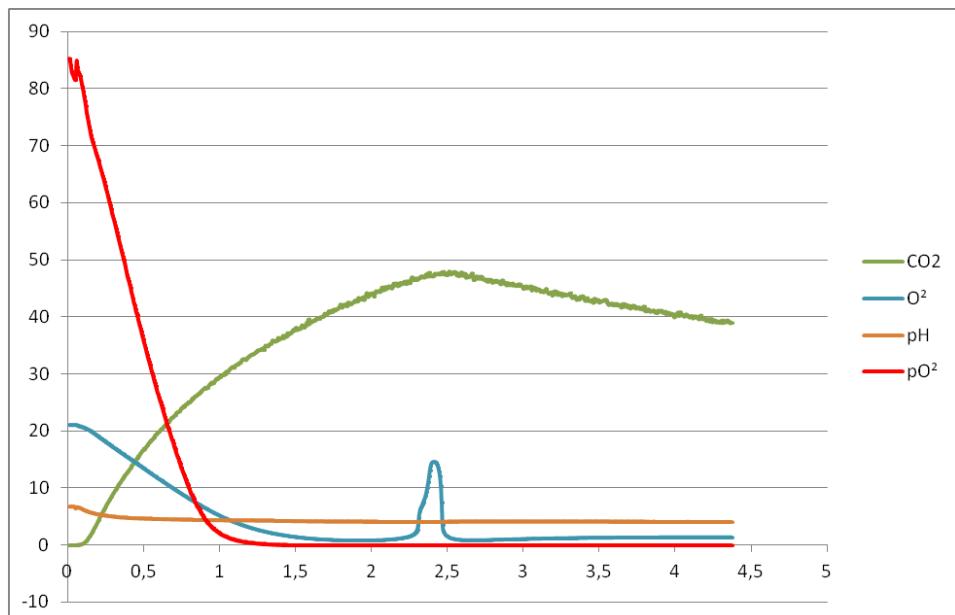
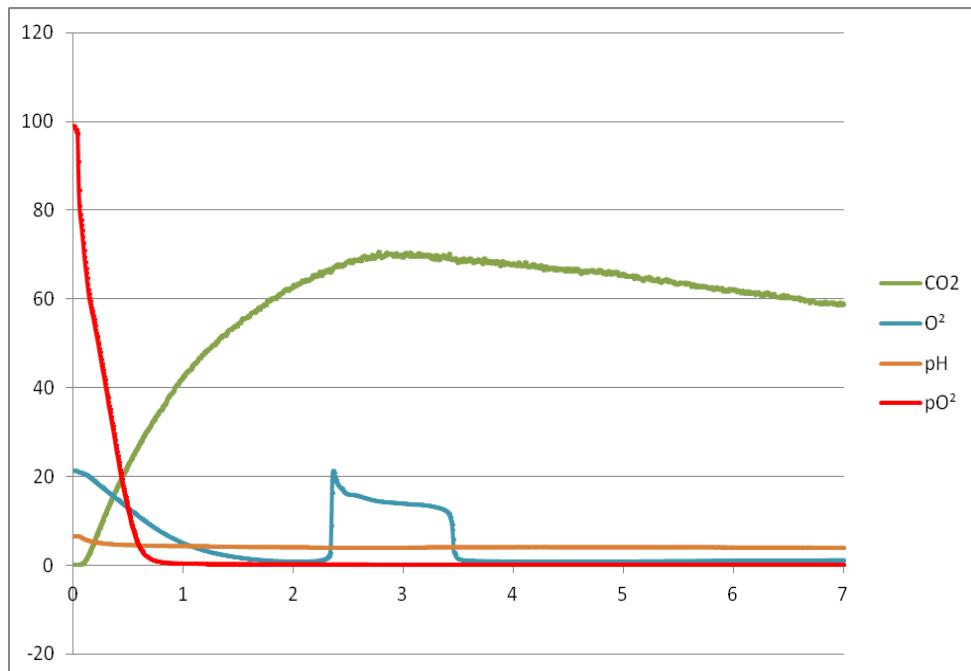
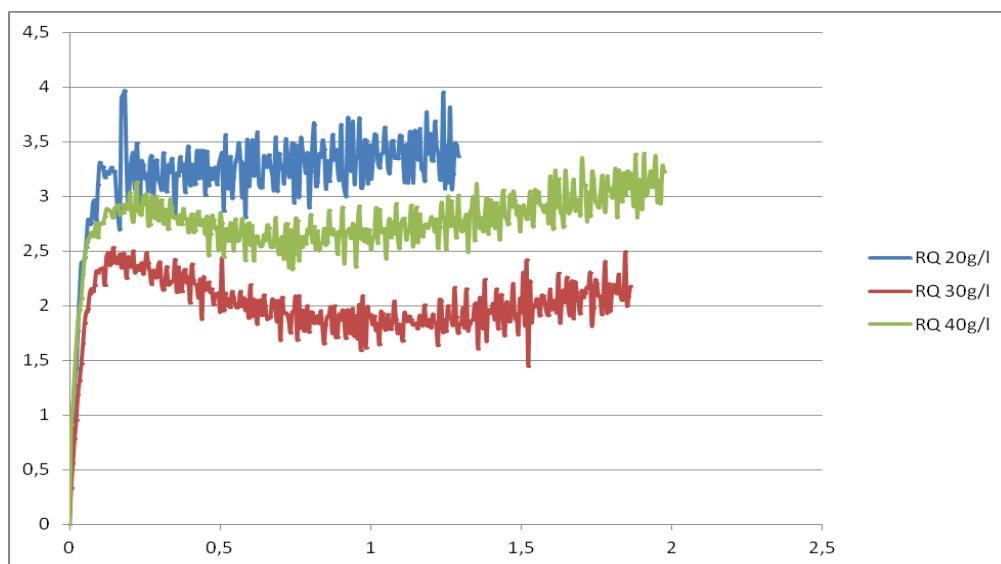


Abbildung 21: anaerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 200 rpm 40g/l Glucose**Abbildung 22: anaerobe Fermentation RQ Vergleich**

6.2.2.3 Interpretation

Bei den anaeroben Fermentationen sollten die Grenzen und die Erweiterung der Leistungsfähigkeit des Systems, bezüglich des Metabolismus der Hefen unter Sauerstoffmangel herausgestellt und diese Verläufe den aeroben Fermentationen gegenübergestellt werden.

Es ergab sich bei 2 von 3 Fermentationen das Problem, dass die Sensorik nicht für diese Art der Versuche geeignet war. So sieht man an den Verläufen der Messungen mit höheren Glucosekonzentrationen (Abbildung 20 & 21) deutlich, dass der Sauerstoffwert nach einer Fermentationsdauer zwischen 2 und 2,5 Stunden der Sauerstoffwert plötzlich rapide angestiegen ist und dann wieder abfällt, der Gelöstsauerstoffsensor jedoch keine Veränderung anzeigt und gleichbleibend bei 0 stagniert. Dieses Phänomen wird dadurch erzeugt, dass die Sauerstoffabgassensoren unter anaeroben Bedingungen über keinen

Sauerstoff mehr verfügen welchen sie messen könnten und dann beginnen andere Gase im Gefäß umzusetzen wie z.B. CO₂. Würde man dies über einen längeren Zeitraum oder mit Organismen durchführen, welche noch andere Gase wie z.B. Methan erzeugen, würde es dazu kommen, dass der Sauerstoffsensor zerstört wird.

Der CO₂-Wert hingegen bleibt über einen sehr langen Zeitraum auf einem hohen Wert und fällt nach Erreichen der maximalen CO₂-Konzentration nur noch sehr langsam ab. Das ist damit zu erklären, dass das Gefäß, anders als beim aeroben Versuchsaufbau, durch einen geschlossenen Reaktor keine Gasaustauschmöglichkeit mit der Umgebungsluft vorweisen kann. Somit sinkt der CO₂-Wert hier nur sehr langsam und der O₂-Gaswert bleibt konstant niedrig.

Daher spiegeln zumindest die Messungen mit den fehlerhaften Werten kein plausibles Ergebnis wieder. Was eine sinnvolle Auswertung der gesamten Fermentation ab dem Zeitpunkt des Sensorausfalls unmöglich macht. Bis zum Erreichen dieses Punktes kann man jedoch nur erkennen, dass die Messkurven für beide Sauerstoffwerte relativ schnell sinken und im gleichen Zug die CO₂ Konzentration kontinuierlich ansteigt, was auf einen anaeroben Metabolismus unter alkoholischer Gärung hinweist. Vergleicht man die RQ Werte so bestätigt sich diese Annahme, da man bei beiden Messungen schon kurz nach Beginn der Fermentation einen RQ über 1 erkennen kann. Da hier kein Sauerstoff vorhanden war, können die Hefen ihr Substrat nur unter alkoholischer Gärung umsetzen. Leider ist eine weitere genaue Auswertung mit Vergleich der drei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen untereinander und mit den Werten der aeroben Fermentationen aufgrund der Problematik der Sensoren nicht wirklich sinnvoll, da man nicht genau erkennen kann inwiefern die Analytik den wirklichen Verlauf der Fermentationen widergespiegelt hat.

Vermutlich würde jedoch das Ergebnis der ersten Fermentation mit einer Glucosekonzentration von 20g/l (Abbildung 19) am besten auf den erwarteten Verlauf zutreffen, hierbei kam es auch noch nicht zu einer Fehlmessung der Sensoren sowie zu einem besonders hohen CO₂-Wert von knapp 70 Vol%, was auf eine hohe Produktbildung im Rahmen der alkoholischen Gärung hindeuten könnte.

Es zeigt sich, dass die Messkurven für beide Sauerstoffwerte (O₂, pO₂) sehr schnell sinken und im gleichen Zug die CO₂-Konzentration rapide ansteigt. Was wie zu erwarten, auf einen Metabolismus der alkoholischen Gärung hinweist. Dieser ist hier gegeben, da die Reaktoren gasdicht verschlossen wurden und den Hefen somit kaum Sauerstoff für die Atmung zur Verfügung steht. Somit läuft ihr Stoffwechsel, nach Verbrauch des Sauerstoffanteils im Kopfvolumen des Reaktors unter anaeroben Bedingungen, also unter alkoholischer Gärung ab. Vergleicht man diese Annahme mit dem RQ-Wert (Abbildung 22) bestätigt sich diese, da die Messung schon kurz nach Beginn der Fermentation einen RQ über 1 anzeigt.

6.2.3 Fehlerbetrachtung

Bei den Fermentationen kam es gehäuft zu Messfehlern in der Sensorik. So gab es das Problem, dass bei den aeroben Fermentationen die CO₂ Werte der Doppelbestimmungen ständig weitaus höher ausfielen als bei den anderen Messwerten, was auf eine Fehlfunktion der CO₂ Sensoren zurückzuführen war, da die Werte nach erneuter Kalibration wieder den anderen Messwerten entsprachen.

Des Weiteren gab es einige Probleme mit den Gelöstsauerstoffsensoren (pO₂), welche auch durchweg unterschiedliche Messverläufe anzeigen. Dieses Problem muss mit den Messverstärkern zusammenhängen, da nach Austausch der Elektroden das Problem weiterhin beim gleichen Messverstärker vorlag. Die hier ausgewerteten Ergebnisse jedoch wurden mit dem intakten Messverstärker ermittelt, was eine Interpretation der Messverläufe möglich machte.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Membrankörper der amperometrischen Sensoren sehr empfindlich sind, so dass es dazu kam, dass diese schon nach kurzer Zeit beschädigt

waren und ausgewechselt werden mussten. Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Sensoren nach fast jedem Fermentationsdurchgang neu kalibriert werden mussten, da die Kontrollmessungen vor Beginn einer neuen Fermentation stark von den zu erwarteten Messwerten der Umgebungsluft abwichen.

Eine rechnerische Fehlerbetrachtung ist hierbei sehr schwierig durchzuführen. Eine Vermutung ist, dass es eventuell mit den Messverstärkern und deren Umsetzung der Signale zusammenhängt. Da die Messverstärker nicht vom selben Hersteller waren wie die Sensoren war eine manuelle sowie digitale Einstellung sowie Nullpunktbestimmung dieser leider nicht möglich. Eine Kalibrierung der Sensoren konnte dazu nur Manuell am Messverstärker selbst durchgeführt werden, da die FermVis Software zu diesem Zeitpunkt noch nicht über die Funktion einer Computergesteuerten Kalibrierung verfügte.

Da die pO_2 Sensoren jedoch in erster Linie der Beobachtung der Fermentation und des Sauerstoffgehaltes in Lösung dienten beeinträchtigten diese Probleme keine der Durchgeführten Berechnungen.

Weitere Probleme zeigten sich während dem anaeroben Versuchsaufbau. Hier kam es zu Fehlerhaften Messdaten von den Sauerstoffsensoren. Diese funktionieren leider nicht unter Sauerstoffausschluss und können daher bei nicht vorhandenem Sauerstoff in der Gasphase kein richtiges Signal messen, daher beginnen Sie nach einiger Zeit damit auch andere Gase im Reaktor umzusetzen, wodurch Sie beschädigt werden können. Dieses Problem hatte sich leider erst nach einigen Messungen durch einen Hinweis der Firma BlueSens aufgeklärt. Da bei den Hefefermentationen jedoch nur CO_2 als Abgas entsteht, wurden die Sensoren glücklicherweise nicht zerstört, sondern haben nur einen fehlerhaften Wert zur Folge gehabt. Bei einem anderen Mikroorganismus mit anderen Abgasproduktionen, beispielsweise Methan wäre es dazu gekommen, dass der Sensor durch diese falsche Anwendung zerstört worden wäre.

Zur Vermeidung dieses Problems müsste man für anaerobe Fermentationen einen anderen Typ von Sauerstoffsensoren verwenden oder ganz auf diesen Parameter verzichten. Das hingegen hätte allerdings zur Folge, dass man daraus dann keine OTR berechnen und damit auch eine Ermittlung des RQ wegfallen würde, was für eine hinreichende Auswertung der Messdaten mehr als kontraproduktiv wäre.

Ein weiterer Problempunkt ist die Befestigung der Sensoren am Kolben. Durch die selbstgebaute Befestigungskonstruktion und dadurch durch eine nicht zu 100% passende Fixierung der Elektroden, kam es zu erheblicher Druckerzeugung an den Quetschdichtungen, wodurch es mehrfach zu Glasbruch am Kolben und auch letztlich leider zur Zerstörung beider pH-Elektroden kam. Dieses Problem ist entweder durch eine Grundlegende Veränderung der Halterungen oder durch eine Sicherung der labilen Stellen zu vermeiden. So könnte man beispielsweise die aus Glas bestehenden pH-Elektroden mit einer Art Metallhülse ummanteln, so dass diese durch Druckeinwirkung geschützt sind. Zum Schutze der Kolben könnten diese durch dickeres Glas an den Zugängen schon bei der Herstellung verstärkt werden.

Eine Gesamtfehlerrechnung ist aufgrund einiger unbekannter Faktoren für Fermentationen nur sehr schwer zu ermitteln, da beim Arbeiten mit lebenden Organismen im Gegensatz zu rein chemischen Experimenten nicht immer alle Faktoren reproduzierbar sind.

So wurden zwar Trockenhefen vom gleichen Hersteller genutzt aber wie diese sich in einem Prozess verhalten (Lösung im Medium, Ansprechzeit im Prozess etc.) kann immer unterschiedlich sein. Dafür müsste man weitreichende Feldversuche durchführen und so einen gemittelte Abweichung bei verschiedenen Versuchsbedingungen errechnen, was zeitlich in dieser Versuchsreihe nicht möglich war.

Ein weiterer Faktor sind die Temperaturschwankungen der Nährmedien welche zu Beginn noch kühl sind, sich im Verlauf der Fermentation durch die Reaktion der Hefen jedoch aufwärmen, lässt mit den in dieser Versuchsreihe gegebenen Bedingungen (keine

Temperierung der Kolben durch fehlen einer Heizhaube) leider auch nicht exakt ermitteln, was letztendlich eine Gesamtfehlerrechnung schwierig macht.

6.2.4 Fazit Fermentation

aerob

Zu den aeroben Fermentationen ist zu bemerken, dass diese größtenteils wie erwartet abliefen und man einen guten Überblick über die Funktionsweise des Organismus erhalten hat. Die Auswertung bezog sich hier nur auf die CO₂-Bildung, wobei bei den Doppelbestimmungen teilweise unterschiedlich hohe Werte ermittelt wurden. Das ist vermutlich auf einen Messfehler des CO₂-Sensors zurückzuführen, welcher außerhalb der Werte für diesen Gerätefehler liegt und durch erneute Kalibration behoben werden konnte.

anaerob

Die anaeroben Messungen konnten aufgrund der Sensorproblematik zu keinem eindeutigen Ergebnis führen einzige und allein die erste Messung bei der die Sensoren noch funktionsfähig waren ließ, einen Einblick in das Verhalten des Organismus bei strikt anaeroben Bedingungen zu. Jedoch konnten leider keine Vergleiche zwischen der Variation der Glucosen gezogen werden und somit auch kein kompletter Vergleich zwischen aerober und anaerober Messung.

6.3 Regulation und Prozessoptimierung

Die Regulation und Prozessoptimierung wird in 3 Teilschritte unterteilt. Hierbei geht es in erster Linie darum, das Verhalten der Hefen bei der Regulierung des pH Wertes durch NaOH zu beobachten und dann im Folgenden eine Fütterung mit Glucose durchzuführen. Am Ende werden diese beiden Methoden kombiniert, um zu beobachten ob sich der Prozess durch diesen Einfluss verbessern lässt.

Tabelle 5: Übersicht Prozessoptimierung und Regulation

Prozessoptimierung und Regulation						
	NaOH Konzentration		fedbatch mit 30 g/l Glc	Höchster CO ₂ Wert	Abbildung	Seite
	0,1 molar	1 molar				
pH Regulation	x			54,7	23	31
		x		54,9	25	32
RQ Vergleich NaOH konzentrationen					27	33
<hr/>						
fedbatch-Fermentation			x	60,4	28	34
RQ Verlauf					30	35
<hr/>						
pH Regulation + fedbatch Fermentation		x	x	61,9	31	36
RQ Vergleich Gesamt					33	37

6.3.1 pH Regulation mit NaOH

Der letzte Teil der Versuchsreihe befasste sich mit der Möglichkeit eine Prozessoptimierung durch unterschiedliche Methoden zu erzielen und wurde in drei Teilschritte gegliedert: pH-Regulation, fedbatch, und Kopplung der pH-Kontrolle mit gleichzeitigem fedbatch. Alle Versuche wurden mit dem aeroben Versuchsaufbau bei einer Glucosekonzentration von 30 g/l durchgeführt. Aufgrund von Materialschonung wurde die Schüttelrate von 200 rpm auf 150 rpm gesenkt, da zuvor durch das Problem mit der Elektrodenbefestigung eine der pH-

Elektroden gesprungen ist und man nicht ausschließen konnte ob dies möglicherweise auch durch eine zu hohe Kraft auf die Elektrode während einer relativ hohen Schüttelrate verursacht wurde. Desweitern ist zu erwähnen, dass die Gelöstsauerstoffmessung bei diesen Versuchen herausgenommen wurde, da an den vorhandenen Schüttelkolben sonst keine Anschlussmöglichkeit für die Pumpe mehr gegeben war. Da für die Versuche allerdings nur eine Pumpe zur Verfügung stand konnten von vornherein keine zeitgleichen Doppelbestimmungen durchgeführt werden, weswegen diese nacheinander abliefen.

6.3.1.1 Durchführung

Im ersten Schritt werden zwei unterschiedlich konzentrierte NaOH Lösungen (1 molar & 0,1 molar) angesetzt um die Sensitivität der pH Kontrolle zu erproben.

Die Lösungen werden daraufhin in verschiedenen Ansätzen mit Hilfe einer Pumpe durch den nun freien GL25 Schraubverschluss über eine Gummidichtung zugeführt.

Die Regulation erfolgt immer dann, wenn der pH-Wert unter 4,5 annimmt, um diesen in einem für die Hefen optimalen Milieu zwischen 4,5 und 5 zu halten.

Alle anderen Versuchsaufbauten sind identisch mit denen aus dem aeroben Versuchsaufbau und aus diesen Durchführungen zu entnehmen.

6.3.1.2 Ergebnisse

Abbildung 23: aerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 150 rpm 30g/l Glucose pH Kontrolle mit 0,1M NaOH

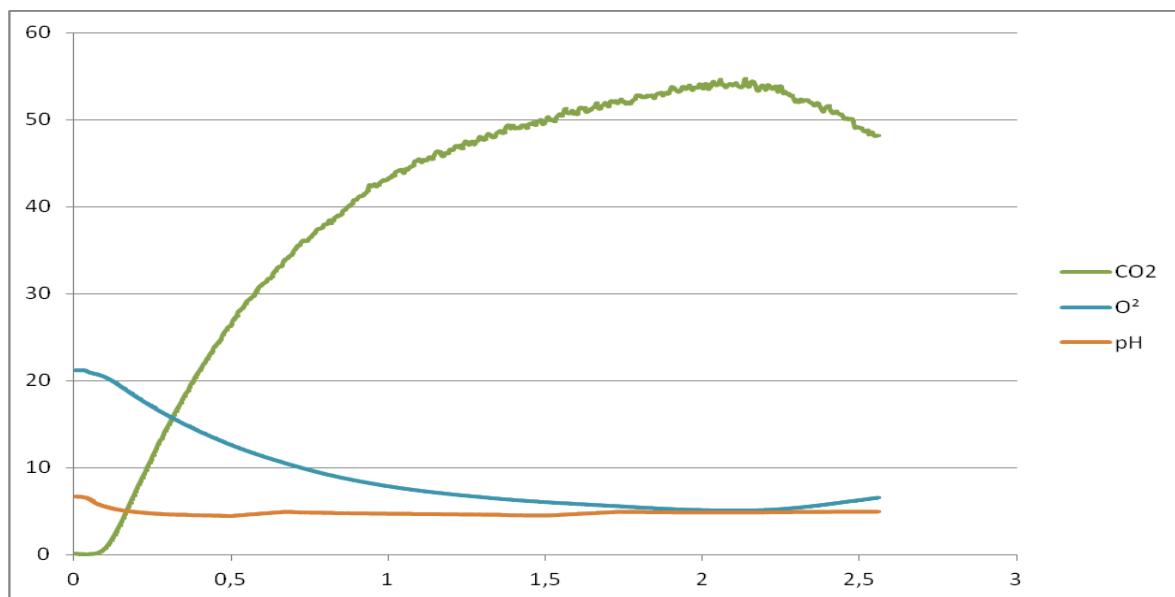


Abbildung 24: vergrößerter pH Verlauf von Abb. 22

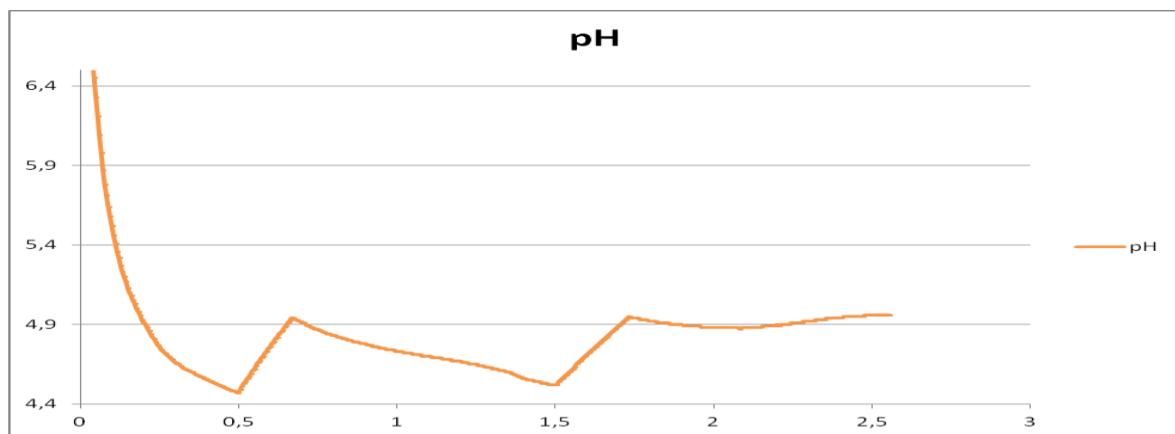


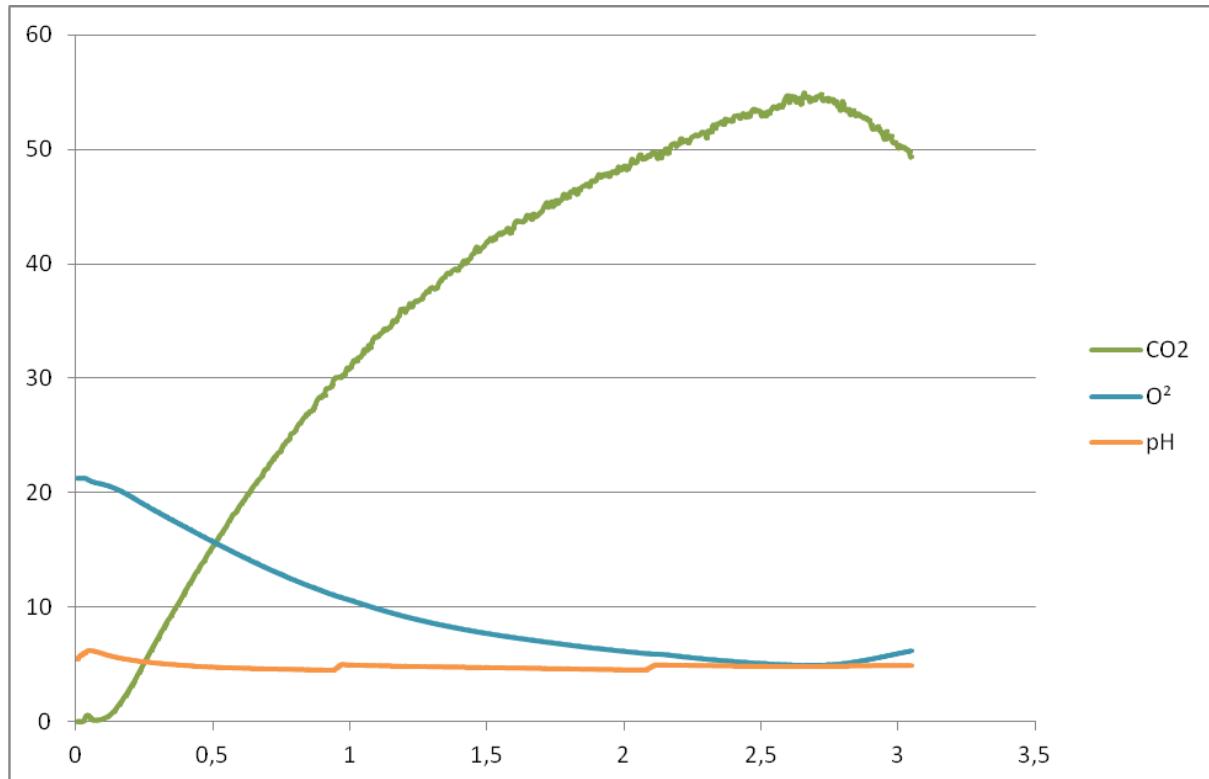
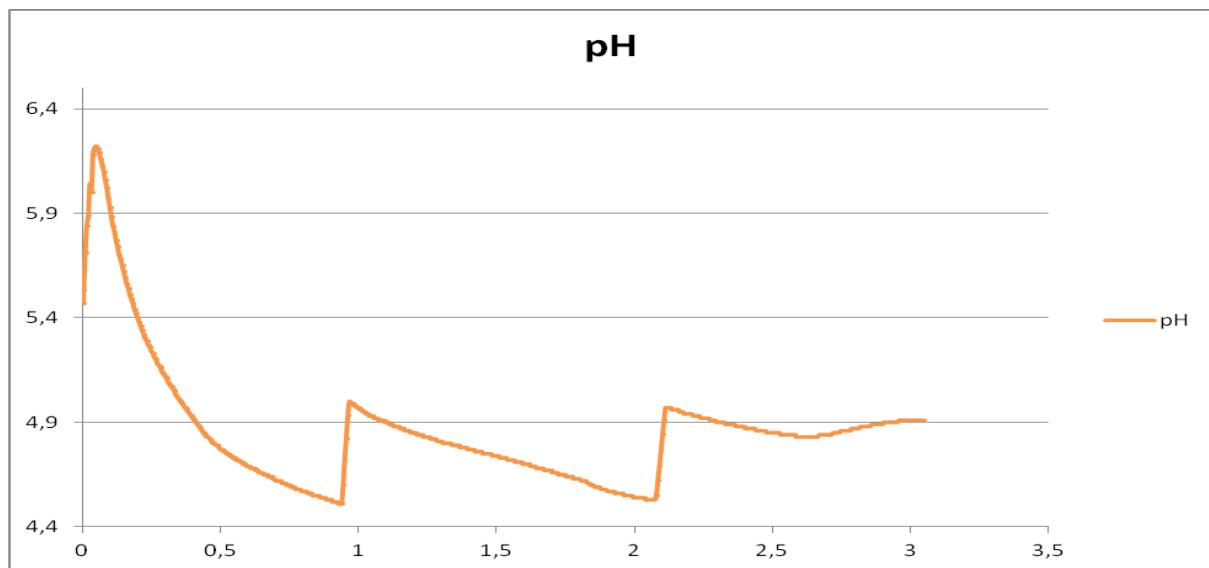
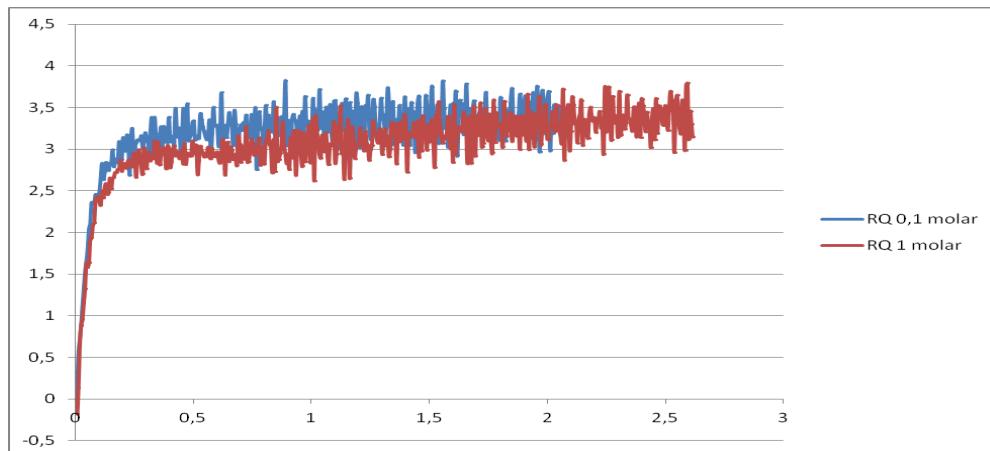
Abbildung 25: aerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 150 rpm 30g/l Glucose pH Kontrolle mit 1M NaOH**Abbildung 26: vergrößerter pH Verlauf von Abb. 24**

Abbildung 27: RQ Vergleich pH NaOH 0,1 M & 1 M

6.3.1.3 Interpretation

Die pH Regulation wurde selbst nochmals in zwei Teilschritte gegliedert, da eine Zufuhr von zwei unterschiedlich konzentrierten NaOH Lösungen erprobt wurde um die Sensitivität der pH Kontrolle zu beobachten.

Der erste Versuch wurde mit einer 0,1 molaren, der zweite Versuch mit einer 1 molaren Natronlauge durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der pH Wert auf 5 angehoben wurde sobald dieser unter einen Wert von 4,5 gesunken ist. Dies lässt sich sehr gut an den Abbildungen 23-26 erkennen. Der Verlauf der Abgaswerte zeigt deutlich, dass im Gegensatz zu den unregulierten aeroben Fermentationen, durch die Kontrolle des pH Wertes eine gesteigerte CO₂ Produktion zu verzeichnen war. Dies gelang trotz einer niedriger gewählten Schüttelrate, welche normalerweise einen niedrigeren kLa Wert zur Folge hätte und somit auch eine geminderte Sauerstoffaufnahme in Flüssigphase bewirken würde. Da dies jedoch nicht der Fall war, lässt es darauf schließen, dass der Sauerstoffeintrag bei der hoch gewählten Glucosekonzentration keine drastische Auswirkung auf den Verlauf der Produktbildung zur Folge hatte. Betrachtet man die RQ Werte erkennt man wieder einen anaeroben Metabolismus verursacht durch den Crabtree-Effekt bei dem das Substrat sowieso durch Gärung umgesetzt wird und die Aufnahme von Sauerstoff hier eher unwesentlich für die Produktionsrate von CO₂ ist.

Die Verläufe der beiden unterschiedlichen Versuche sind sich allgemein gesehen, sehr ähnlich und unterscheiden sich nur dadurch, dass sich der Anstieg des CO₂ Wertes bei der 0,1 molaren NaOH nicht so rapide abzeichnete wie bei der höher konzentrierten Lösung. Zeitlich gesehen liefen die beiden Fermentationen jedoch nahezu gleich ab. Zu erwähnen ist hierbei der Unterschied bei der Regulation zwischen den unterschiedlich konzentrierten Glucoselösungen. Man kann auf Abbildung 24 und 25 deutlich einen Unterschied erkennen, welcher sich dadurch bemerkbar macht, dass die Anhebung des pH bei der niedrig dosierten Lösung (Abb. 24) eher langsam und Sensitiv erfolgte, bei der etwas höher konzentrierten (Abb. 25) jedoch schneller und effektiver. Möglicherweise ist das Verhalten der CO₂ Produktion darauf zurückzuführen, dass der Zufluss an Flüssigkeit bei der 1 molaren Lösung geringer ist, wodurch eine Erhöhung des Füllvolumens unterbunden wird und der pH schneller wieder auf ein Optimum gebracht wurde, als bei der niedrigen Konzentration.

Jedoch war ein deutlicher Anstieg von CO₂ gegenüber den normalen Fermentationen und bei den Doppelbestimmungen zu beobachten. Daher könnte man vermuten, dass die Regulation des pH-Wert zu einer Verbesserung der Produktbildung führen kann.

6.3.2 fedbatch-Fermentation mit Glucose

6.3.2.1 Durchführung

Im Nächsten Schritt wird eine sogenannte fedbatch-Fermentation durchgeführt. Dabei wird zum Startzeitpunkt eine etwas niedrigere Befüllung der Kolben (200 ml statt 250 ml) gewählt. Sobald die CO₂ Produktion der Hefen einen stabilen Wert erreicht, wird die Kultur über eine Pumpe mit weiterer Glucoselösung kontinuierlich gefüttert, um schließlich auf das aus den kLa-Wert Berechnungen erhaltene optimale Füllvolumen zu kommen (250 ml) und somit einer vorzeitigen Substratlimitierung entgegenzuwirken. Die Messung endet sobald die Abgasproduktion des Organismus schließlich durch aufbrauchen des Substrates abfällt.

Alle anderen Aufbauten sind gleichwertig mit denen aus dem aeroben Versuchsaufbau und aus den Durchführungen zu entnehmen.

6.3.2.2 Ergebnisse

Abbildung 28: aerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 150 rpm 30g/l Glucose fedbatch: 30g/l Glucose

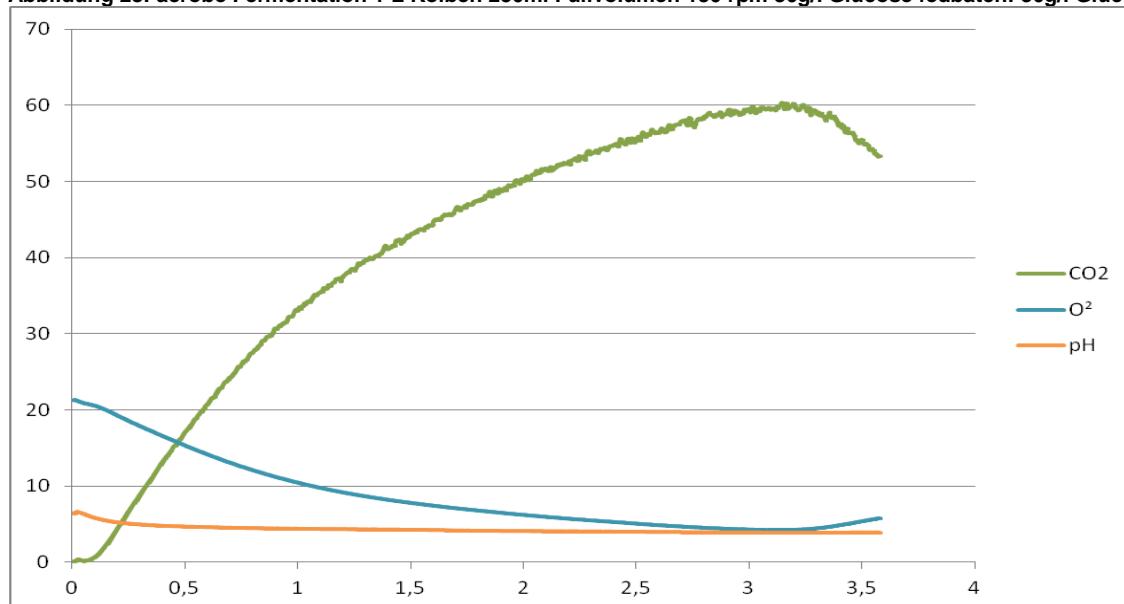


Abbildung 29: vergrößerter pH Verlauf aus Abb. 27

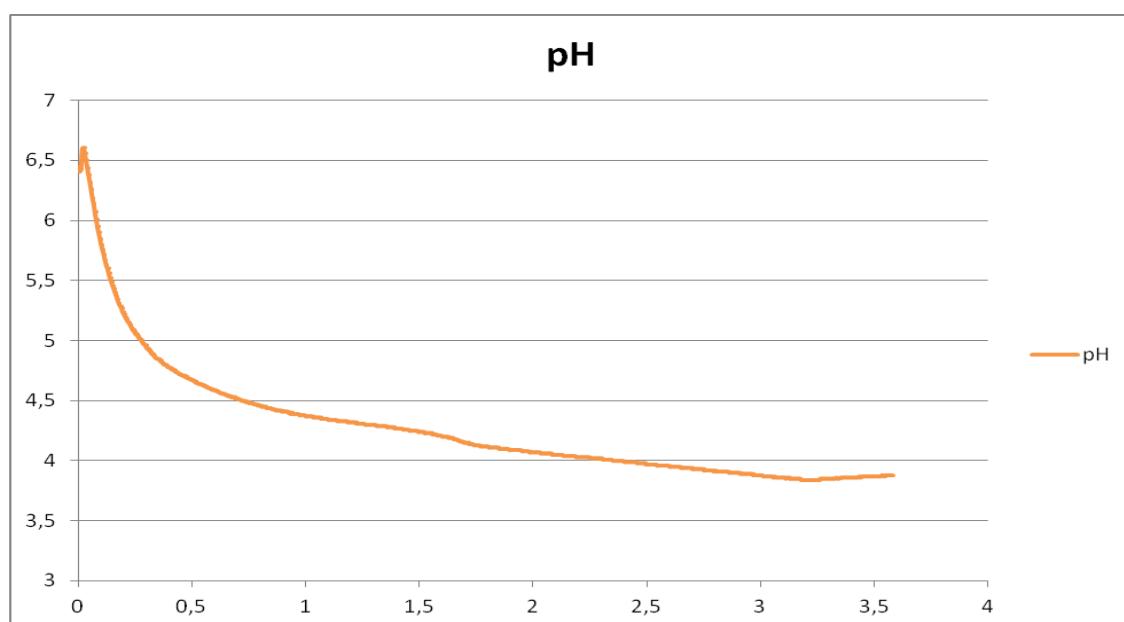
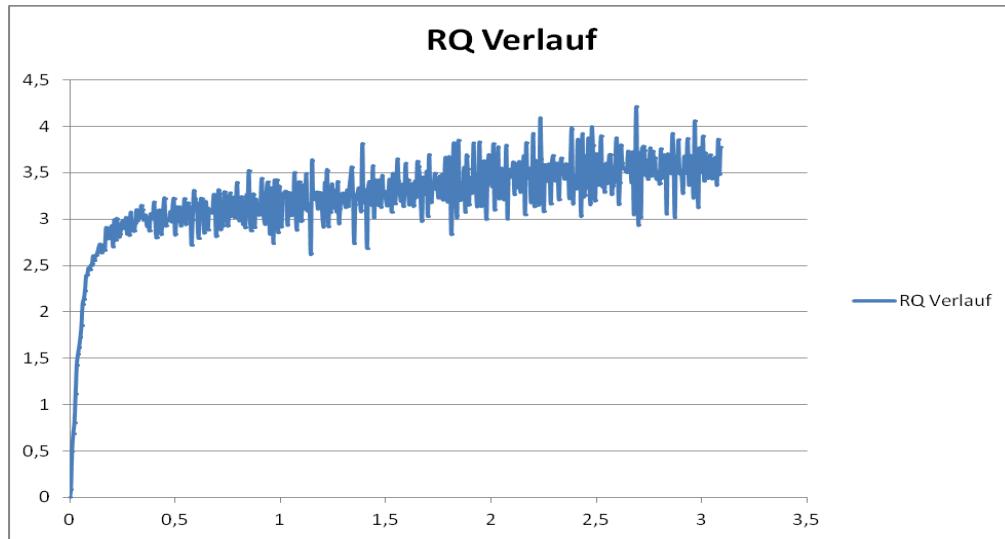


Abbildung 30: RQ Verlauf der fedbatch-Fermentation

6.3.2.3 Interpretation

Das Zulauf Satz Verfahren (fedbatch) wird gewöhnlich dazu genutzt, einem vorzeitigen Verbrauch der Nahrungsquelle eines Organismus vorzubeugen um dadurch eine höhere Produktausbeute zu erzielen. Jedoch ist es in der Regel so, dass die Fütterung mit einer weitaus höher konzentrierten Zuckerlösung durchgeführt wird, als es in dieser Versuchsreihe der Fall war, daher ist zwar anhand der CO₂ Produktion (Abb. 28) ein deutlicher Anstieg zu erkennen, welcher möglicherweise noch weiter hätte gesteigert werden können. Hinzu kommt, dass nach Erreichen der vorher gewählten maximalen Befüllung (50 ml Zulauf) die Pumpe abgeschaltet wurde und kurze Zeit später auch noch der Rest der sich im Gefäß befindlichen Zuckerlösung über die Pumpe zugeführt wurde, um zu beobachten ob dadurch eine noch höhere Produktbildung erzielt werden kann.

Weiterhin ist zu beobachten, dass nachdem die Pumpe nach Aufbrauchen der Glucoselösung abgeschaltet wurde, der Organismus das zusätzliche Substrat sehr schnell verbraucht hat, wodurch die weitere Produktbildung durch Substratverbrauch stoppte und die Messung somit endete.

Wie man jedoch erkennen kann, wurde die CO₂ Produktion durch die Zufütterung verlängert und gegenüber den zuvor durchgeföhrten Versuchen gesteigert.

Zum Vergleich kann man am Verlauf des pH-Wert (Abb. 29) deutlich erkennen, dass sich dieser trotz Zugabe von Glucose nicht merkbar verändert hat. Das führt zu der Annahme, dass eine geregelte Kontrolle des pH durch reine Zugabe von normaler Glucose nicht bewerkstelligt werden kann und somit eine Zufuhr einer alkalischen Lösung zur Anhebung des Wertes benötigt wird um das Milieu für Hefen im optimalen Bereich zwischen 4,5 und 5 zu halten.

6.3.3 Prozessoptimierung durch pH Regulation und gleichzeitiger fedbatch-Fermentation

6.3.3.1 Durchführung

Letztlich wurden pH Regulation und fedbatch-Fermentation kombiniert, um zu beobachten wie sich diese Regulation in Verbindung mit einer Fütterung verhält.

Dazu wird die Glucose über eine Pumpe zugeführt und die NaOH Lösung mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle bewerkstelligt. Beide Zuläufe werden über den mit einer Gummidichtung verschlossenen GL25 Schraubverschluss ermöglicht.

Der Aufbau ist dabei der gleiche wie bei den zuvor durchgeführten Versuchen pH Regulation und fedbatch-Fermentation.

6.3.3.2 Ergebnisse

Abbildung 31: aerobe Fermentation 1 L Kolben 250ml Füllvolumen 150 rpm 30g/l Glucose pH Kontrolle mit 1M NaOH fedbatch 30g/l Glucose

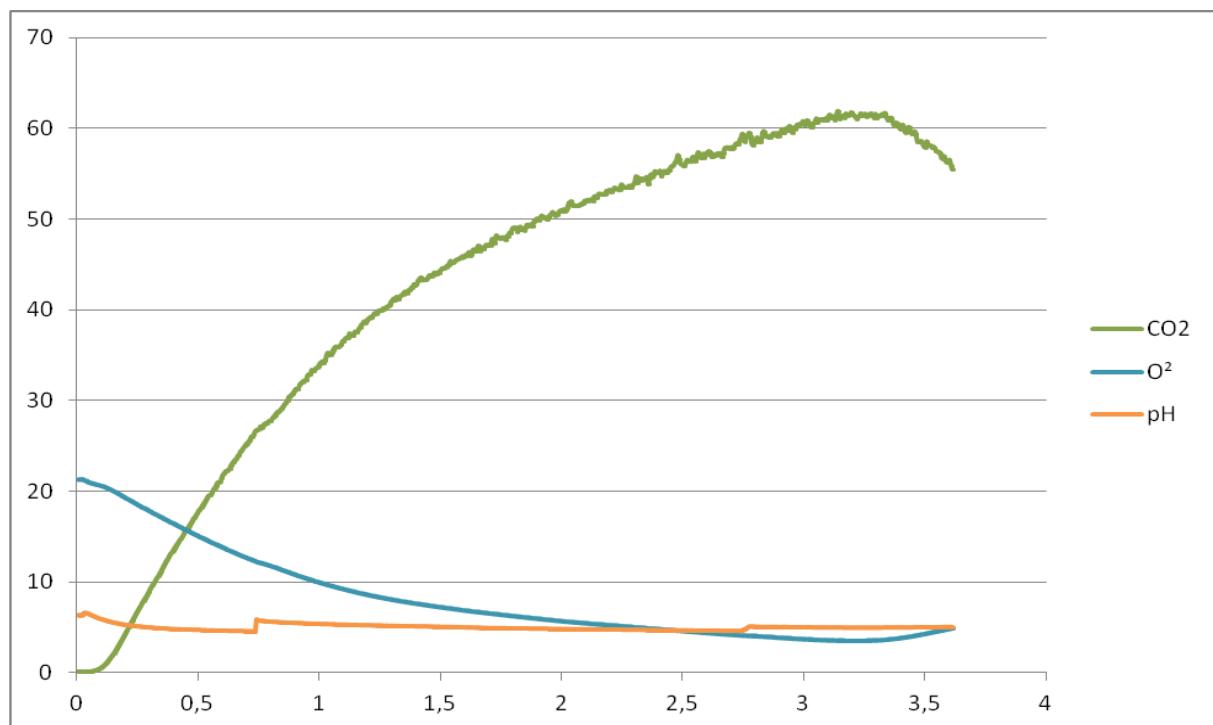


Abbildung 32: vergrößerter pH Verlauf aus Abb. 29

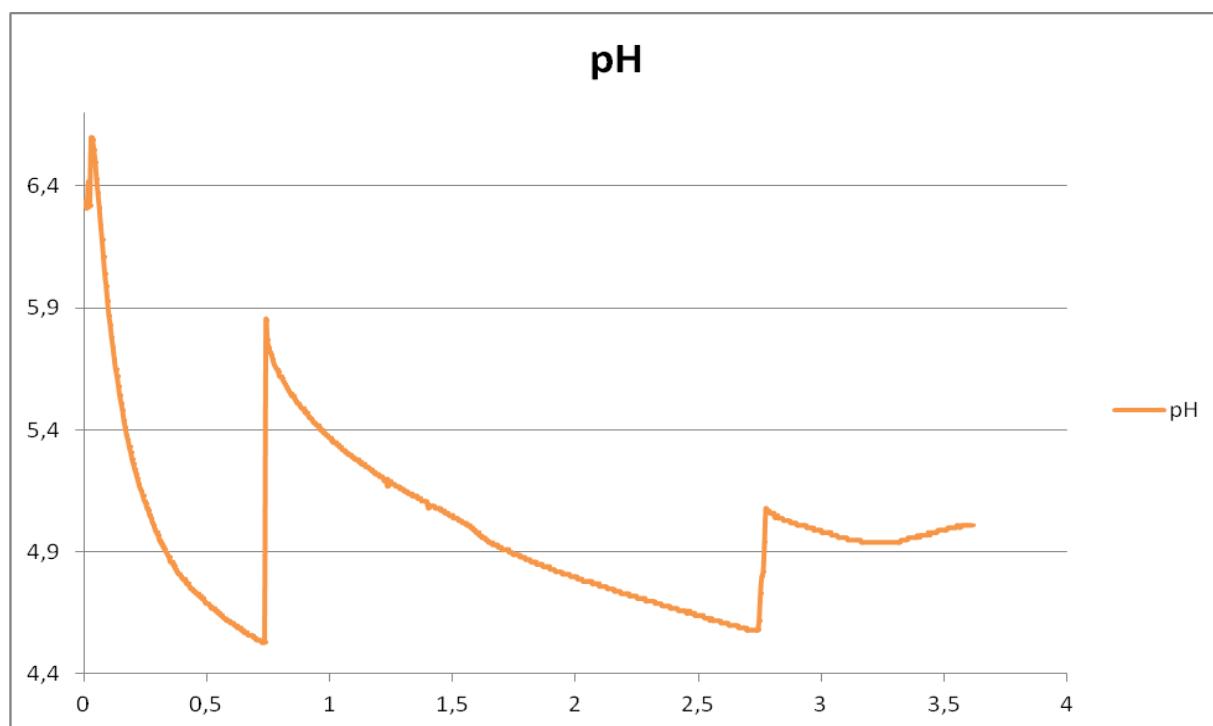
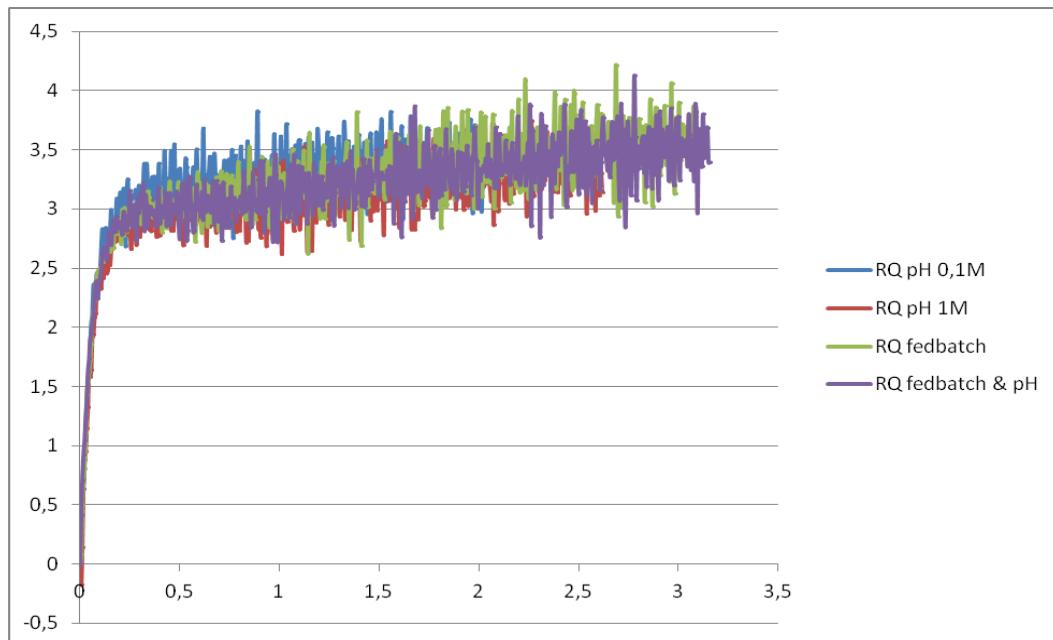


Abbildung 33: RQ Vergleich aller Versuche der Prozessoptimierung

6.3.3.3 Interpretation

Anhand des in Abbildung 31 dargestellten Fermentationsverlaufes ist deutlich zu erkennen, dass sich die CO₂ Bildung bei der gegebenen pH Kontrolle gekoppelt mit einer Zufütterung von Glucose im Gegensatz zu den zuvor getrennt durchgeföhrten Versuchen noch um einen Wert von ca. fünf Volumenprozent erhöhen ließ. Das führt zu der Annahme, dass diese beiden Methoden in einem Versuchsaufbau kombiniert, eine bessere Prozessführung ermöglichen könnten. Da die Versuche jeweils immer mit den gleichen Sensoren, Chargen an Medium und Glucosen durchgeführt wurden, um eine Schwankung durch veränderte Zusammensetzung zu vermeiden, könnte man diesen Verhalt im Fokus auf die CO₂ Produktion als erfolgreiche Produktsteigerung der Hefen werten. Ein Vergleich der RQ Werte für die Versuche der Prozessoptimierung zeigt, dass wie schon bei allen zuvor durchgeföhrten aeroben Fermentationen Werte deutlich über 1 ermittelt wurden, was wieder auf einen größtenteils anaeroben Metabolismus hinweist.

6.3.4 Fehlerbetrachtung Prozessoptimierung

Bei der Prozessoptimierung gibt es zusätzlich zu den schon in der Fehlerbetrachtung für die Fermentationen diskutierten Probleme nur Verbesserungsvorschläge, die die Versuche noch weiter optimieren würden und so zu noch besseren Ergebnissen führen könnten.

Zum einen wäre es besser mit Kolben zu arbeiten, welche von Beginn an schon mindestens ein bis zwei weitere Zugänge hätten, um so ein Ausschließen von Messinstrumenten wie in diesem Fall der pO₂ Sensor zu vermeiden. Somit hätte man weitere Zugänge zum Kolben an die man noch weitere Sensoren anschließen könnte oder Zugänge für Probenentnahmen oder Begasungsschläuche.

Eine Gesamtfehlerrechnung ist auch hier aufgrund der in 6.2.4 bereits genannten Gründe nur schwer durchzuführen.

6.3.5 Fazit Prozessoptimierung

Rückblickend ist zu sagen, dass die Versuche der Prozessoptimierung bei jeder durchgeführten Variante eine Verbesserung der CO₂ Produktion gegenüber den unregulierten Fermentationen bewirkt haben. Eine Kopplung der pH-Kontrolle mit einer Glucosezufütterung hat im Endeffekt das beste Ergebnis nur im Hinblick auf die CO₂ Produktion bewirkt.

Aufgrund der vorher durchgeführten Versuche zur pH-Regulation hat es sich bewährt bei der pH-Regulation mit gekoppeltem fedbatch die höher konzentrierte Natronlauge zu wählen, da von dieser weniger zusätzliche Flüssigkeit im Kolben ausgeht und diese den pH-Wert schnell und effektiv anheben kann. Da für diesen Versuch jedoch nur eine Pumpe zur Verfügung stand musste die NaOH Lösung mit einer Spritze von Hand dazu gegeben werden, was die Dosierung während der Messung mit angestelltem Schüttler deutlich erschwerte, was man sehr gut an dem pH-Verlauf (Abb. 31) im Vergleich zu denen die mit der Pumpe durchgeführt wurden, erkennen kann. So wären beispielsweise zwei getrennte Pumpen sinnvoller um eine geregelte Zufuhr beider Lösungen (NaOH und Glucose) zu gewährleisten.

Der Vergleich der RQ Werte zeigt, dass der Metabolismus der Hefen bei allen Versuchen der Prozessoptimierung größtenteils anaerob verlief was die Werte über 1 bestätigen. Die Verläufe sind bei allen Versuchen fast identisch und unterscheiden sich nur minimal untereinander.

7 Zusammenfassung, Schlussbetrachtung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung & Schlussbetrachtung

Das neu entwickelte System ist eher als ein Ausbau des bereits vorhandenen zu betrachten.

Allerdings ist zu erkennen, dass die Funktion der pH Online Messung einen wichtigen Zuwachs zu den bisherigen Funktionen des Systems darstellt. Wenn Beispielsweise mit einem empfindlicheren Organismen als *Saccharomyces cerevisiae* gearbeitet wird, ist es sehr sinnvoll auch den pH-Wert beobachten und regulieren zu können, um somit ein optimales Milieu im Reaktor zu schaffen und dadurch bessere Prozessbedingungen zu erzielen.

Auch die Gelöstsauerstoffmessung ist ein interessanter Parameter, welcher besonders bei Organismen die auf viel Sauerstoff in Lösung angewiesen sind, als sinnvoll betrachtet werden kann. **Im Zusammenhang mit Hefefermentationen war er allerdings nicht notwendig, da die Abgassensoren das gleiche Messergebnis aufzeigen konnten.** Da die Hefen aufgrund der hohen Glucosekonzentrationen meist zu Beginn schon einen anaeroben Metabolismus nutzten (Vgl. RQ-Werte), wurde der sich im Gefäß befindliche Sauerstoff sehr schnell aufgenommen und veratmet, wodurch der Sauerstoffwert in Lösung parallel zum Abgaswert schnell auf ein Minimum sank und sich erst nach vollständigem Substratverbrauch wieder änderte, was auch der Abgassensor darstellen konnte. Für die Abwasseranalytik als Beispiel oder die Nutzung von strikt aeroben Mikroorganismen hingegen ist dieser Sensor mit Sicherheit eine große Bereicherung, da man mit ihm einen genauen Verlauf des sich in der Flüssigkeit befindlichen Sauerstoffs messen und durch aktive Begasung auch kontrollieren kann, wozu der Abgassensor hingegen nicht die Möglichkeit hat. Die vorhandenen Probleme mit den Messverstärkern wären über eine Nutzung der passenden Messverstärker oder gleich durch die Nutzung von Sensoren lösbar, welche direkt über eine digitale Übertragung der Signale an den Multiplexer verfügen, wodurch eine Nutzung der Messverstärker überflüssig würde.

Zu den durchgeführten Fermentationen und vor allem denen der Prozessoptimierung ist hinzuzufügen, dass eine exakte Berechnung der Ausbeute- und Umsatzkoeffizienten aufgrund von fehlenden Parametern nicht möglich war. So war es mir bei allen Fermentationen nur möglich eine erhöhte Produktbildung zu interpretieren, was wissenschaftlich gesehen, kein konkreter Beweis für diese Vermutung ist. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wäre es nötig gewesen, zusätzlich zu den durchgeführten Versuchen, die Wachstumsraten und vor allem die Substratkonzentrationen zu messen. Diese hätte man in Bezug mit der CO₂-Produktion setzen müssen, um einen eindeutigen Beweis für die Steigerung der Fermentationsprodukte, durch die von mir durchgeführte mögliche Prozessoptimierung zu erhalten.

Da diese Versuche nicht durchgeführt wurden, konnte dieser Aspekt leider nicht mehr in die Auswertung einbezogen werden. Eine Beispielrechnung nur mit Literaturwerten hingegen wäre in Bezug auf die von mir durchgeführten Versuchsbedingungen jedoch nicht plausibel, da in der Literatur ([1] Haas & Pförtner, 2008) die Umgebungsbedingungen in denen der Prozess ablief (Medienzusammensetzung, Temperatur Füllvolumen, Glucosekonzentration, Wachstumsraten, Hefearten etc.) nicht mit den von mir durchgeführten Versuchen zu vergleichen sind, ist dies nach den Messungen nicht mehr durchführbar.

Eine exakte Berechnung des Umsatzkoeffizienten mit Hilfe der Gärungs- und Atmungsgleichung wäre theoretisch denkbar, jedoch gehen Atmung und Gärung während der Fermentation von Hefen ineinander über und ein exakter Wert, kann nur mit Hilfe einer Konzentrationsbestimmung z.B. mit einem Glucoseassay erzielt werden. Abgesehen davon würde dann immer noch die spezifische Wachstumsrate fehlen um einen richtigen Zusammenhang zur Produktsteigerung herzustellen. Diese Parameter sind jedoch bei dieser Versuchsreihe nicht vorhanden gewesen und konnten daher leider nicht errechnet werden.

7.2 Ausblick

In der nächsten Versuchsreihe sollten auf jeden Fall auch die Wachstumsraten und Glucosekonzentrationen gemessen werden, wodurch in Zusammenhang mit den anderen Messdaten der Fermentationen ein kompletter Überblick über alle Zusammenhänge geschaffen werden kann und man die in dieser Versuchsreihe erhaltenen Vermutungen durch weitere Versuche verifizieren kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das neue System theoretisch betriebsbereit ist, allerdings noch einiger kleinerer Verbesserungen nötig sind um es zu perfektionieren. So ist es Beispielsweise wichtig die Glasgeräte zu sichern, so dass weitere Beschädigungen vermieden werden können. Man sollte eventuell auch nochmals die Befestigungen für die Sensoren überdenken. Weiterhin wäre es gut die Schüttelkolben mit weiteren Zugängen zu versehen um z.B. eine Begasung oder Probenentnahme oder Zufuhr von Lösungen zu ermöglichen, ohne einen der Sensoren dafür entfernen zu müssen. Wie es in dieser Versuchsreihe der Fall war (vgl. Prozessoptimierung)

Die fedbatch-Fermentation hätte Rückblickend besser durchdacht werden müssen um ein optimales Ergebnis zu erzielen. So hätte man beispielsweise besser eine niedrig dosierte Zuckerlösung im Startfüllvolumen wählen können um dann im Anschluss mit einer hochkonzentrierten Zuckelösung zufüttern können. Die Fütterung hätte dann auch geregelt weiterlaufen müssen um eine noch höhere Produktionsrate con CO₂ erzielen zu können.

8 Danksagung

Ich möchte mich zunächst recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Frank Eiden für die tolle Betreuung bei diesem Projekt bedanken, er hat mir erst die Möglichkeit gegeben daran teilzunehmen und stand mir während der ganzen Zeit immer mit Rat und Tat zur Verfügung. Selbst wenn mal etwas nicht so lief wie erhofft, konnte ich immer auf seine Hilfe hoffen und hatte mit ihm immer einen souveränen Ansprechpartner für Planung, Durchführung und Problemstellungen bei allen Tätigkeiten die im Rahmen dieses Projektes von mir durchgeführt wurden. Des Weiteren möchte ich in gleichen Zügen auch bei Herrn Dr. Holger Müller von der Firma BlueSens gas Sensor GmbH bedanken, welcher mir ebenfalls bei allen Fragen bezüglich der Prozesse, der Auswertung aber auch der Bedienung der Geräte immer mit einer passenden Antwort oder Ratschlägen weitergeholfen hat. Des Weiteren bedanke ich mich bei ihm und der gesamten Firma Blue Sens gas Sensor GmbH für die freundliche Aufnahme in ihr Team, und natürlich für die Bereitstellung aller Geräte und Materialien, welche für dieses Projekt benötigt wurden. Zuletzt möchte ich mich noch bei Frau Marion Preising bedanken, welche mir bei Fragestellungen im Labor was die Bedienung einiger Geräte oder aber auch grundsätzliches zu Durchführungen angeht, stets weitergeholfen.

9 Literaturverzeichnis

Literatur:

- [1] Praxis der Bioprozesstechnik, Volker C. Haas & Ralf Pförtner, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2008
- [2] Allgemeine Mikrobiologie, Fuchs Georg, 8. Auflage, Thieme, 2007
- [3] Bioprozesstechnik, Horst Chmiel, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2006
- [4] Molekulare Biotechnologie Grundlagen und Anwendungen, David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [5] Biotechnologie für Einsteiger, Reinhard Renneberg, 2. Auflage, Elsevier, 2007
- [6] Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, Rolf D. Schmid, 2. Auflage, Wiley-VCH, 2006
- [7] Mathematik im Labor: ein Arbeitsbuch für Molekularbiologie und Biotechnologie, Frank H. Stephenson, 1. Auflage, Elsevier, Spektrum, Akademischer Verlag, 2005
- [8] Molekulare Biotechnologie Konzepte und Methoden, Michael Wink, Wiley-VCH, 2004
- [9] Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie Grundlagen, Methoden, Verfahren und Anwendungen, Andreas Leuchtenberger, Teubner, 1998
- [10] *Ulrike Maier, Mario Losen, Jochen Büchs*, Advances in understanding and modeling the gas–liquid mass transfer in shake flasks, Biochemical Engineering Journal 17 (2004) 155–167
- [11] *M. Canzoneri, R. Krueger, Th. Schnitzler, H. Rechmann, W. Zang, R. Fischer, M. Biselli*, Development of a RQ-controlled Fed-Batch strategy for cell cultures
- [12] *Anderlei, T., Büchs, J.*, Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks, Biochemical Engineering Journal 3478 (2000) 1–6
- [13] *Anderlei, T., Büchs, J.*, Online Ermittlung der Sauerstofftransferrate von Mikrobiellen Kulturen im Schüttelkolben, BIOforum 4/99
- [14] *Tibor Anderlei, Werner Zang, Manfred Papaspyrou, Jochen Büchs*, Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks, Biochemical Engineering Journal 17 (2004) 187–194
- [15] *Eva-Maria Materne, Julia Glazyrina, Stefan Junne, Peter Neubauer*, Application of the sodium sulfite method for monitoring the oxygen transfer in shake flasks with the wireless sensor system SENBIT®, Laboratory of Bioprocess Engineering, Institute of Biotechnology, Technische Universität Berlin 2010
- [16] R. Blaich: Kleine Einführung in Mess- und Analysenverfahren, Uni Hohenheim
- [17] Dr. Gudrun Nagl, FH Mikrobiologie und Hygiene, FH Wieselburg
- [18] Praktikumsskript, Interdisziplinäres Praktikum, Kontinuierliche Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae*, RWTH Aachen WS 2008
- [19] Betriebsanleitung der Sauerstoffsensoren Mettler Toledo InPro6800
- [20] Laborpraxisbericht von Alex Bottke & Eduard Schmidt, SS 2011 FH Recklinghausen
B.Sc. Molekular Biologie

[21] Laborpraxisbericht von Robert Weingarten & Stefan Otto, SS 2011 FH Recklinghausen
B.Sc. Molekular Biologie

[22] Vorlesungsskript, Industrielle Biotechnologie, Frank Eiden, WS 2010/2011

[23] Wikipedia-Eintrag: „Glaselektrode“

SOPs der Firma Blue Sens gas Sensor GmbH und der AG BioProzessTechnik:

http://www.apz-rl.de/002_download/index_bluelab_down.htm

[24] SOP_001_kLa

[25] 001_Auswertung

[26] 002_Dateilexport

[27] 016_Kalkulationshilfen_OTR/CTR/RQ

[28] SOP_002_Messen

[29] 003_Bedienung_CO2

[30] 005_Bedienung_O2

[31] 007_Bedienung_FermVis

[32] SOP_003_Komplexmedium_001

[33] SOP_017_Fermentation_Schüttelkolben

[34] SOP_020_Praktikum_Schüttelkolben