Fachhochschule Gelsenkirchen

in Kooperation mit:

BlueSens gas sensor GmbH

HAMILTON

BIO PROZESSTECHNIK

Thema:

Optimierung eines biotechnologischen Prozesses mit Hilfe verschiedener Prozessfahrweisen am Beispiel der fermentativen Gewinnung von Industriechemikalien durch Mikroorganismen unter Benutzung einer integrierten Mess- und Regeltechnik

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des Grades

Bachelor of Science

Studiengang Molekulare Biologie

Fachbereich Physikalische Technik

Fachhochschule Gelsenkirchen

vorgelegt von David Bittner

aus Recklinghausen

Recklinghausen 2012

Diese Arbeit wurde durchgeführt an der
Fachhochschule Gelsenkirchen, Standort Recklinghausen
Fachbereich Physikalische Technik

Betreuer:
1. Gutachter: Prof. Dr. Ing. Frank Eiden
2. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Loidl-Stahlhofen

Fachhochschule Gelsenkirchen
Fachbereich Physikalische Technik
Abteilung Molekulare Biologie
August-Schmidt-Ring 10
45665 Recklinghausen

Erklärung zur Bachelorarbeit:

Name: David Bittner
Matrikelnr.: 200825285
Fachhochule Gelsenkirchen, Abteilung Recklinghausen
Fachbereich Physikalische Technik (RE)

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Bachelorarbeit:
„Optimierung eines biotechnologischen Prozesses mit Hilfe verschiedener Prozessfahrweisen am Beispiel der fermentativen Gewinnung von Industriechemikalien durch Mikroorganismen unter Benutzung einer integrierten Mess- und Regeltechnik“ von mir selbstständig verfasst und nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt wurde. Ich versichere, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt zu haben, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet zu haben.

Datum, Unterschrift

_____

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen Bedanken, die mich während meiner Studienzeit und der Phase der Bachelorarbeit an der Fachhochschule Gelsenkirchen unterstützt haben.
Mein besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. -Ing. Frank Eiden, welcher mich jederzeit während meiner Bachelorarbeit und der vorangegangenen Praxisphase begleitet und unterstützt hat. Durch ihn wurde es mir ermöglicht an diesem Projekt teilzuhaben, wodurch ich mich während des ganzen Zeitraumes gut aufgehoben und betreut fühlte.

Mein weiterer außerordentlicher Dank richtet sich an Herrn Dr. Holger Müller von der Blue Sens Gas Sensor GmbH Herten. Er und seine Firma haben mir alle nötigen Geräte und Materialien zur Durchführung meiner Versuche bereitgestellt und mich bei technischen Fragen, als auch bei Problemstellungen zur Durchführung meiner Arbeit immer sehr gut beraten. Desweiteren wurde ich sehr herzlich in das Team der Firma integriert und konnte die Erfahrung machen viele nette Menschen kennenzulernen, welche mir bezüglich technischer Unterstützung, immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Angelika Loidl-Stahlhofen, welche sich dazu bereit erklärt hat, das Amt des zweiten Gutachters zu übernehmen.

Ich bedanke mich ebenfalls besonders bei Herrn Volker Donath, von der Firma Hamilton Bonaduz AG, für die Bereitstellung der gesamten Inline-Messtechnik, der Hilfsbereitschaft bei Fragen und dem netten Kontakt.

Ich bedanke mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr.-Ing Lars M. Blank (RWTH Aachen, Institut für angewandte Mikrobiologie) für die Bereitstellung seiner Diplomarbeit, sowie für die von ihm konstruierten rekombinanten Bakterienstämme, als auch für die in Auftrag gegebene HPLC-Analytik meiner Proben.

Nicht zuletzt gilt mein außerordentlicher Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Rudolf und Ursula Bittner, welche mein ganzes Leben für mich da waren und mich bei all meinen Vorhaben und Projekten, stets und ohne Zweifel an meine Fähigkeiten, unterstützt haben. Bei ihnen finde ich immer einen sozialen Rückhalt und bin froh, dass es sie gibt. Dieser Dank richtet sich letztlich ebenfalls an meine Lebensgefährtin Silke Wiedemann, welche mich von dem Tag an dem wir uns kennenlernten, in jeder Lebenslage mit vollstem Verständnis unterstützt und an mich geglaubt hat.

Inhalt

Abstract 6

1. Einleitung & Ziel der Arbeit 7
   1.1 Einleitung 7
   1.2 Zielsetzung und Struktur der Arbeit 8

2. Theoretischer Hintergrund & Stand des Wissens 8
   2.1 Organismen 8
   2.2 Reaktor 11
   2.3 Analytik 12
      2.3.1 Abgasanalytik der Blue Sens Gas Sensor GmbH 12
      2.3.2 Inline-Messtechnik der Firma Hamilton Bonaduz AG 13
      2.3.3 Glucose und Ethanolbestimmung mittels enzymatischer Test-Kits 19
      2.3.4 HPLC Analytik 21
      2.3.5 Regeltechnik 23

3. Material & Methoden 24
   3.1 Geräte 24
   3.2 Chemikalien & Medien 24
   3.3 Kulturbedingungen 26
   3.4 Methoden und Prozessstrategien 27
      3.4.1 Charakterisierung der Stoffübergänge im Reaktor mittels Natriumsulfitmethode 27
      3.4.2 Charakterisierung der Gelöst-Sauerstoff-Sensoren optisch vs. amperometrisch 29
      3.4.3 Stammhaltung und Langzeitkonservierung 29
      3.4.4 Batch Fermentation 30
      3.4.5 Fedbatch Fermentation 31
   3.5 Versuchsaufbau Abbildungen 32

4. Experimentalteil: Durchführungen, Ergebnisse & Diskussion 33
   4.1 Natriumsulfitmethode 33
      4.1.1 Durchführung 33
      4.1.2 Ergebnisse & Diskussion 34
   4.2 Charakterisierung der Gelöst-Sauerstoffsensoren optisch vs. amperometrisch 35
      4.2.1 Durchführung 35
      4.2.2 Ergebnisse & Diskussion 36

4.3 Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* 38
4.3.1 Batch Fermentation 38
4.3.1.1 Durchführung 38
4.3.1.2 Ergebnisse & Diskussion 39
4.3.2 Fedbatch Fermentation 44
4.3.2.1 Durchführung 44
4.3.2.2 Ergebnisse & Diskussion 45
4.4 Fermentation rekombinanter *E.coli* Bakterien 53
4.4.1 Wachstumskurven in LB Medium zur Charakterisierung der optimalen Vorkultivierung 54
4.4.1.1 Durchführung 54
4.4.1.2 Ergebnisse & Diskussion 54
4.4.2 Batch Ansatz im Glasfermenter 55
4.4.2.1 Durchführung 55
4.4.2.2 Ergebnisse & Diskussion 55
4.4.3 Batch Ansatz im gerührten Schüttelkolben 61
4.4.3.1 Durchführung 61
4.4.3.2 Ergebnisse & Diskussion 62
4.4.4 Batch Ansatz im Schüttelkolben 64
4.4.4.1 Durchführung 64
4.4.4.2 Ergebnisse & Diskussion 64
4.5 Ergebnisse der HPLC Auswertung aller Fermentationen mit *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4 66
4.5.1 Ergebnisse & Diskussion 66
5. Zusammenfassung, Ausblick & Fehlerbetrachtung 67
5.1 Zusammenfassung 67
5.2 Ausblick 69
5.3 Fehlerbetrachtung 70
6. Literaturverzeichnis 73
7. Abkürzungsverzeichnis 75
8. Abbildungs und Tabellenverzeichnis 76
8.1 Abbildungen 76
8.2 Tabellen 77

Abstract

In this research project a biotechnological cultivation and process-optimization with two different microorganisms, with an integrated measuring and controlling system is shown. The aim of this work includes the laboratory work with well known microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and recombinant *Escherichia coli* bacterial strains *E.coli* BL21(ΛD3) pLB4: 1659 BW25113 & 1661 nvOG to produce vast amounts of their metabolic products ethanol and acetone used in the chemical-industry with the aid of a process optimisation. The laboratory work was done in a small-size lab-reactor to cultivate the organisms. After installing the system and studying the best growth conditions, a process optimization was tried out to increase the level of metabolic products. This optimization included the controlling and regulation of pH and substrate-flow to optimize the conditions of the cultivation. Under the utilization of fedbatch fermentations, the yield of ethanol produced by *Saccharomyces cerevisiae* was increased on the fourfold one compared to batch fermentations. Fermentations with recombinant *E.coli* strains were unfortunately less successful. During this project the cultivation of the recombinant *E.coli* strains worked out, but the production of their metabolic product (acetone) could not be increased in comparison to the results of Blank [4]. The control of the process was done with gas-sensors and computer software build by “Blue Sens Gas Sensor GmbH” and “Hamilton Bonaduz AG”. Analytics were done with coupled enzymatic test-kits, photometrical analysis and “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC).

1. Einleitung & Ziel der Arbeit

1.1 Einleitung

Die Biotechnologie bzw. Bioprozesstechnik bedient sich der fermentativen Anzucht und Nutzung von Mikroorganismen, zur Gewinnung von Stoffwechselprodukten. Diese Organismen stellen während ihres Wachstums Stoffwechselprodukte aus Substraten für eine Vielzahl von unterschiedlichen Verwendungszwecken her. Unter diesen Produkten findet man unter anderem Industriechemikalien wie z.B. Aceton, Butanol & Ethanol (ABE). Da die biologische Synthese (z.B. Vitamin B2) der chemischen überlegen sein kann [6], wird heutzutage in biotechnologische Prozesse investiert, beispielsweise in nachwachsende Rohstoffe mit Biokatalysatoren [5 & 18]. Daher ist die Forschung und Entwicklung im Bereich der Biotechnologie heutzutage geradezu unerlässlich geworden.

Fermentationsprozesse werden in Bioreaktoren durchgeführt. Diese gibt es in den unterschiedlichsten Variationen, Größen und Arbeitsweisen. In der Industrie werden Bioreaktoren im großen Maßstab (mit mehreren m^3 Füllvolumen) genutzt, um große Mengen der gewünschten Metabolite zu produzieren [5 & 7].

Die Entwicklung neuer Methoden und Fermentationsprozessen läuft im kleineren Maßstab im Forschungslabor ab. Dabei bedient man sich üblicherweise an Laborreaktoren (bis zu einem Volumen von 10 Litern Füllung). Hierbei handelt es sich häufig um Glasgefäße, die die Möglichkeit einer Temperierung des Nährmediums für eine optimale Kultivierung bieten. In diesen Gefäßen befinden sich entweder spezielle Rührwerke, welche eine optimale Sauerstoffversorgung und Durchmischung des Mediums gewährleisten [7].

Für die Entwicklung neuer Methoden werden Modellorganismen genutzt, über die in der Regel viele (metabolische) Daten vorliegen. Mit Hilfe dieses Wissens sind sie optimal für Versuchszwecke, für die Erprobung neuer Prozesse und Methoden, im Rahmen der Prozessoptimierung geeignet [6 & 7].

1.2 Zielsetzung und Struktur der Arbeit

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, Prozessstrategien für die Optimierung eines Prozesses, zur Kultivierung von Mikroorganismen in einem stationären Laborreaktor zu entwickeln. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Modellorganismen gewählt, deren Metaboliten Industriechemikalien darstellen und während der fermentativen Kultivierung erzeugt werden sollen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* genutzt, welcher Ethanol aus Glucose als Substrat produziert [7]. Im zweiten Teil kam ein rekombinanter *E.Coli* Stamm zur Produktion von Aceton zum Einsatz.
[3 & 4]
Der Aufbau der experimentellen Arbeit gliedert sich in folgende Schritte. Zunächst wurden die Geräte unter Ermittlung der Stoffübergangsgrößen charakterisiert, um eine solide Grundlage für die Wahl der besten Bedingungen und die optimale Nutzung aller Geräte zu legen. Im nächsten Arbeitspaket wird das Verhalten der Organismen mittels Batch-Fermentations-Ansätzen beobachtet und die Nutzung einer bestmöglichen Kultivierung erprobt. Mit Hilfe der gewonnenen Daten konnte nun eine Strategie entwickelt werden, welche für eine bestmögliche Kultivierung und daraus folgend eine Steigerung der Produktausbeute sorgt. Dazu wurde das Zulauf-Satz Verfahren (Fedbatch) genutzt, bei dem einem Organismus zusätzliches Substrat zugeführt wird, um einer damit in Verbindung stehenden Limitierung entgegenzuwirken.

2. Theoretischer Hintergrund & Stand des Wissens

2.1 Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Modellorganismen zur Produktion der Industriechemikalien Ethanol und Aceton verwendet.

Saccharomyces cerevisiae

Der Organismus *Saccharomyces cerevisiae,* auch bekannt als Wein- und Backhefe ist ein Pilz, welcher eukaryontischer Natur ist und zu der Gattung der Sprosspilze (Ascomyceten) gehört.

S. cerevisiae erzeugt unter hohen Zuckeranteilen im Nährmedium Ethanol und CO_2 unter alkoholischer Gärung und wird daher neben dem Einsatz beim Backen, zur Alkoholherstellung in der Getränkeindustrie verwendet. Hefe gilt als ein sehr beliebter Modellorganismus in der angewandten biologischen Forschung, da sein komplettes Genom (13 Millionen Basenpaare und 6.275 Gene) entschlüsselt und sein Stoffwechsel bereits erforscht ist. [7, 6, 18]

Hefen sind fakultativ anaerobe Organismen, d.h. sie setzen ihr Substrat aerob durch Atmung und anaerob durch alkoholische Gärung um. Bei hohem Anteil von Glucose im Nährmedium entsteht das Phänomen des Crabtree-Effektes. Dabei verwertet *S. cerevisiae* den überschüssigen Zucker nicht nur für das eigene Wachstum, sondern nutzt einen anaeroben Metabolismus unter aeroben Bedingungen zur Produktion von Ethanol und CO_2 [7].

Hefen gibt es in vielen verschiedenen Variationen, sowohl in der Form von gepressten Hefewürfeln, als auch gefriergetrocknet. Für spezielle Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. der gezielten Ethanolproduktion für die Getränkeherstellung, existieren optimierte Organismen, welche bspw. zu einer Produktion hoher Ethanolkonzentrationen oder Biomassen in der Lage sind [6 & 18]. In dieser Versuchsreihe wurden ausschließlich käuflich erhältliche Trockenhefen verwendet. Hefen in Würfelform hingegen nicht, da diese im Gegensatz zu Trockenhefen keine reproduzierbaren Massen darstellen.

***Escherichia coli* Bakterien**

Escherichia coli ist ein Bakterium. Dieses gehört der Gattung der Prokaryonten an und dabei zur Familie der Enterobacteriaceae. *E.coli* ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges, Oxidase-negatives und peritrich begeißeltes Bakterium, das in der Natur in der Darmflora vorkommt.
Dieses Bakterium ist eines der genetisch und molekularbiologisch am meisten erforschten Mikroorganismen [7]. Sein gesamtes Genom (Größe 4,6 kBp, 4288 Strukturgene) [6] wurde bereits entschlüsselt und sequenziert. Die molekularbiologische Forschung bedient sich vieler unterschiedlicher und modifizierter *E.coli* Stämme für die Expression rekombinanter Proteinsynthesen. [7]

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Stamm, handelt es sich um eine genetisch veränderte Variante von BL21(ΛD3).
In diesen wurde mit Hilfe genetischer Klonierungs-Strategien, ein für die Acetonproduktion verantwortliches synthetisches Aceton Operon (ace4) eingefügt. Dieses besteht aus, den für die Acetonproduktion verantwortlichen, Gensequenzen (adc, ctfAB & thl) vier unterschiedlicher *Clostridium acetobutylicum* Stämmen.
[3 & 4]

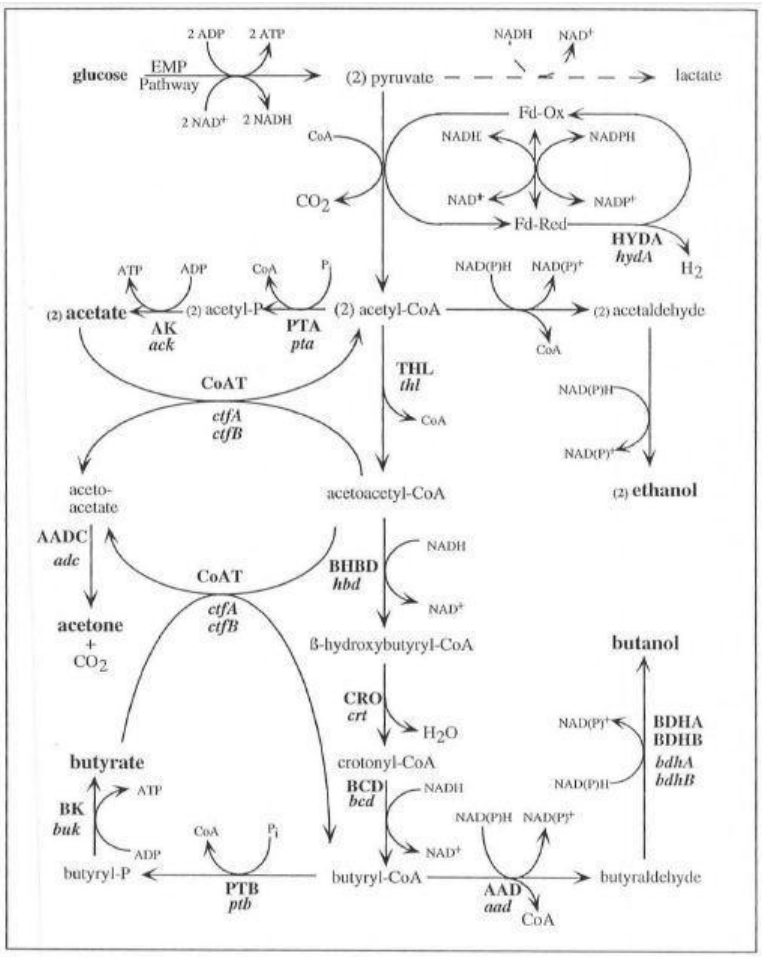


Abbildung 1: Stoffwechselweg von *C.acetobutylicum*

Diese Gensequenzen sind verantwortlich für die Synthese der Enzyme Acetoacetat decarboxylase, Coenzym A Transferase und Thiolase, welche im Stoffwechsel von *C. acetobutylicum* für die Umsetzung von Glucose zu Aceton führen [3]. Aufgrund dieser Fähigkeiten ist *C. acetobutylicum* in seiner Wildtypen Form dazu in der Lage Aceton, Butanol und Ethanol aus Glucose als Substrat, in einem Verhältnis von 3:6:1 zu synthetisieren. Jedoch ist die Ausbeute der fermentativen Produktion dieser Chemikalien, im Gegensatz zu den klassischen Produktionsmethoden der Petrochemie zu gering, um eine ökonomisch rentable Produktion zu erzielen [3]. Der Fähigkeit der Produktion dieser Metabolite durch *C. acetobutylicum* hat man sich bedient, um die für die gezielte Acetonproduktion verantwortlichen Gensequenzen in einen *E.coli* Stamm molekularbiologisch einzufügen. Damit entstand ein rekombinanter Stamm, welcher in der Lage ist, Aceton in größeren Mengen zu produzieren [3&4].

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen handelt es sich um die Typen *E.coli* BL21(ΛD3) pLB4: 1659 *E.coli* BW 25113 pLB4 & 1661 *E.coli* nvOGpLB4, welche von Prof. Dr. –Ing Lars M. Blank von der RWTH Aachen (Institut für angewandte Mikrobiologie) konstruiert wurden [4].

2.2 Reaktor

Bei dem in dieser Arbeit genutzten Reaktor (Abb. 1), handelt es sich um ein doppelwandiges, sonderangefertigtes Glasgefäß, mit diversen Anschluss-Möglichkeiten für Mess- und Regeltechnik zur Prozess-Überwachung und -Kontrolle.
Es besteht aus einem inneren Glasgefäß mit einem Fassungsvermögen von 3190 ml. [23]

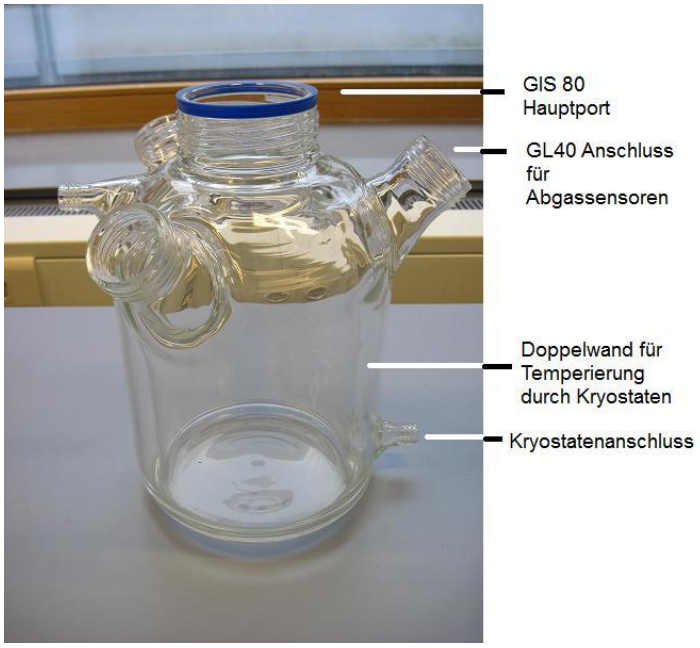


Abbildung 2: Glasfermenter

Dieses Gefäß ist mit einer weiteren Schicht aus Glas ummantelt, in der sich ein Zwischenraum befindet. Durch diesen Zwischenraum kann mit Hilfe eines Kryostaten, erhitztes Wasser durch den Hohlmantel gepumpt werden, wodurch eine beliebige Temperierung des inneren Reaktorgefäßes und somit des Nährmediums, ermöglicht wird.
Der Glasfermenter wird auf einer Magnetrührplatte positioniert und betrieben. Im Reaktor befindet sich ein Magnetrührfisch, welcher in beliebiger Rotationsgeschwindigkeit bewegt wird, um eine Durchmischung der Flüssigkeit zu gewährleisten. Der Reaktor bietet drei Schraubanschlüsse, an die Abgassensoren angeschlossen werden können. Desweiteren bietet die Verschlusskappe des Hauptports die Möglichkeit, weitere Sensoren sowie Probenentnahme, Begasung, Druckausgleich oder Pumpschläuche anzuschließen. [23]

2.3 Analytik

Die Analytik dieses Projektes setzt sich aus drei verschiedenen Abgassensoren der Firma „Blue Sens Gas Sensor GmbH“, inline Messtechnik für pH- und Gelöst-Sauerstoff-Messung der Firma „Hamilton Bonaduz AG“, enzymatische Test-Kits der Firma „Roche“, sowie einer extern durchgeführten HPLC Analytik zusammen.

2.3.1 Abgasanalytik der Blue Sens Gas Sensor GmbH

Die Firma Blue Sens Gas Sensor GmbH hat unterschiedliche Abgassensoren in ihrem Produktsortiment, welche eigens in ihrem Firmensitz in Herten entwickelt und gebaut werden. Mit Hilfe dieser Messtechnik ist es möglich, Abgaswerte in einem Reaktionsprozess online zu verfolgen. Das bringt den Vorteil einen Prozess zu beobachten, aus den daraus erhaltenen Daten eine Prozesstrategie zu entwickeln oder auch direkten Einfluss auf diesen nehmen zu können. Die in dieser Arbeit verwendeten Abgassensoren, sowie ein Großteil des Laborequipments wurde großzügigerweise von der Firma Blue Sens für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

Messprinzipien der verwendeten Abgassensoren:

elektrochemischer Sauerstoffsensor

Der elektrochemische-Sauerstoff-Abgassensor arbeitet nach dem Prinzip einer galvanischen Zelle. Das Sauerstoff-sensitive Element des Sensors besteht aus einer Bleibatterie, welche aus einer Bleianode, einer Sauerstoffkathode aus Gold und einem schwachen Elektrolyten besteht. Sauerstoffmoleküle gelangen bei der Messung durch eine nicht poröse fluorierte Membran in die elektrochemische Zelle, diffundieren durch den Elektrolyten und werden an der Goldelektrode reduziert. [30]

CO_2 & CH Sensor

Die Kohlenstoffdioxid- und Kohlenwasserstoff-Sensoren arbeiten mit dem Messprinzip der Infrarotspektroskopie. Gemessen wird die Abschwächung der Lichtintensität im Absorptions-spektrum von CO_2 oder Kohlenwasserstoffen.

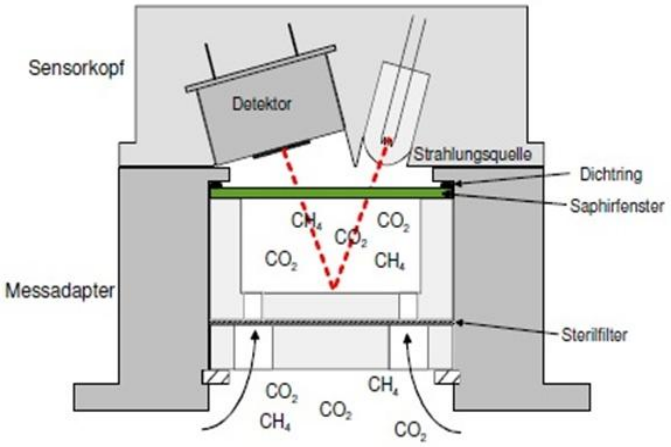


Abbildung 3 : Messprinzip der CO_2- & CH- Sensoren

Der Lichtstrahl wird vom Messadapter reflektiert und die Abschwächung der Lichtintensität des Analytgases vom Detektor gemessen (Abb. 3). Durch eine lichtdurchlässige Scheibe wird ein austreten der Probenatmosphäre nach außen verhindert, was einem Verschmutzen der optischen Bauteile entgegenwirkt. Durch die Beheizung des Messadapters über den Sensorkopf, wird ein auskondensieren der Feuchtigkeit vermieden. Durch einen Interferenzfilter wird der Sensor auf das zu messende Gas abgestimmt. Der Durchlassbereich des Filters ist dabei so zu wählen, dass sich eine gute Übereinstimmung mit der Absorptionsbande des Messgases ergibt. Dafür sind Mittelwellenlänge und Halbwertsbreite entsprechend zu wählen. [9,28,29]

2.3.2 Inline-Messtechnik der Firma Hamilton Bonaduz AG

Die HAMILTON Bonaduz AG ist einer der führenden Hersteller von inline-Messtechnik und stellt neben vielen weiteren Produkten eine große Anzahl invasiver Messelektroden her. Mit dieser Messtechnik ist es ebenfalls möglich, den Reaktionsprozess online zu verfolgen. Invasive Elektroden messen den Zustand der Flüssigphase und bieten einen Einblick in das Reaktionsgeschehen innerhalb des Mediums. Dies bietet den klaren Vorteil auch Messparameter wie Gelöst-Sauerstoff oder den Verlauf des pH-Wertes zu beobachten und beeinflussen zu können. Die in diesem Projekt genutzten Sensoren wurden für Forschungs-zwecke von HAMILTON bereitgestellt und tragen einen wichtigen Teil der Umsetzung und Kontrolle aller durchgeführten Versuche bei.

Messprinzipien invasiver Sensoren

pH-Glaselektrode

Die pH-Glaselektrode misst die Wasserstoffionenaktivität in Lösung. Sie arbeitet nach dem Prinzip einer Einstabmesskette (Abb. 4) 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 wiederrum in einem Gelelektrolyten gebettet ist. Das innere Rohr enthält ebenfalls eine Silber-Silberchloridelektrode mit Gelelektrolyt und einem zusätzlichen Phosphatpuffer, welcher auf einem festen pH-Wert kalibriert ist. [10 &17] Die Verwendung eines Gelelektrolyten ermöglicht es, die Elektrode in einem Autoklaven zu sterilisieren, ohne dass die Elektrode einen Schaden davon trägt, wie es bei pH-Elektroden mit Flüssigelektrolyten der Fall ist.

Beide Elektroden sind mit der zu messenden Lösung verbunden, wobei das innere Rohr mit einer Glasmembran und die Referenzelektrode über ein Diaphragma aus poröser Keramik von der umgebenden Flüssigkeit getrennt sind. Wird die Messkette in eine zu messende Lösung eingetaucht, entsteht ein elektrisches Potential an der Glasmembran des inneren Rohres, welches dem Prinzip der Nernst-Gleichung folgt. Man erhält eine Elektrode, die sich in einer Probenlösung befindet und eine weitere Elektrode, die sich in der inneren Lösung mit bekanntem pH-Wert befindet, vereint in einem Sensor. Aus der Spannungsdifferenz dieser beiden Messungen ergibt sich nun der pH-Wert des Messgutes. [10 & 17]

Nernst Gleichung [10] :

$$E = E^\circ + \frac{RT}{z_e F} \ln \frac{a_{\mathrm{Ox}}}{a_{\mathrm{Red}}} \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Tabelle 1: Legende Nernst-Gleichung

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 $V^{-1}mol^{-1}$
a	Aktivität des betreffenden Redox-Partners

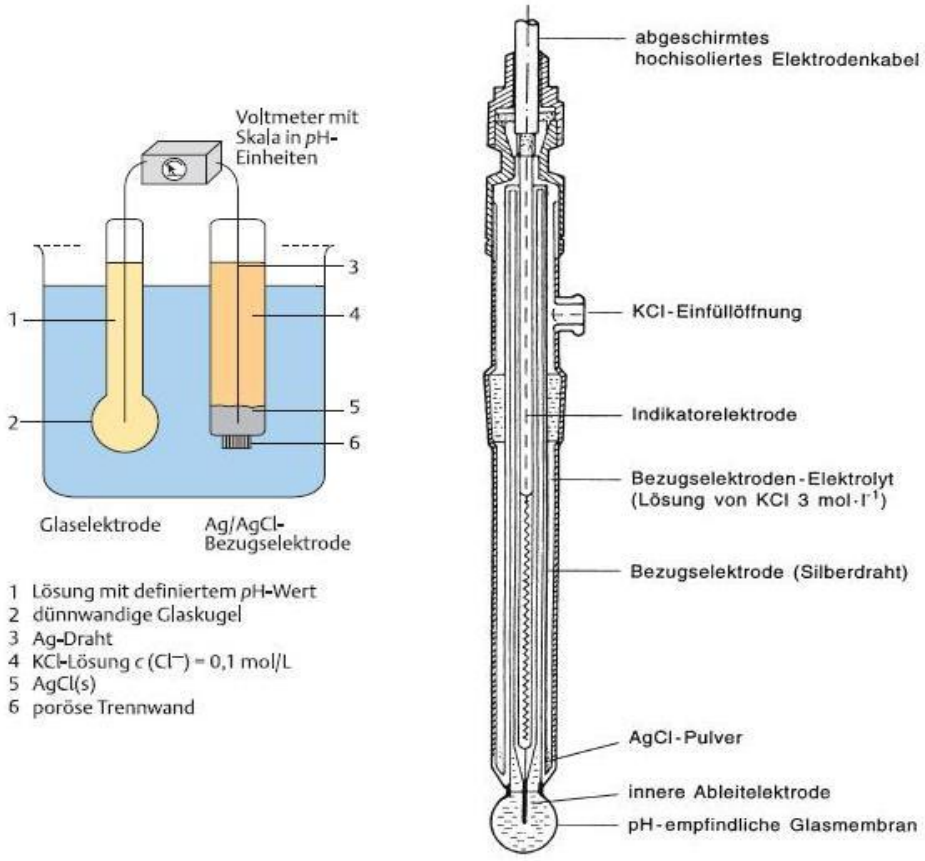


Abbildung 4: schematischer Aufbau von pH- Messkette und pH-Einstabmesskette in einer Glaselektrode [10 & 17]

optischer Gelöstsauerstoff-Sensor Visiferm™ DO [8]

Aufbau [8]:

Der Aufbau des Sensors besteht aus einer Isolationsschicht, dem Luminophor, einer Trägermembran, einer blauen LED und zwei identischen Photodioden, welche über einen Rotlicht- und einen Blaulichtfilter abgeschirmt sind (Abb.5).
Die Isolationsschicht vermeidet Interferenzen von außenstehenden Lichtquellen und ist in direktem Kontakt mit der zu messenden Flüssigkeit. Sie muss über eine gute Permeabilität gegenüber Sauerstoff verfügen und darf keine optische Transparenz besitzen. Aufgrund des Kontaktes zur Messflüssigkeit, muss sie zudem mechanisch und chemisch stabil sein und besteht daher meist aus schwarzem Silikon oder Polytetrafluoroethylen (PTFE).

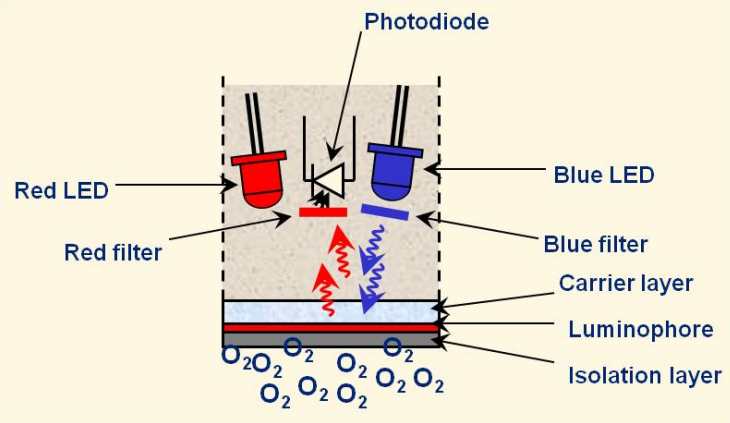
Das Luminophor verfügt über eine Sauerstoffsensitivität und ist durch sichtbares Licht anregbar und photostabil. Luminophore bestehen in der Regel aus Platin(II)- und Palladium(II)-komplexen oder aus Ruthenium(II)-komplexen. Durch die Einbettung des Luminophors in eine ionenpermeable Matrix werden Wechselwirkungen durch pH-Wert Änderung, Ionen-Spezifität und anderen Lösungen in der Probe vermieden. Dafür muss diese Matrix über Sauerstoffdurchlässigkeit, Transparenz, geringe Absorption und Lumineszenz, gute Flexibilität und Bindung an das Trägermaterial verfügen. Sie besteht meist aus Polystyrolen, Polysulfonen, Polyethersulfonen oder Polyvinylchlorid (PVC).

Die Trägermembran muss über optische Eigenschaften, wie z.B. Transparenz, wenig Absorption und wenig Lumineszenz verfügen. Sie besteht meist aus Polyester, Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas) oder Glas.

Im Gegensatz zu anderen Photomesszellen mit diesem Prinzip wird bei diesem Sensor nur eine blaue LED mit Rotlicht und Blaulichtfiltern vor den Photodioden eingesetzt, statt einer roten und einer blauen LED mit nur einer Photodiode. Der Sensor wird beim klassischen Aufbau mit Hilfe der roten LED kontinuierlich eingestellt. Vor jeder Messung wirft diese einen Lichtstahl bekannter Intensität auf das Luminophor, welcher von diesem reflektiert wird und sich durch das gesamte

optische System verbreitet. Änderungen des Systems können somit ohne Verzögerung erkannt werden. Drifts der Blauen LED sind hierbei jedoch nicht erkennbar. Bei der Visiferm™ DO wird hingegen nur eine Blaue LED und 2 identische Photodioden mit Rot- und Blaulichtfiltern genutzt. Die blaue Photodiode kontrolliert dabei eventuelle Drifts des Luminophors oder der LED. Die Möglichkeit unterschiedlichen Driftverhaltens der beiden Photodioden ist zu vernachlässigen.

Typische Photomesszelle:



Messzelle Visiferm™ DO:

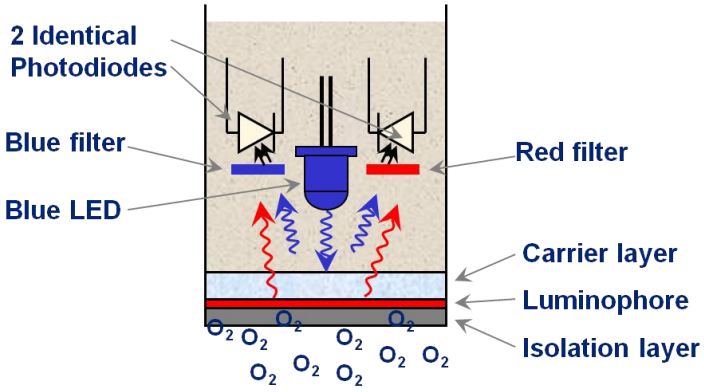


Abbildung 5 : Aufbau üblicher Photozellen gegenüber der des Sensors Visiferm™ DO

Messprinzip [8]:

Das Messprinzip der optischen Sauerstoffmesssonde Visiferm™ DO (HAMILTON) basiert auf einem Fluoreszenz-Messprinzip, dem sogenannten „dynamic luminescence quenching“(Abb. 6).

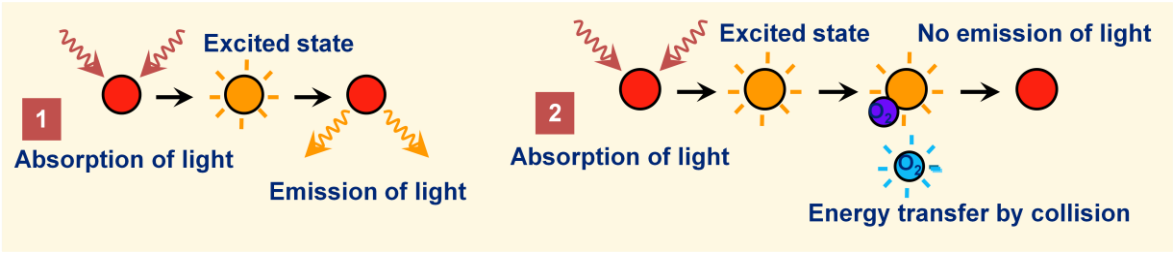


Abbildung 6 : dynamic luminescence quenching

(1) Ablauf des Fluoreszens Prozesses unter Abwesenheit von Sauerstoff:
Befindet sich kein Sauerstoff in der zu messenden Umgebung, fallen die angeregten Elektronen des Luminophors auf ihr Ursprungsniveau herab und strahlen dabei rotes Licht ab.
(2) Deaktivierung der angeregten Luminophor Elektronen durch Sauerstoff:
Ist nun Sauerstoff in der zu messenden Umgebung vorhanden, kommt es zu einer Kollision der angeregten Elektronen des Luminophors mit den Sauerstoffmolekülen, wodurch diesen Energie entzogen wird. Dadurch kommt es zu einer Abschwächung der abgestrahlten Lichtintensität.

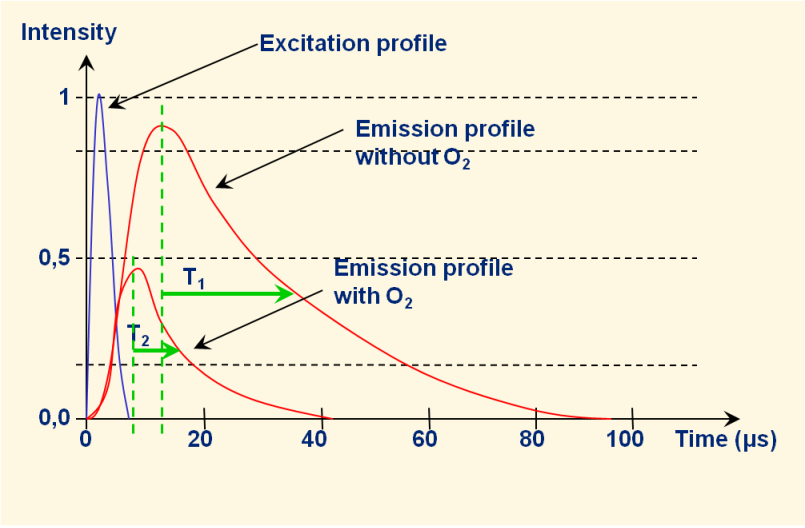


Abbildung 7: Intensitätskurve des angeregten blauen und des abstrahlenden roten Lichts

Im aktivierten Zustand gibt das Luminophor rotes Licht mit einer Intensität umgekehrt proportional zur Menge Sauerstoff in Wasser ab. Zusätzlich gibt es eine Zeitverzögerung zwischen dem Maximum des angeregten blauen und dem Maximum des abgestrahlten roten Lichts (Abb.7).

Die Spanne der Zeitverzögerung ist wiederum proportional zur Menge des sich im Messgut befindlichen Sauerstoffes. Diese Zeitverzögerung kann als Phasenwinkel zwischen den beiden Kurven des anregenden blauen und des abgegebenen roten Lichts bezeichnet werden. Die Visiferm™ DO-Sonde wird nicht von Farbe oder Trübung des Messgutes beeinflusst. Zudem verfügt die Sauerstoffsonde über ein integriertes Thermometer, welches eine Kontrolle der Temperatur im Medium ermöglicht und somit ein zusätzlich in den Reaktor eingeführtes Thermometer ersetzt.

2.3.3 Glucose und Ethanolbestimmung mittels enzymatischer Test-Kits

Der Substratverbrauch und die Bildung von Ethanol der Organismen wurden durch enzymatische Test-Kits ermittelt. Diese basieren auf dem Prinzip eines einfachen gekoppelten enzymatischen Tests, bei dem die durch eine Enzymreaktion gebildeten Produkte, photometrisch quantitativ bestimmt werden können.

Glucosenachweis [20]

Bei dem Glucosenachweis wird D-Glucose durch das Enzym Hexokinase (HK) und Adenosin-5‘-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5‘-diphosphat (ADP) phosphoryliert.

$$\text{D-Glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{G-6-P} + \text{ADP} \qquad \text{(Gl. 2)}$$

In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) wird G-6-P von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes NADH (NADPH).

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{D-Gluconat-6-phosphat} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \qquad \text{(Gl. 3)}$$

Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent. NADPH ist Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

Ethanolnachweis [19]

Ethanol wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert.

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \leftrightarrow \text{Acetaldehyd} + NADH + H+ \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Ethanol und NAD^+.

Durch alkalisches Milieu und Abfangen des gebildeten Acetaldehyds kann das Gleichgewicht auf die rechte Seite verschoben werden.

Acetaldehyd wird in Gegenwart von Aldehyd-Dehydrogenase (Al-DH) quantitativ zu Essigsäure oxidiert

$$\text{Acetaldehyd} + NAD^+ + H_2O \rightarrow \text{Essigsäure} + NADH + H^+ \qquad \text{(Gl. 5)}$$

NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm photometrisch zu bestimmen.

Berechnung der mittels der enzymatischer Test-Kits erhaltenen Werte:
Die Werte für die Glucosekonzentration sowie für die Ethanolkonzentration ergeben sich aus der Differenz der gemessenen Extinktionsdifferenzen (Gl. 6) von Leerwert und Probe (E2-E1) multipliziert mit der Berechnungsformel für die Konzentration (Gl. 7 oder Gl, 8).

Dabei wird die Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der der Probe subtrahiert:

$$\Delta E = (E2\text{-}E1)_{Probe} - (E2\text{-}E1)_{Leerwert} \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Berechnungsformel Glucose [19]:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \left[\frac{g}{l}\right] \qquad \text{(Gl. 7)}$$

Berechnungsformel Ethanol [18]:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta E \left[\frac{g}{l}\right] \qquad \text{(Gl. 8)}$$

Tabelle 2: Legende zur Berechnung der enzymatischen Test-Kits [18 & 19]

V = Testvolumen [ml]
v = Probenvolumen [ml]
MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]
d = Schichtdicke [cm]
ε = Extinktionskoeffizient von NADH & NADPH (bei 340 nm = 6,3 [l x $mmol^{-1}$ x cm^{-1}])

2.3.4 HPLC Analytik

Für die quantitative Bestimmung der gebildeten Produkte, sollte die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) oder auch Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie genutzt werden. Diese ist, unter Anwendung einer etablierten Methode, deutlich präziser als die meisten alternativen analytischen Nachweise. Die entnommenen Proben wurden für diesen Teil der Analytik aufbereitet und an der RWTH Aachen (Prof. Blank, Institut für Angewandte Mikrobiologie) analysiert. Die erhaltenden Daten konnten daraufhin zur Auswertung der Fermentationsversuche genutzt werden.

HPLC Prinzip [16]:

Das Prinzip einer Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie ist vergleichbar mit anderen chromatographischen Analysemethoden. Ein Teil der Probe wird von einem automatisch gesteuerten Modul, dem sogenannten Autosampler, mit einer Kanüle aufgenommen und in den Laufmittelfluss (laminarer Fluss) gespritzt. Das Laufmittel, in diesem Fall Acetonitril, stellt dabei die mobile Phase der Chromatographie dar. Dieses wird über ein Pumpsystem zu einer Trennsäule geführt und dort unter Druck durch die Säule gefördert. Die Säule beschreibt dabei die stationäre Phase, welche aus einem Feststoff besteht, z.B. chemisch modifiziertes Kieselgel bei „C_{18} –Säulen“, bei denen auf der Oberfläche C_{18}-Alkylketten angebracht sind, die mit dem Analyten wechselwirken.

Die Wahl der genutzten Säule hängt, je nach Trennverfahren, von der chemischen Beschaffenheit des Analyten ab. Die mobile Phase passiert nun die stationäre Phase und die zu analysierenden Stoffe binden an das Säulenmaterial. Da das Laufmittel jedoch weiterhin durch die Säule gepumpt wird, lösen sich die differierend stark gebundenen Komponenten zu unterschiedlichen Zeiten wieder von diesem ab, werden also wieder herunter gewaschen. Der Zeitpunkt des Ablösens von der Säule wird als Retentionszeit beschrieben und ist charakteristisch für eine chemische Verbindung. Danach werden die getrennten, herunter gewaschenen Verbindungen durch einen Detektor (vergleichbar mit einer Photozelle, aber auch unterschiedliche Detektorarten z.B. Fluoreszensdetektor möglich) geführt, wo sie einen Lichtstrahl passieren. Beim Durchgang der getrennten Komponente durch den Strahl, wird die Lichtintensität von diesem abgeschwächt. Diese Abschwächung wird nun durch den Detektor ermittelt, wodurch das zeitliche Ereignis und dessen Intensität gemessen werden. Somit entsteht ein Chromatogramm aller sich in der Probe detektierten chemischen Verbindungen, welches von der Software der Anlage graphisch dargestellt wird. In diesem Chromatogramm können die aufgetrennten, sich in der Probe befindlichen Stoffe, bestimmt und mit Hilfe eines Standards identifiziert und quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt durch die Berechnung der Fläche unter dem entstandenen Peak und wird mit der Fläche unter dem Peak eines Standards verglichen. Beim internen Standard handelt es sich um eine identische chemische Substanz (meist Derivate). Eine weitere Methode ist die des externen Standards. Hierbei wird eine Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu messenden Stoffes angefertigt. Die Chromatogramme der Standardreihe werden anschließend mit dem der Probe verglichen und es kann abgeschätzt werden, welche Menge der Substanz in der Probe vorhanden ist.

2.3.5 Regeltechnik

Die Regelung des pH-Wertes wird über ein pH-Mess- & Steuergerät der Firma Meredos gesteuert. Dieses ist mit einer pH-Glaselektrode und einer Pumpe verbunden, welche an den Reaktor angeschlossen ist. Die Elektrode misst den aktuellen pH-Wert und kann diesen bei Unterschreitung eines festeingestellten Wertes mit Hilfe einer Pumpe auf einem bestimmten Niveau halten. [14]

Abbildung 8: pH-Mess-& Steuergerät Meredos

Dazu wird 0,5 M NaOH in ein Vorlagebehältnis gefüllt und über einen Pumpschlauch mit dem Reaktionsgefäß verbunden. Somit ist eine Regulation des pH-Wertes über den gesamten Verlauf einer Fermentation gewährleistet und muss nicht manuell gesteuert werden. Eine weitere Pumpe dient dazu den Zulauf von Substrat in das Reaktionsgefäß zu steuern. Diese wird auf einen festen Zulaufstrom eingestellt und pumpt so, im Rahmen eines Fedbatch-Ansatzes, kontinuierlich Substrat in den Reaktor.

3. Material & Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 3: verwendete Geräte

Glasfermenter 3190 ml (siehe1.3.2)	Baccom Multiplexer (Blue Sens)	Sauerstoffabgassensor (Blue Sens)
CO_2 Abgassensor (Blue Sens)	CH Abgassensor (Blue Sens)	Pumpe (Abimed)
Pumpe (Periflo: flocon 1000)	pH- Mess- und Steuergerät (Meredos)	Kryostat (Lauda)
Photometer (Ultrospec 1100 pro)	Optische Gelöst-Sauerstoff Sonde (Hamilton)	temperierte Zentrifuge (Hettich Mikro 22R)
pH Glaselektrode (Hamilton)	diverse Kolbenhubpipetten (VWR, Eppendorf)	Magnetrührplatte Magnetic [e] Motion (2Lab)
Heizplatte (Labor-Brand)	Schüttler (Certomat R)	Heizhaube (Certomat H)
Autoklav (Systec V-65)	diverse Messzylinder	Clean-Bench (ZAPF)

3.2 Chemikalien & Medien

Medien:

Tabelle 4: Komplexmedium für Fermentationen von *Saccharomyces cerevisiae* [22]

Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Trypton	5 g
H_2O	1000 ml

Tabelle 5: Luria Bertani (LB) Komplexmedium für die Vorkultivierung von *Escherichia Coli* [24]

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
bidestiliertes H_2O	1000 ml
NaOH 10 molar	ca. 200 µl zur Einstellung des pH auf 7,0

SD-8 Komplexmedium für die fermentative Kultivierung rekombinanter *E.coli* Stämme

Das SD-8 Komplexmedium setzt sich aus sechs unterschiedlichen Komponenten zusammen, welche allesamt einzeln anzusetzen und entweder zu autoklavieren oder steril zu filtrieren sind und vor dem Ansatz in einer vorgeschriebenen Reihenfolge steril zusammenzuführen sind. [11, 13, 25]

Bestandteile und Zusammensetzung [11, 13, 25]:

Tabelle 6: 5-fach Basissalzlösung in 500 ml bidest. H_2O (autoklavieren):

NH_4Cl	17,5 g
KH_2PO_4	18,75 g
Na_2HPO_4	18,75 g
K_2SO_4	2,13 g

Tabelle 7: 1 M $MgSO_4$ * 7 H_2O in 100 ml H_2O (steril filtrieren):

$MgSO_4$ * 7 H_2O	12,037 g

Tabelle 8: Spurenelementlösung in 100 ml 5 M HCl (pH 7 ist einzustellen, steril filtrieren):

$FeSO_4$*H_2O	4 g
$MnSO_4$*H_2O	1 g
$Al_2(SO_4)_3$	2,8 g
CoCl*6 H_2O	0,4 g
$ZnSO_4$*7 H_2O	0,2 g
Na_2MoO_4* 2 H_2O	0,2 g
$CuCl_2$* 2 H_2O	0,1 g
H_3BO_4	0,05 g

10-fach (50g) Hefeextrakt-Lösung in 500 ml H_2O (autoklavieren):

20% (100g) Glucose-Lösung in 500 ml H_2O (autoklavieren):

Tabelle 9: SD-8 Medium (1 L) Zusammensetzung:

5-fach Basissalzlösung	200 ml
bidest. H_2O	597,8 ml
Glucose-Lösung	100 ml
Hefeextrakt-Lösung	100 ml
1 M $MgSO_4$ * 7 H_2O	1,4 ml
Spurenelemente-Lösung	0,8 ml

Tabelle 10: Weitere Chemikalien

Gekoppelte enzymatische Test-Kits für Glucose (Artikelnr.:10 716 251 035 Roche diagnostics) und Ethanolbestimmung (Artikelnr.: 10 176 290 035 Roche diagnostics)
0,85% NaCl Lösung
0,5 M NaOH Lösung
Na_2SO_3 (Natriumsulfit)
bidest. Wasser

Carbenicillin Stock Solution:

Einwaage 0,5 g in 10 ml bidest. Wasser entsprechen 50mg/ml

Sterilfiltration (0,2µm) in sterile 1,5 ml Eppendorfreagenzgefäße je 1 ml

Zwischenlagerung bei -20°C

3.3 Kulturbedingungen

Alle Fermentationen wurden im gasdicht verschlossenen Reaktor unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Eine vollständige anaerobe Prozessfahrweise konnte zum Startzeitpunkt der experimentellen Arbeit nicht realisiert werden. Dazu müsste dem Reaktor zuvor sämtlicher Sauerstoff entzogen werden (bspw. durch Spülen mit Stickstoff). Da der Sauerstoff im geschlossenen Reaktor jedoch nach kurzer Zeit von den Organismen verbraucht wird und durch den gasdichten Verschluss eine weitere Sauerstoffzufuhr unterbunden wird, laufen die Reaktionen unter nahezu anaeroben Bedingungen ab.

Der Reaktor wurde mit einer Menge von 1600 ml Nährmedium befüllt, um das Eintauchen der Inline-Messsonden gewährleisten zu können.

Die Rotationsgeschwindigkeit (rpm) des Magnetrührers orientiert sich in

Anlehnung an die Ergebnisse der Charakterisierung der Stoffübergänge (Kapitel 3.4.1) und betrug jedes Mal 600 rpm, um eine optimale Durchmischung des Mediums und somit einer bestmöglichen Versorgung der Organismen mit Sauerstoff zu gewährleisten.
Für eine optimale Temperierung und eine damit einhergehende Möglichkeit beste Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurde eine Reaktionstemperatur von 37°C genutzt. Je nach Organismus wurden verschiedene Medien verwendet (s. Durchführungen). Es wurden unterschiedliche Prozessstrategien gewählt, um eine Charakterisierung der Organismen bezüglich ihres Wachstums- und Produktionsverhalten zu ermitteln.

3.4 Methoden und Prozessstrategien

3.4.1 Charakterisierung der Stoffübergänge im Reaktor mittels Natriumsulfitmethode

Die Natriumsulfitmethode ermöglicht es, den Übergang von Sauerstoff aus der Gasphase in die Flüssigphase, im Reaktionsgefäß zu bestimmen. Der Stoffübergang von Sauerstoff in die flüssige Phase ergibt sich hierbei durch eine Oxidationsreaktion, bei der das Natriumsulfit in Lösung mit dem aufgenommenen Sauerstoff aus der Gasphase, im gasdicht verschlossenen Reaktor, zu Natriumsulfat reagiert. Während der Reaktion nimmt der Sauerstoff im Reaktor in der Gasphase ab, diese Abnahme wird mit Sauerstoffabgassensoren gemessen. [7 & 21]

Die Reaktion läuft nach folgender Reaktionsgleichung ab [21]:

$$2\ Na_2SO_3 + O_2 <=> 2\ Na_2SO_4 \qquad \text{(Gl. 9)}$$

Im Anschluss der Messung errechnet man mit Hilfe der ermittelten Daten den volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten (K_La Wert) [21].

Sinn dieser Methode ist es, die optimalen Reaktionsbedingungen für Fermentationen im Gefäß im Vorfeld zu ermitteln.
Dabei wird der beschriebene Vorgang bei unterschiedlichen Füllvolumina und

Rotationsgeschwindigkeiten durchgeführt. Dieser Vorgang dient dazu, die optimale Sauerstoffaufnahme in Lösung zu ermitteln und eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen zu erzielen. Die Reaktion wird abgebrochen, sobald eine Abnahme des Sauerstoffes von drei Volumen-Prozent im Reaktor erreicht wird. Daraufhin belüftet man den Reaktor, so dass wieder ein Ausgangssauerstoffwert von 20,97 Vol% im Gefäß vorliegt. Anschließend wird der gesamte Prozess bei einer weiteren rpm (revolutions per minute) wiederholt (Abb9). Im Anschluss werden aus den erhaltenen Daten, die OTR (Oxygentransferrate) (Gl. 10) und daraus schließlich der K_La-Wert (Gl. 11) für die individuelle Reaktion berechnet [21].

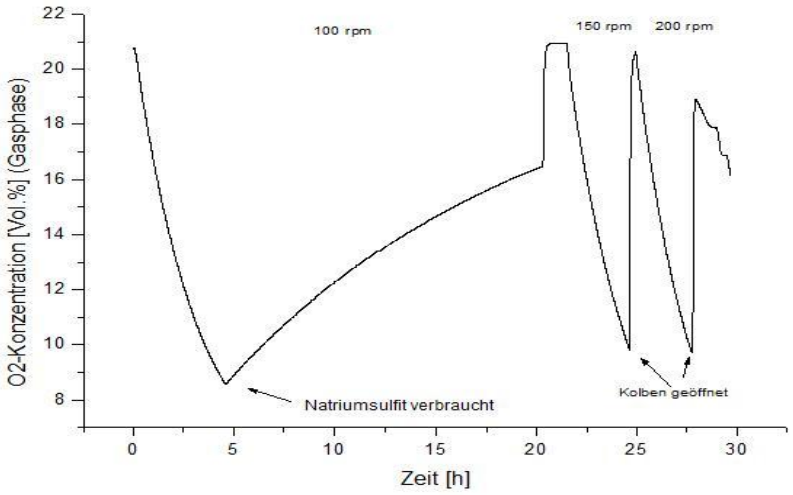


Abbildung 9: beispielhafter Verlauf einer K_La-Messung [21]

Die OTR ergibt sich aus folgender Formel [21]:

verbrauchter Sauerstoff in mol/l ($c(O_2mol)$):

$$c(O_2mol) = [c(O_2\text{-Anfang}) - c(O_2\text{-Messung})]/100 \times [V(\text{Reaktor}) - V(\text{Natriumsulfitlösung})]/(24{,}47 \times V(\text{Natriumsulfitlösung})] \quad \text{(Gl. 10)}$$

Tabelle 11: Legende OTR-Berechnung

$c(O_2\text{-Anfang})$ = 20,97 Vol.%;
24,47 l/mol = molares Volumen des idealen Gases bei Standardbedingungen
$c(O_2\text{-Messung})$ = Messwert O_2 [Vol.%]
V(Reaktor): Gesamtvolumen des Reaktors
V(Natriumsulfitlsg.) = Füllvolumen der Natriumsuflitlösung

Nach folgender Formel [21] lässt sich der K_La-Wert berechnen:

$$K_L a = \frac{OTR}{L_{O_2} \cdot p_{g,O_2} \cdot (y_{O_2}{}^* - y_{O_2,L})} \qquad \text{(Gl. 11)}$$

Tabelle 12: Legende K_La-Wert Berechnung

kLa:	volumetrischer Sauerstofftransferkoeffizient [1/h]
OTR	Sauerstofftransferrate [mol/L/h] (Abnahme des Sauerstoffgehalts pro Zeit)
LO_2	Sauerstofflöslichkeit im Sulfitsystem (0,00078) [mol/L/bar]
$pg\ ,O_2$	Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase von Wasser (0,209) [bar]
yO_2*	O_2-Molenbruch im Gas an der Phasengrenze (1,0) [mol/mol]
yO_2,L	O_2-Molenbruch in der Flüssigkeit (0,0 da mit Natriumsulfit entfernt) [mol/mol]

3.4.2 Charakterisierung der Gelöst-Sauerstoff-Sensoren optisch vs. amperometrisch

Die Charakterisierung der Sauerstoffinline-Messtechnik wurde im Vorfeld zur Ermittlung geeigneter Sensortypen durchgeführt. Dabei wurde ein Sensor mit optischer Messtechnik der Hamilton Bonaduz AG (fluoreszenz Messprinzip), einem Sensor mit amperometrischen Messprinzip von Mettler Toledo (basierend auf dem Clark-Prinzip [15]), gegenübergestellt. Überprüft wurden Handhabung, Reinigungs- und Wartungsaufwand, sowie die Empfindlichkeit auf Störeinflüsse während der Begasung (siehe 4.2.1)

3.4.3 Stammhaltung und Langzeitkonservierung

Die Stämme der rekombinanten *E.coli* Bakterien (BL21 (ΛD3) pLB4: 1661 nvOG und 1659 BW25113) wurden für diese Arbeit an der Technischen Universität Dortmund auf einer Agarplatte kultiviert. Die auf dieser Platte gewachsenen Bakterienkolonien konnten somit erneut in Flüssigmedium kultiviert und mittels Kryokonservierung konserviert werden.

Hierzu werden vereinzelte Bakterienkolonien zunächst von einer Agarplatte entnommen und über Nacht in einem mit Antibiotikum versehenem LB-Flüssigmedium vorkultiviert.

Sobald die Bakterien die exponentielle Phase erreicht haben, werden sie mit 80%igem Glycerin (als Kohlenstoffquelle und Frostschutzmittel) versehen und in sterile Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C eingelagert. Nun sind die Kulturen über einen langen Zeitraum (bis zu mehreren Jahren) konserviert und können für weitere Versuche nach Bedarf aufgetaut und erneut kultiviert werden. [2]

3.4.4 Batch Fermentation

Batch-Fermentationen dienen, im Rahmen dieser Arbeit, der Beobachtung des Organismus und seinem Verhalten auf vorher festgelegte Prozessbedingungen.
Sie finden in einem geschlossenen System statt, bei dem eine definierte Menge an Organismus und Nährstoffen in das Reaktionsgefäß vorgelegt werden [7]. Der Organismus wird kultiviert und sein Verhalten auf die gegebenen Umstände kann somit beobachtet und ausgewertet werden. Es wurden Wachstum, Substrat- und Sauerstoffverbrauch, sowie Produktbildung und der daraus errechnete (Gl. 12 &13) Ausbeute- bzw. Umsatzkoeffizient [7] ermittelt, um das in diesen Versuchen beobachtete Verhalten des Organismus im Hinblick auf eine mögliche Prozesskontrolle und Optimierung weiterer Versuche zu charakterisieren.

Berechnung des Ausbeute- bzw. Umsatzkoeffizienten [7]:
Allgemeine Formel:

$$Y_{FG} = \frac{-\Delta F}{\Delta G} \qquad \text{(Gl. 12)}$$

Formel für die produzierte Produktmenge bezogen auf die Menge an verbrauchtem Substrat [7]:

$$Y_{PS} = \frac{-\Delta P}{\Delta S} \qquad \text{(Gl. 13)}$$

Legende:
$Y_{FG:}$ Ausbeute-Umsatzkoeffizient
ΔF: produzierte Menge an F(z.B. Produkt oder Biomasse)
ΔG: verbrauchte Menge an G (z.B. Substrat)
P: Produkt
S: Substrat

3.4.5 Fedbatch Fermentation

Durch das Zulauf-Satz-Verfahren (Fedbatch), wird in der Regel entweder eine Steigerung des Zellwachstums oder der Produktbildung erzielt. Dabei wird dem Reaktionsgefäß über einen Zulauf aus einer Vorlage eine definierte Menge an Substrat zugeführt, um den Organismus weiterhin mit Nährstoffen zu versorgen und einem Verbrauch dieser entgegenzuwirken. Dabei gibt es unterschiedliche Methoden den Zulaufstrom (Feed) zu steuern. Je nach Verhalten des Organismus kann der Zulauf gesteigert oder vermindert werden, um eine optimale Versorgung zu gewährleisten. Ebenfalls gibt es Strategien, stufenweise Substrat nachzulegen oder den Feed im Verlauf der Fermentation je nach Verhalten der Organismen zu steigern [7]. Abschließend soll eine weitere Steigerung der Produktbildung mit Hilfe einer vorrausgehenden Anzucht der Hefen, unter aeroben Bedingungen, mit Hilfe einer Begasung des Reaktors [26], erprobt werden. Diese Anzucht dient der Vergrößerung der Zelldichte, welche nach Beendigung der Sauerstoffzufuhr unter Verschluss des Reaktors bei weiterer Fütterung mit Substrat eine zusätzlich gesteigerte Ethanolproduktion bewirken soll. Dazu sind charakterisierende Vorversuche nötig, in denen ein erhöhtes Zellwachstum unter Vermeidung des Crabtree-Effektes erreicht wird. Um eine Aussage über Metabolismus der Hefe treffen zu können, wird die Berechnung des Respirationsquotienten (RQ) (Gl. 14) durchgeführt. Liegen die RQ-Werte bei 1, verwertet der Organismus sein Substrat aerob. Liegen die Werte über 1 unterliegt der Organismus dem Crabtree-Effekt und produziert somit Ethanol unter Anwesenheit von O_2.

Der RQ lässt dich durch folgende Formel berechnen [32]:

$$RQ = \frac{CTR}{OTR} \qquad \text{(Gl. 14)}$$

Gelingt eine Kultivierung der Hefen mit RQ-Werten unter 1, wird der Crabtree-Effekt vermieden und ein Wachstum ohne Bildung von Ethanol erreicht [5 & 7].
Dadurch sollte es möglich sein, die Zelldichte zu steigern. Werden die Prozessbedingungen dieses Ansatzes auf anaerobe Verhältnisse (unter Zulauf der Substratlösung) umgestellt, könnte dies möglicherweise zu einer gesteigerten Umsetzung der Glucose führen und dadurch die erhöhte Zelldichte eine verbesserte Ethanolproduktion bewirken.

3.5 Versuchsaufbau Abbildungen

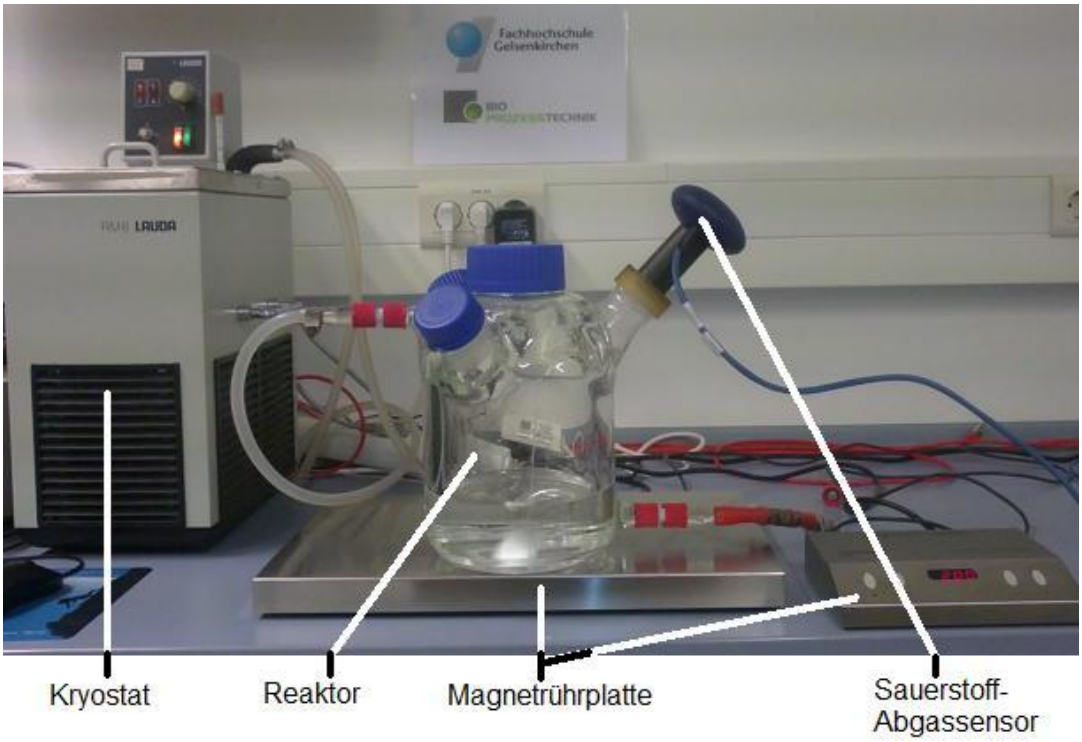


Abbildung 10: Versuchsaufbau Charakterisierung der Stoffübergänge

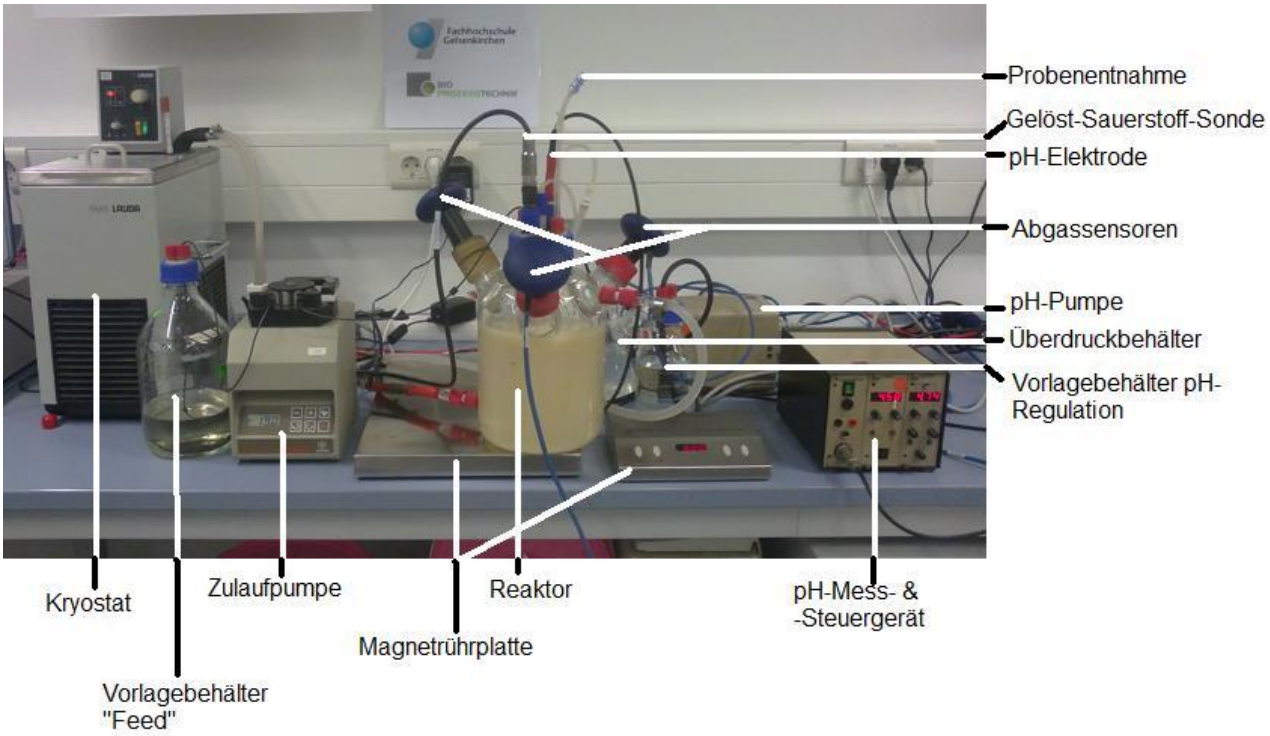


Abbildung 11: Versuchsaufbau Glasfermenter Versuche

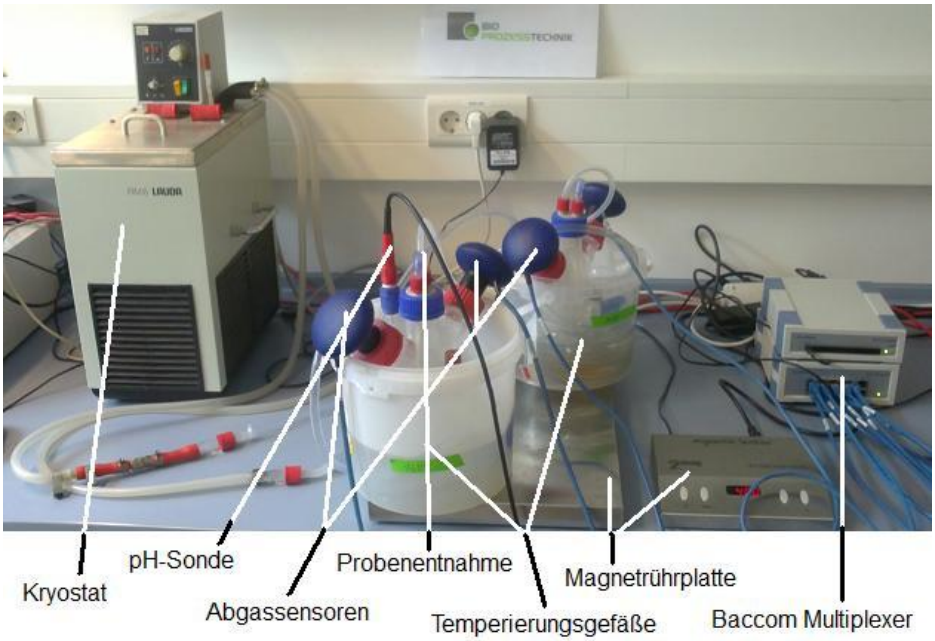


Abbildung 12: Versuchsaufbau Rührkolbenversuch

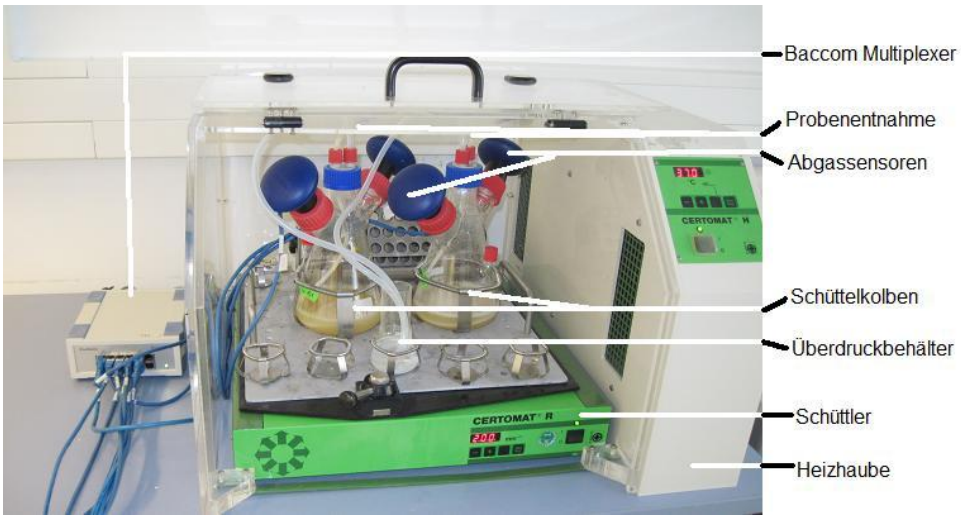


Abbildung 13: Versuchsaufbau Schüttelkolbenversuch

4. Experimentalteil: Durchführungen, Ergebnisse & Diskussion

4.1 Natriumsulfitmethode

4.1.1 Durchführung

Für die Durchführung der Natriumsulfitmethode ist eine Natriumsulfitlösung mit diesem im Überschuss anzusetzen. Dadurch ist es möglich, während des gesamten Verlaufs einer Messung, mit definierter Füllhöhe, die gleiche Lösung weiter zu nutzen. Hierbei werden 20 g Natriumsulfit in einer Flasche eingewogen

und in einem Liter destilliertem-Wasser gelöst. Daraufhin wird der Reaktor auf der Magnetrührplatte positioniert und mit einem O_2-Abgassensor bestückt. Danach ist die Messung mit Hilfe der BACVis-Software [31], entwickelt von der Blue Sens Gas Sensor GmbH, zu starten. Nun wird der Reaktor mit der zuvor gewählten Füllmenge Natriumsulfitlösung gefüllt und gasdicht verschlossen. Die Magnetrührplatte ist auf die gewünschte rpm einzustellen und die Messung wird gestartet.

4.1.2 Ergebnisse & Diskussion

Tabelle 13: Ergebnisse kLA-Wert Berechnung

kLA/s

Messung 1	Rührfrequenz [rpm]		
	200	400	600
Füllvolumen [ml]			
750	0,00238553	0,00374869	0,00494145
1000	0,00153355	0,00187434	0,00494145
1250	0,00153355	0,00170395	0,00306711
1600	0,00119276	0,00153355	0,00170395

rot: beste kLA-Werte dunkelrot: tatsächlich genutzter bester kLA-Wert bei 1,6 l

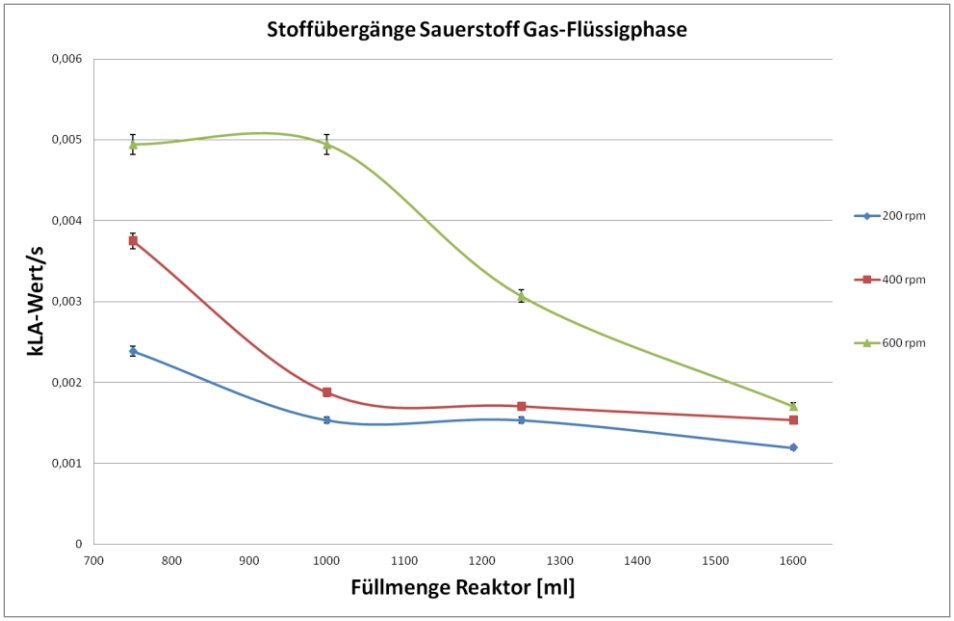


Abbildung 14: Stoffübergänge Sauerstoff von der Gasphase in Flüssigphase

Bei der Charakterisierung der Stoffübergangsgrößen wurden eindeutige Ergebnisse erzielt. Die besten Stoffübergänge des Sauerstoffs von der Gasphase in die flüssige Phase, wurden bei den Füllhöhen von 750 ml & 1000 ml und bei einer Rotation des Magnetrührers bei 600 rpm erzielt. Diese Einstellung (Tabelle13) wäre die optimale, um in diesem Gefäß einen bestmöglichen Übergang des Sauerstoffes zu erzielen. Aus apparativen Gründen wurde ein Kompromissaufbau mit 1600 ml Volumen gewählt. Für dieses Volumen wurde ebenfalls ein optimaler O_2-Übertrag in die Flüssigkeit bei 600 rpm erreicht, was hinsichtlich der Menge an Volumen eine angemessene Durchmischung dieser bewirkt.

4.2 Charakterisierung der Gelöst-Sauerstoffsensoren optisch vs. amperometrisch

4.2.1 Durchführung

Dieser Teil dient der Charakterisierung für die Vorauswahl des geeignetsten Sensors. Diese werden wie folgt auf die Messung vorbereitet. Nach der Sterilisation muss der amperometrische Sensor zunächst jeweils an die Spannungsquelle angeschlossen und für 6 Stunden polarisiert werden. Nach dieser Zeitspanne wird dieser erneut kalibriert, da sich durch die Sterilisation die Steilheit des Sensors ändern kann (aufgrund der sich in der Messzelle befindlichen Elektrolytlösung). Dazu wird an den Reaktor ein Duckluftschlauch über einen Sterilfilter angeschlossen, so dass dieser mit Umgebungsluft befüllt wird und der amperometrische Sensor kalibriert werden kann. Anschließend wird der Reaktor zunächst mit einer Natriumsulfit-Lösung befüllt und auf eine Betriebstemperatur von 37°C gebracht. Im nächsten Schritt werden die jeweiligen Messungen über die zugehörige Computersoftware gestartet. Anschließend wird der Schlauch, welcher Druckluft in den Reaktor fördert, in die Flüssigkeit getaucht, so dass eine Beobachtung auf die Messwerte der Sensoren betrachtet werden kann.

4.2.2 Ergebnisse & Diskussion

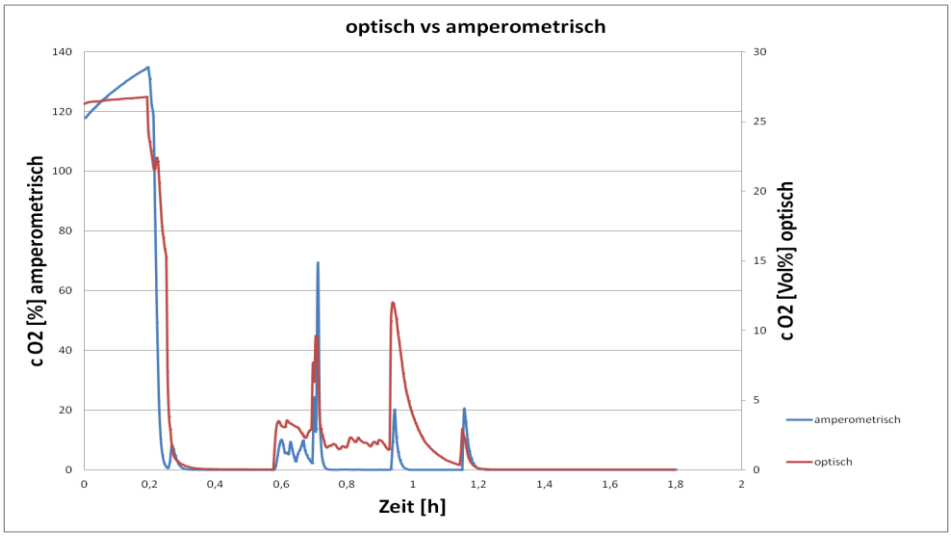


Abbildung 15: Verlauf optischer- und amperometrischer-Sauerstoffsensor

Am Verlauf der Kurven (Abb. 15) erkennt man, dass beide Sensoren ein ähnliches Verhalten bezüglich der Begasung zeigen. Beide Sensoren messen die Zufuhr von Sauerstoff in Flüssigkeit über Bläschenbildung und reagieren dementsprechend. Die Sensoren sind sehr präzise und zeigen zu Beginn der Messung ohne Begasung, einen rapiden Abfall des gemessenen Sauerstoffes in Lösung an. Auffällig ist, dass der optische Sensor deutlich detailliertere Veränderungen anzeigt, was durch die ständigen Luftblasen in Lösung zu erwarten war. Der Verlauf des amperometrischen Sensors hingegen sinkt zwischenzeitlich immer wieder auf den Nullwert und zeigt dafür intensivere Ausschläge. Das könnte darauf hinweisen, dass dieser den Sauerstoff in Lösung erst ab einem gewissen Schwellenwert anzeigt. Generell unterscheiden sich die Sensoren vor allem in der Handhabung und dem Zeitfaktor der Versuchsvorbereitung. Dabei ist der optische- Sensor dem amperometrischen- deutlich überlegen, da er nur sehr selten kalibriert werden muss. Der amperometrische-Sensor hingegen, muss jedes Mal, nach der Sterilisation im Autoklaven, kalibriert werden. Diese Kalibrierung stellt sich bei einem sterilen Einsatz als problematisch heraus, da sie entweder bei Umgebungsluft oder unter Sauerstoffausschluss stattfinden muss. Dazu muss man den Reaktor vor jeder Messung begasen oder mit Stickstoff spülen. Der optische Sensor hingegen ist von Werksseite aus vorkalibriert und sofort einsatzfähig.

Zudem benötigt er neben dem Kalibrationsproblem des anderen Sensortyps keine Polarisationszeit, da er nicht auf eine Elektrolytlösung angewiesen ist. Der amperometrische Sensor wird, nach Trennung mit der Stromquelle, zunächst für 6 Stunden an eine Spannungsquelle angelegt und kann erst danach kalibriert werden. Zudem benötigt er eine Elektrolytlösung, welche in einem sehr empfindlichen Membrankörper gebettet ist, was ihn mechanisch sehr instabil macht. Diese Tatsache führt zu einem weiteren Vorteil des optischen Sensors. Er benötigt keinen empfindlichen Membrankörper und ist somit deutlich robuster, außerdem verfügt dieser zusätzlich über ein integriertes Thermometer mit dem eine Online-kontrolle der Reaktionstemperatur in Lösung ermöglicht wird. Diese Reihe von Tatsachen hat dazu geführt, dass der optische Sensor letztendlich für die Fermentationsversuche, gegenüber dem amperometrischen, gewählt und eingesetzt wurde.

Tabelle 14: Vor- und Nachteile der Sauerstoffsensoren

Hamilton: optischer Sensor Visiferm™ DO		**Mettler Toledo: amperometrischer Sensor InPro 6800**	
Vorteile	**Nachteile**	**Vorteile**	**Nachteile**
leichte Handhabung	bisher noch nicht im vorhandenen System integriert	länger (ca. 0,5 cm)	schwierige Handhabung
nach autoklavieren keine Kalibration nötig	noch keine direkte Visualisierung	bereits im System integriert	vor jeder Messung Kalibration notwendig
nicht sehr Wartungsintensiv	minimal kürzer (ca. 0,5 cm)	Visualisierung möglich	nach autoklavieren Kalibrierung nötig
keine bis wenige Verschmutzung			bei sterilem Betrieb nur über Begasung oder N_2 Spülung
leicht zu reinigen			schnelle Verschmutzung
integriertes Thermometer			größere Messintervalle (teilweise ungenauer)
keine Polarisation nötig			
sofort einsatzbereit			nach Trennung vom Stromnetz 6 Stunden Polarisierung nötig
kürzere Messintervalle (genauer)			Werte schwanken stark bei Begasung des Mediums
Erhöhte Präzision bei Begasung			

4.3 Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Fermentationen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden ausnahmslos im Glasfermenter durchgeführt. Aufgrund der kurzen Fermentationsdauer von maximal 5 Stunden und der Stabilität des Organismus, wird auf eine sterile Arbeitsweise bei den Batch-Ansätzen verzichtet. Die Fedbatch-Fermentationen hingegen, haben eine längere Prozesslaufzeit (ca. 2-4 Tage) und müssen daher unter sterilen Bedingungen ablaufen.

4.3.1 Batch Fermentation

4.3.1.1 Durchführung

Das Medium wird in den temperierten Glasfermenter, mit einer Füllmenge von 1600 ml, befüllt. Die Magnetrührplatte ist auf die zuvor festgelegte Rührgeschwindigkeit (600 rpm) einzustellen. Die Software wird gestartet und auf die gewünschten Parameter eingestellt. Es wird die Menge einer Packung Trockenhefe (7g) ausgewogen und in den Reaktor gefüllt. Dieser wird nun gasdicht verschlossen, da es sich um eine Fermentation unter annähernd anaeroben Bedingungen (anoxisch) handelt. Unmittelbar nach dem Animpfen des Mediums mit dem Organismus ist eine Probe zu entnehmen, mit welcher der Ausgangswert für optische Dichte und Glucose ermittelt wird. Nun werden in definierten Zeitabständen weitere Proben entnommen. Die erhaltenen Proben dienen zur Beobachtung des Zellwachstums und der Glucosekonzentration.

4.3.1.2 Ergebnisse & Diskussion

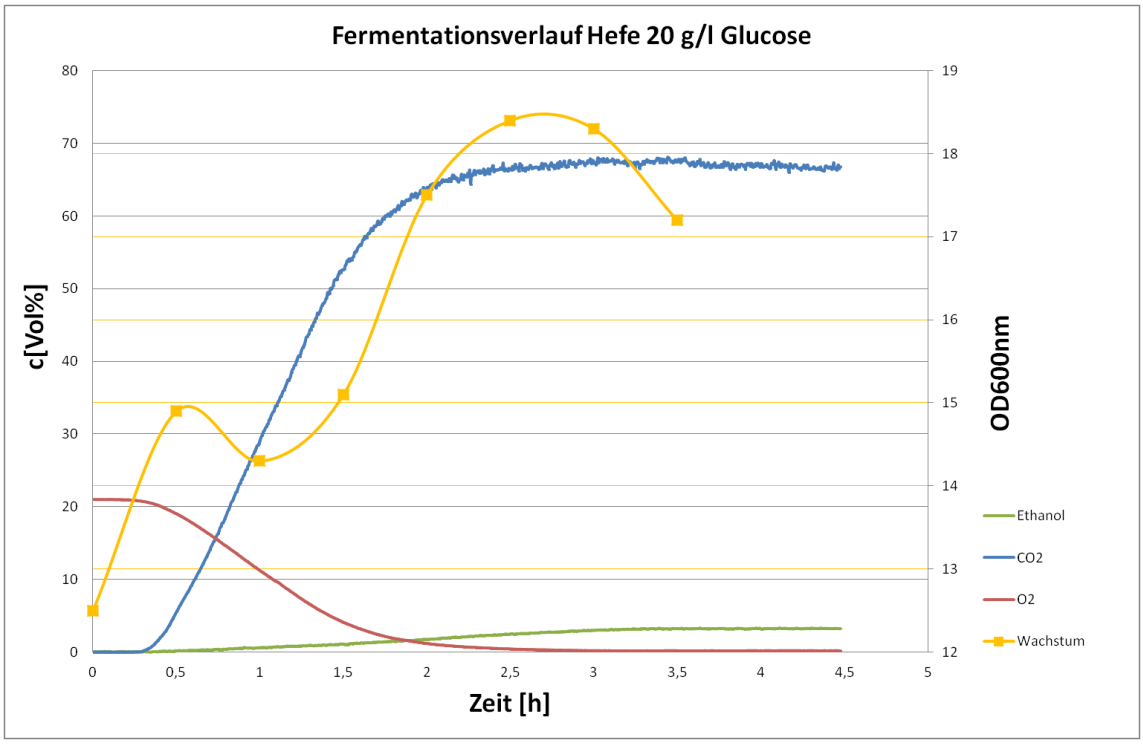


Abbildung 16: Batch-Fermentation von *S.cerevisiae* bei einer Glucosekonzentration von 20 g/l

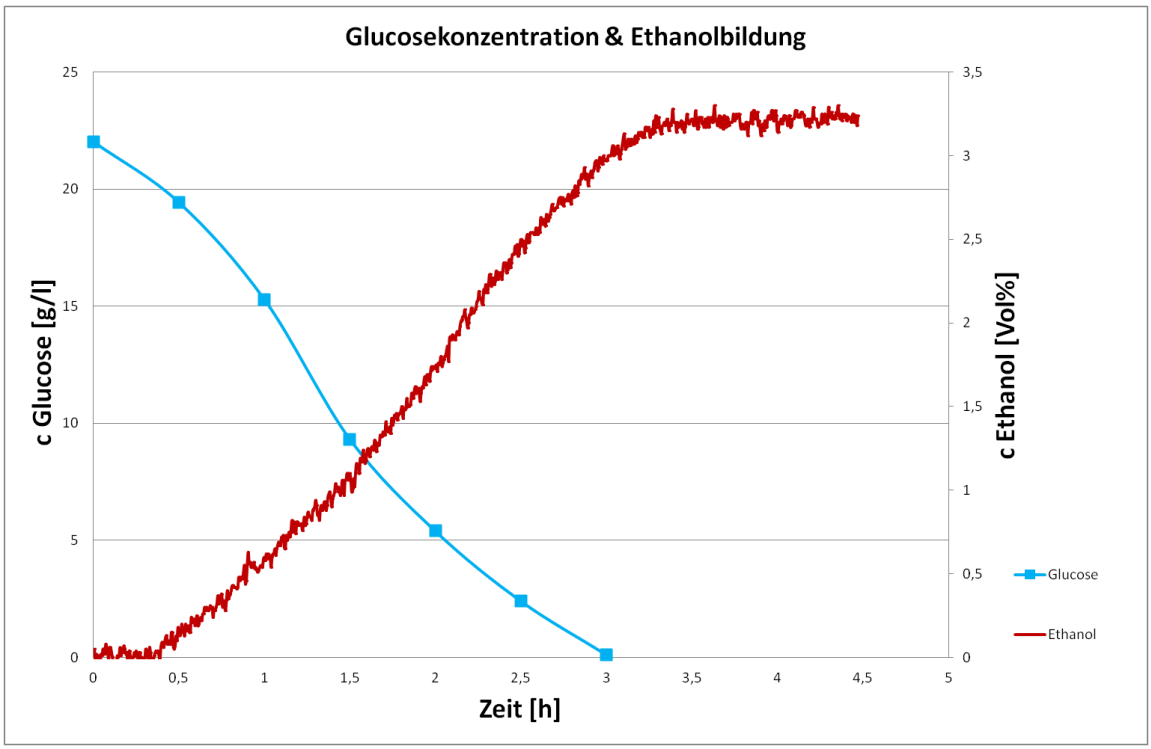


Abbildung 17: Glucosekonzentration und Ethanolbildung Hefe-Batch 20 g/l Glucose

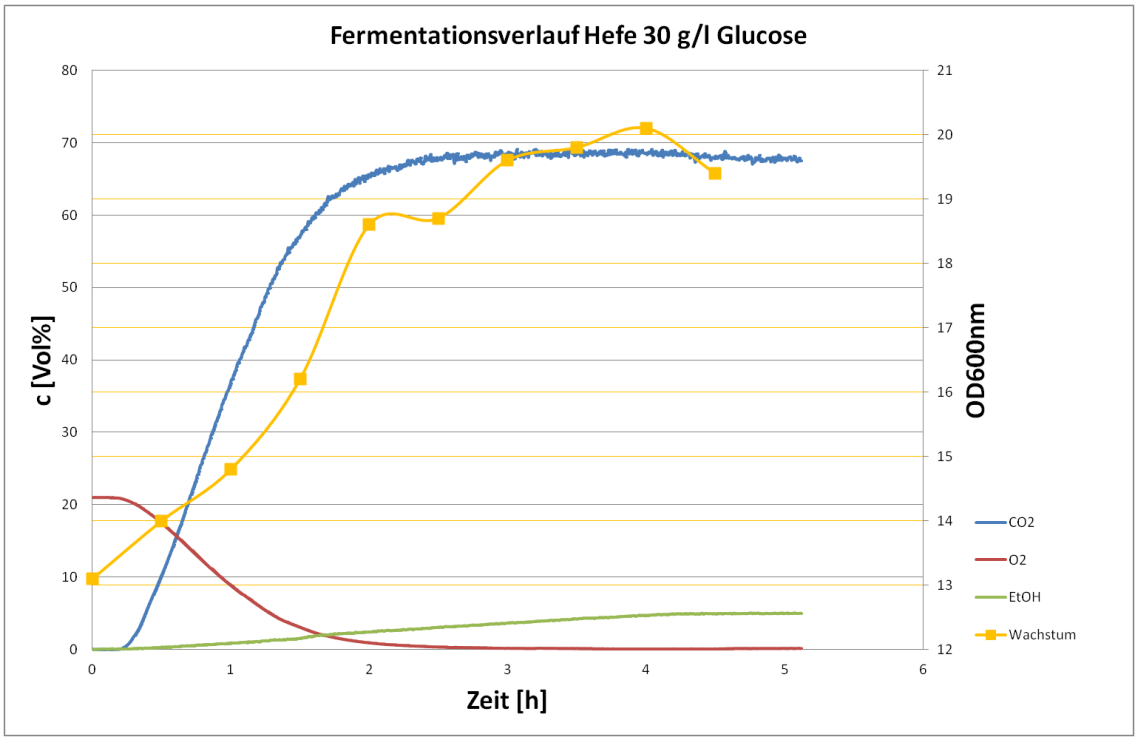


Abbildung 18: Batch-Fermentation von *S.cerevisiae* bei einer Glucosekonzentration von 30 g/l

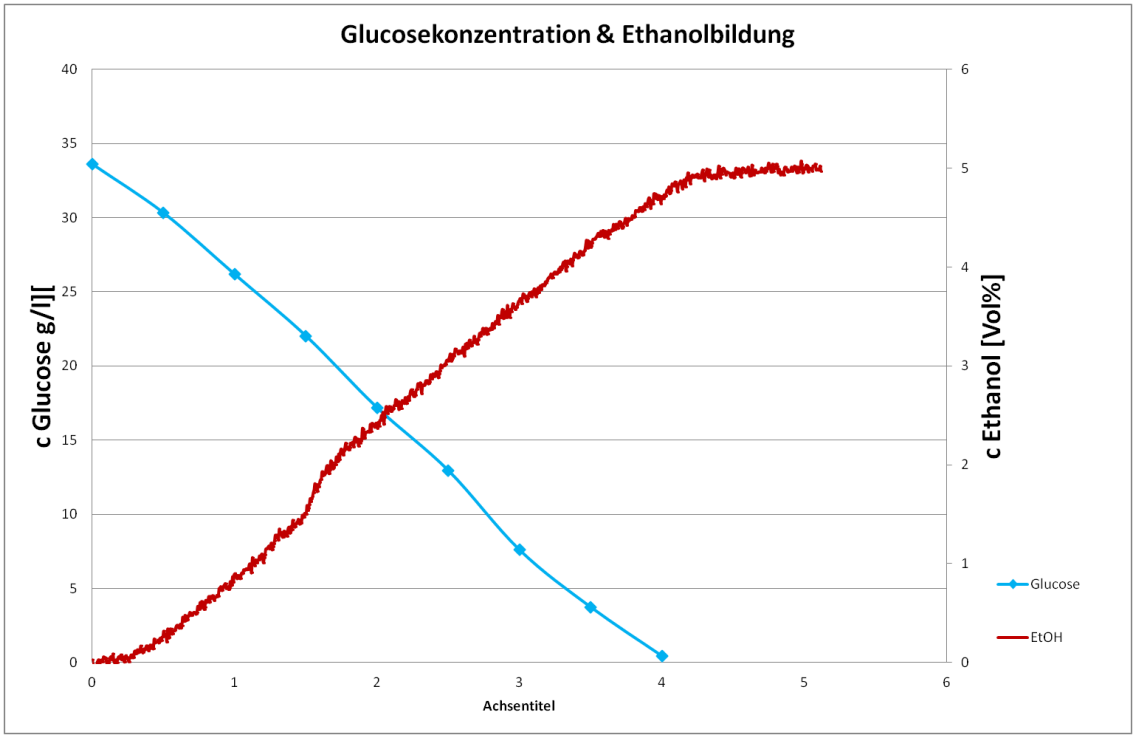


Abbildung 19: Glucosekonzentration und Ethanolbildung Hefe-Batch 30 g/l

Tabelle 15: Umsatz zwischen Glucoseverbrauch zu Ethanolbildung bei 20 g/l und 30 g/l c[Glc] [7]

Konzentration Glucose 20 g/l		Konzentration Glucose 30 g/l	
EtOH g/l	Umsatzkeoffizient YPS	EtOH g/l	YPS
0,552	0	0,473	0
2,288	0,670	2,919	0,745
6,391	0,990	8,048	1,237
10,494	0,688	15,070	1,694
16,017	1,409	20,987	1,224
21,145	1,716	25,485	1,063
24,301	1,379	29,903	0,825
		34,164	1,106
		38,424	1,295

Aus den Batch Ansätze mit *S.cerevisiae* lässt sich das Verhalten der Hefe auf unterschiedliche Zuckerkonzentrationen erkennen. Es wurde je eine Fermentation mit einer Glucosekonzentration von 20 g/l und eine bei 30 g/l durchgeführt. Die Verläufe der Fermentation (Abb.16 & 18) weisen deutlich auf ein Wachstum des Organismus, sowie auf eine Umsetzung des Substrates unter Produktbildung hin (Berechnung s. Kap. 3.4.4). Es wurde bei beiden Ansätzen Glucose, unter Bildung von Ethanol & CO_2, verbraucht (Abb.16 - 19). Aus dem Verlauf der Sauerstoffkurve wird deutlich, dass dieser im Reaktor schnell, vom Organismus durch aerobe Atmung, verwertet wurde. Durch den hohen Zuckeranteil im Medium, wird dieser unter alkoholischer Gärung schnell zu Ethanol und CO_2 verarbeitet. Die Erhöhung der Zuckerkonzentration von 20 g/l auf 30 g/l hatte sowohl eine Auswirkung auf die Dauer der Fermentation, als auch auf die Menge produzierten Ethanols im Batch-Verfahren. Jedoch hat sich bei der Berechnung des Umsatzes [7], bezogen auf Substratverbrauch und Produktbildung (Tabelle 15) ergeben, dass der Umsatz selbst bei der niedrigeren Konzentration im Batch-Ansatz stärker war, als bei der höheren Konzentration. Beim Betrachten der Glucosekonzentrationen (Abb.17 & 19) wird ersichtlich, dass der Organismus bereits nach 1,5 Stunden die Hälfte des vorliegenden Zuckers verwertet hat. Aus diesen Erkenntnissen ließ sich für eine mögliche Optimierung des Prozesses, unter Nutzung des Fedbatch-Verfahrens, eine Fütterungsstrategie entwickeln, um die Produktion des Ethanols zu steigern. Diese Strategie beinhaltet eine Fütterung mit einem konstanten und einem stufenweise gesteigertem Zulaufstrom.

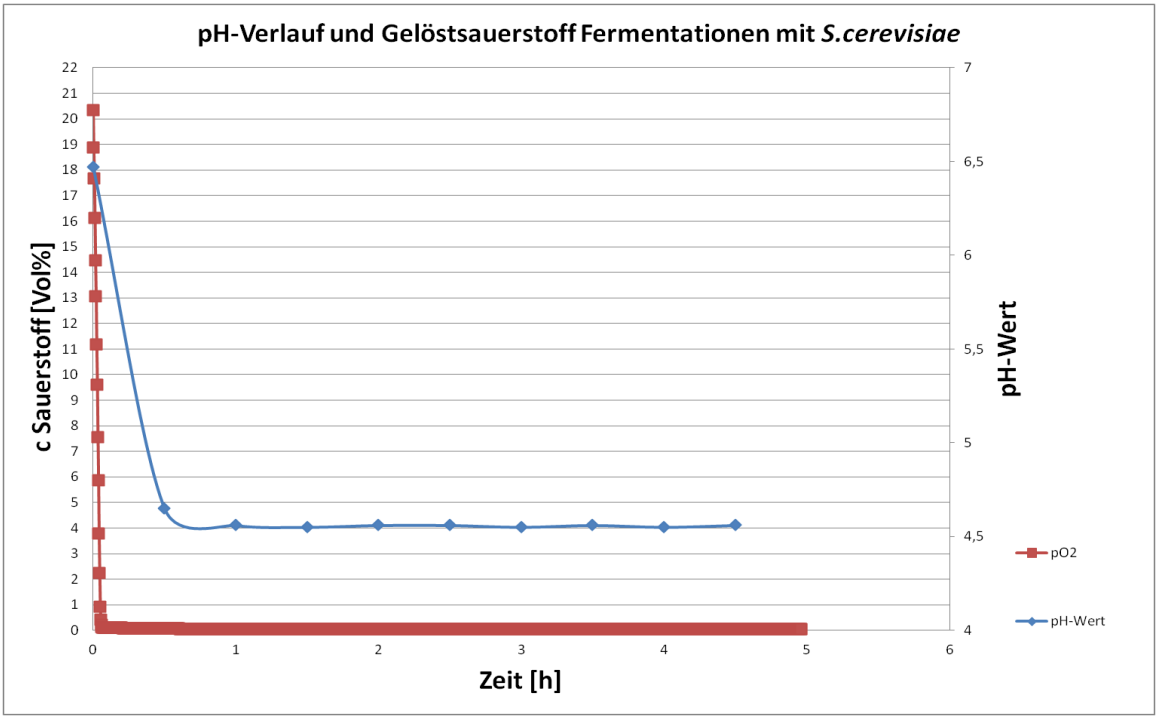


Abbildung 20: pH-Verlauf und Gelöstsauerstoff

pH- & Gelöstsauerstoff-Verlauf

In Abbildung 20 lässt sich erkennen, dass der pH-Wert während der Fermentation von einem nahezu neutralen Wert von 6,5 auf einen eher sauren Wert von 4,5 absinkt. Ab einem Wert von 4,5 wurde der pH-Wert automatisch von einer Pumpe über das pH-Mess- und Steuergerät reguliert und auf einem pH-Wert von 4,5 gehalten, um ein optimales Millieu für das Wachstum und die Produktion der Hefen zu schaffen. Bleibt diese Regulation aus, sinkt der pH-Wert weiter, wodurch es zu einer Beeinträchtigung des Metabolismus der Hefen kommen könnte. Der Gelöstsauerstoff-Wert hingegen sinkt bei allen Fermentationen stets auf einen minimalen Wert von ca. 0,06 Vol%. Dies lässt vermuten, dass die Hefen den in Lösung vorliegenden Sauerstoff sofort verbrauchen und für ihr Zellwachstum nutzen. Die Verläufe dieser beiden Parameter sind nahezu bei allen Fermentationen von *S.cerevisiae* zu beobachten, weshalb aufgrund der Redundanz dieser Daten auf eine Aufstellung für jeden einzelnen Fermentationsversuch verzichtet wurde.

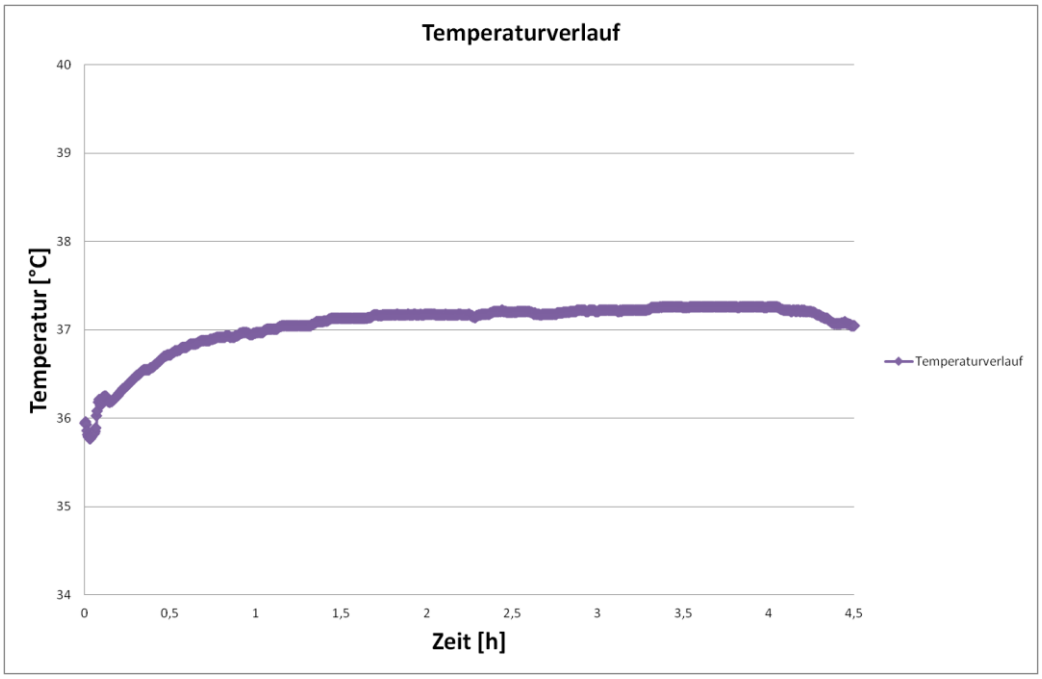


Abbildung 21: Temperaturverlauf

Temperaturverlauf

Die Temperatur im Reaktionsgefäß wurde über den Kryostaten geregelt und auf einem festeingestellten Wert gehalten. Gemessen wurde die Temperatur mit dem in der Gelöstssauerstoff-Sonde (Visiferm™ DO) integrierten Thermometer. Man erkennt deutlich einen Temperaturanstieg zu Beginn der Fermentation (Abb.21). Dieser Anstieg ist darauf zurückzuführen, dass der Reaktor erst nach Befüllung des Mediums an den Kryostaten angeschlossen wird und die Messtechnik schon vor Beimpfung mit dem Organismus gestartet wird. Ab einer Temperatur von ca. 37°C wurde der Ansatz mit dem Organismus beimpft. Da die erreichten Temperaturwerte jedoch relativ konstant und zutreffend sind, war eine ausreichende Temperierung des Nährmediums gewährleistet. Die Verläufe des Temperaturverlaufes sind in allen Fermentationen nahezu identisch und wurden daher an dieser Stelle nur einmal diskutiert.

4.3.2 Fedbatch Fermentation

4.3.2.1 Durchführung

Tabelle 16: Versuchsübersicht Fedbatch-Fermentationen

Fedbatch-Fermentation Nr. 1	
kontinuierlicher Zulaufstrom 500 g/l Glucoselösung	
Fedbatch-Fermentation Nr. 2	
Stufenweise erhöhter Zulaufstrom 500 g/l Glucoselösung	
Vorversuch für Fedbatch-Fermentation Nr. 3 Fermentation im Schüttelkolben: Vermeidung des Crabtree-Effekts	
Schüttelkolbenversuch Nr. 1	**Schüttelkolbenversuch Nr. 2**
0,1 g/l Glucoselösung aerob, Schikanenkolben	0,3 g/l Glucoselösung aerob, Schikanenkolben
Hauptversuch Fedbatch-Fermentation Nr. 3	
1. Vorrausgehende aerobe Anzucht der Hefen mit Begasung 2. Stop der Begasung, Verschluss des Reaktors und Start des kontinuierlichen Zulaufs 500 g/l Glucoselösung	

Die Fedbatch-Fermentation unterscheidet sich von den Batch-Ansätzen grundlegend in ihrer sterilen Arbeitsweise. Dieses Vorgehen ist notwendig, da sich die Fermentationsdauer, aufgrund des Zulaufes von weiterem Substrat deutlich verlängert und eine Kontamination nicht mehr ausgeschlossen werden kann. Bei der Fedbatch-Fermentation wird ein weiterer Vorlagebehälter, der sogenannte Feed, mit einer definierten Menge, einer vorher bestimmt konzentrierten Glucoselösung, befüllt. Dieser Behälter ist über einen weiteren Pumpschlauch einer weiteren Pumpe mit dem Reaktor verbunden. Alle weiteren Abläufe entsprechen denen der Batch Ansätze. Es werden jeweils drei Ansätze durchgeführt. Beim ersten Ansatz ist ein kontinuierlicher Zulaufstrom, bei dem zweiten eine stufenweise Erhöhung des Zulaufstromes einzustellen. Der dritte Ansatz beinhaltet die vorrausgehende Anzucht des Organismus, ohne einen Zulausfstrom, jedoch unter Begasung [26], um aerobe Verhältnisse zu schaffen. Haben die Hefen ihre exponentielle Wachstumsphase erreicht, wird die Begasung unterbunden und der Zulauf von Zucker gestartet. Dieses Vorgehen dient dazu, die Ethanolproduktion noch weiter zu steigern. Dazu wird zuvor ein Batch-Ansatz parallel in zwei 500 ml Schüttelkolben mit unterschiedlichen Minimalzuckerkonzentrationen (0,1 g/l und 0,3 g/l Glucose), durchgeführt.

Diese Versuche dienen dazu, eine Fermentation unter Vermeidung des **Crabtree-Effektes** zu erzielen. Bei der Auswahl der Zuckerkonzentration, für die Anzucht der Hefen im Großen Ansatz Nr.3, wird nach Auswertung und Vergleich des Wachstums, der niedrigsten Ethanolproduktion und des respiratorischen Quotienten (RQ) , die Zuckerkonzentration mit den besten Ergebnissen gewählt.

4.3.2.2 Ergebnisse & Diskussion

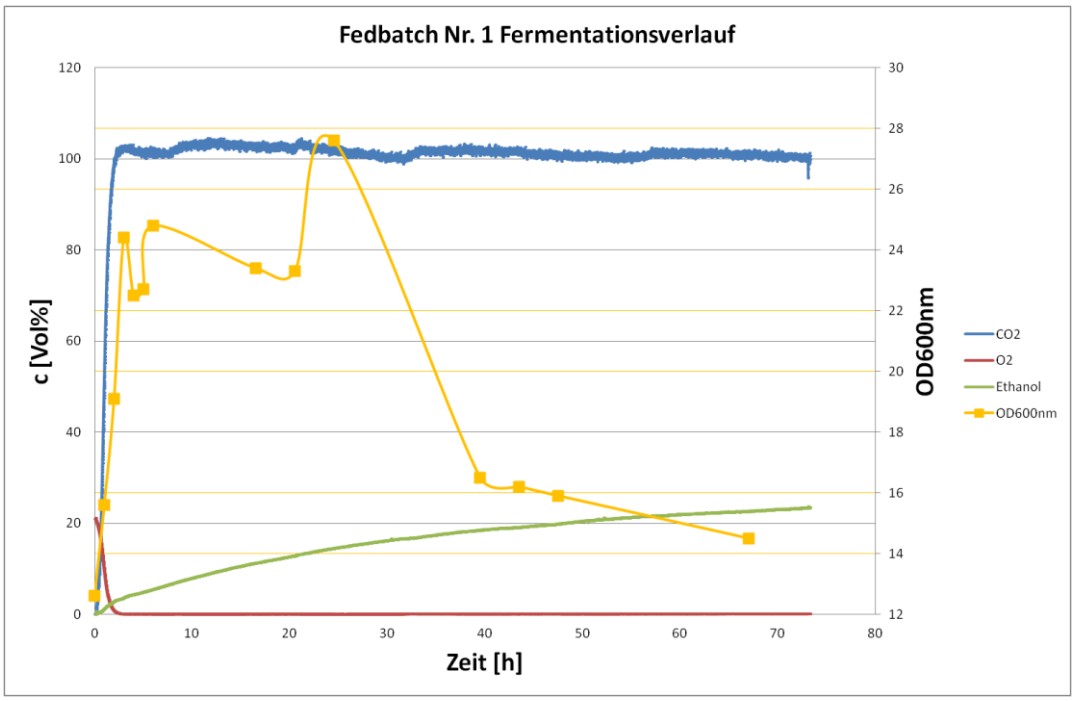


Abbildung 22: Fedbatch Ansatz Nr. 1 kontinuierliche Fütterung mit Glucosekonzentration 500 g/l

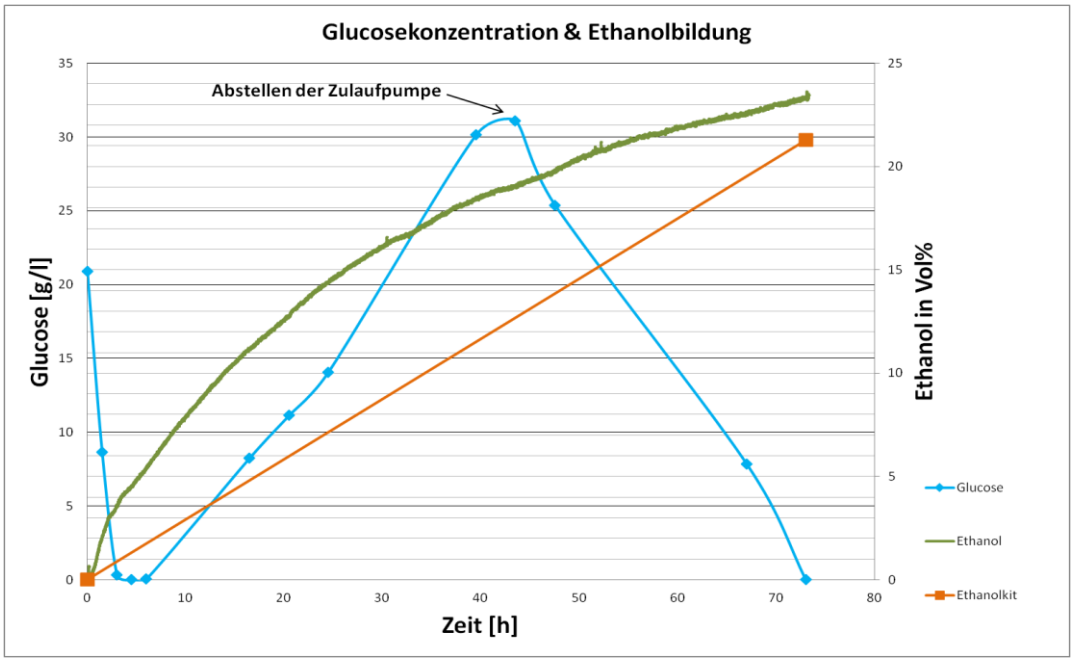


Abbildung 23: Fedbatch Nr. 1 Glucosekonzentration und Ethanolbildung

Fedbatch-Fermentation Nr. 1

Die Ergebnisse der ersten Fedbatch-Fermentation zeigen zunächst eine deutliche Steigerung der Ethanolproduktion. Im Verlauf der Fermentation (Abb.22) erkennt man das typische Verhalten der Hefen, welches schon während der Batch-Ansätze zu beobachten war (s. Kap. 4.3.1.2). Der Sauerstoffgehalt in der Gasphase nimmt sehr schnell ab, wohingegen das Wachstum, die CO_2- und Ethanolproduktion stetig anstiegen, was ein deutliches Indiz für einen anaeroben Metabolismus der Zellen ist. Durch den kontinuierlichen Zulaufstrom der Glucoselösung, konnte ein gleichmäßiges Ansteigen der Ethanolwerte erreicht werden. Das deutet an, dass der Organismus sich im Gleichgewicht befindet und sein Substrat stetig zu dem gewünschten Produkt umsetzt. An dem Graphen der Glucosekonzentration in Bezug zur Ethanolproduktion (Abb. 23) lässt sich in der ersten Hälfte des Prozesses deutlich erkennen, dass die Glucosekonzentration rapide absinkt. Dies ist damit zu erklären, dass sich die Hefen im Stadium der exponentiellen Wachstumsphase befinden und einen größeren Teil des Substrates für das Wachstum verbrauchen. Die zuvor in den Batch-Fermentationen ermittelten Daten zur Glucosekonzentrationsabnahme bestätigten sich somit nur teilweise, da der Organismus den Zucker schneller verbrauchte als erwartet wurde. Um dem gesamten Verbrauch des Zuckers und einer damit einhergehenden Substratlimitierung entgegenzuwirken, wurde die Zulaufpumpe minimal erhöht. Nach einer Fermentationsdauer von ca. 6 Stunden, die Zeit in der die Batch Ansätze aufgrund des gesamten Substratverbrauches abgelaufen waren, begann der Zuckergehalt in der Lösung wieder zu steigen. Das wiederum ist ein Indiz dafür, dass der Organismus mehr Substrat zur Verfügung stehen hatte, als er verbrauchen konnte. Als ein maximaler Füllstand des Reaktors erreicht war, wurde die Zulaufpumpe abgestellt. Der Organismus hat nun den restlichen, sich im Reaktor befindlichen Zucker, verstoffwechselt und zu Ethanol verarbeitet, was nochmals einen Anstieg des CH-Signals zur Folge hatte. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass durch den stetigen Zulauf an Substratlösung eine kontinuierliche Verdünnung des Mediums entstanden ist. Dies kann man auch gut an den Werten der optischen Dichte erkennen, welche erst stark abnahmen, sich dann aber nach Abschalten des Zulaufs wieder in einem Gleichgewicht hielten, bis sie dann nach Verbrauch des Substrates endgültig sanken. Ein maximaler Wert von 23 Vol% Ethanol wurde anhand des CH-Signals

erreicht, die Auswertung der Endbestimmung durch den enzymatischen Test auf Ethanol ergab einen Wert von 21,3 Vol%. Die Abweichung vom erhaltenen Wert des CH-Sensors ist damit zu erklären, dass dieser nur Kohlenwasserstoffverbindungen in der Gasphase misst, diese jedoch nicht voneinander unterscheidet. Da Hefen neben den Produkten CO_2 und Ethanol auch Essigsäure und Acetate produzieren, könnte der Unterschied auch darin liegen. Aufgrund einer sehr starken Verdünnung der Probe für den enzymatischen Ethanoltest, kann es natürlich auch hierbei zu Fehlern kommen, welche einen Teil des Unterschieds erklären könnten. Laut Bedienungsanleitung des Tests, kann es bei diesem zu Abweichungen zwischen 0,5 und 1 mg/l multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor kommen, was bei einer Verdünnung von 1:10000, 5-10 g/l entsprechen [19]. Diese Abweichungen ergeben, bezogen auf die Konzentration in Vol% eine Abweichung zwischen 0,63 Vol% und 1,26 Vol%. Die Charakterisierung des enzymatischen Ethanoltests, (durch eine dem Test beiliegenden Ethanolstandardlösung), ergaben ebenfalls Abweichungen dieser Größenordnung. Der Fehler des Test-Kits und die Vermutung anderer CH-Verbindungen (Essigsäure, Acetat) in Lösung, würden den Wert des Sensorsignals somit bestätigen.

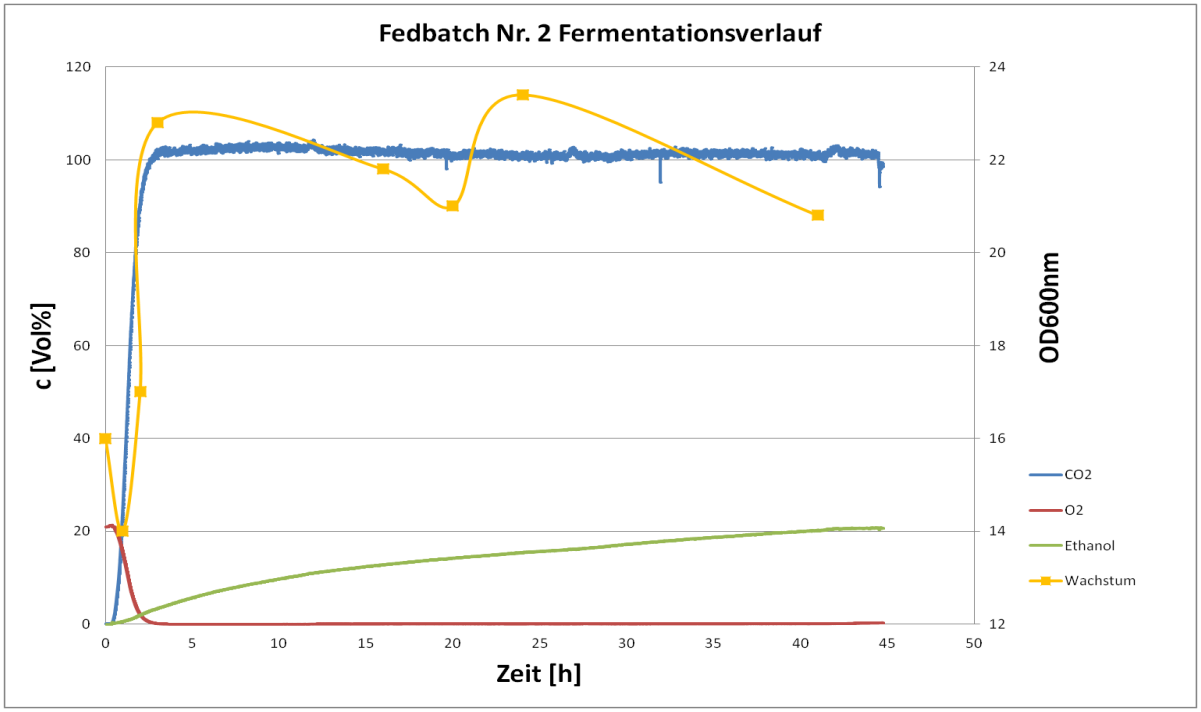


Abbildung 24: Fedbatch Ansatz Nr. 2 Steigerung des Zulaufstroms: Glucosekonzentration 500 g/l

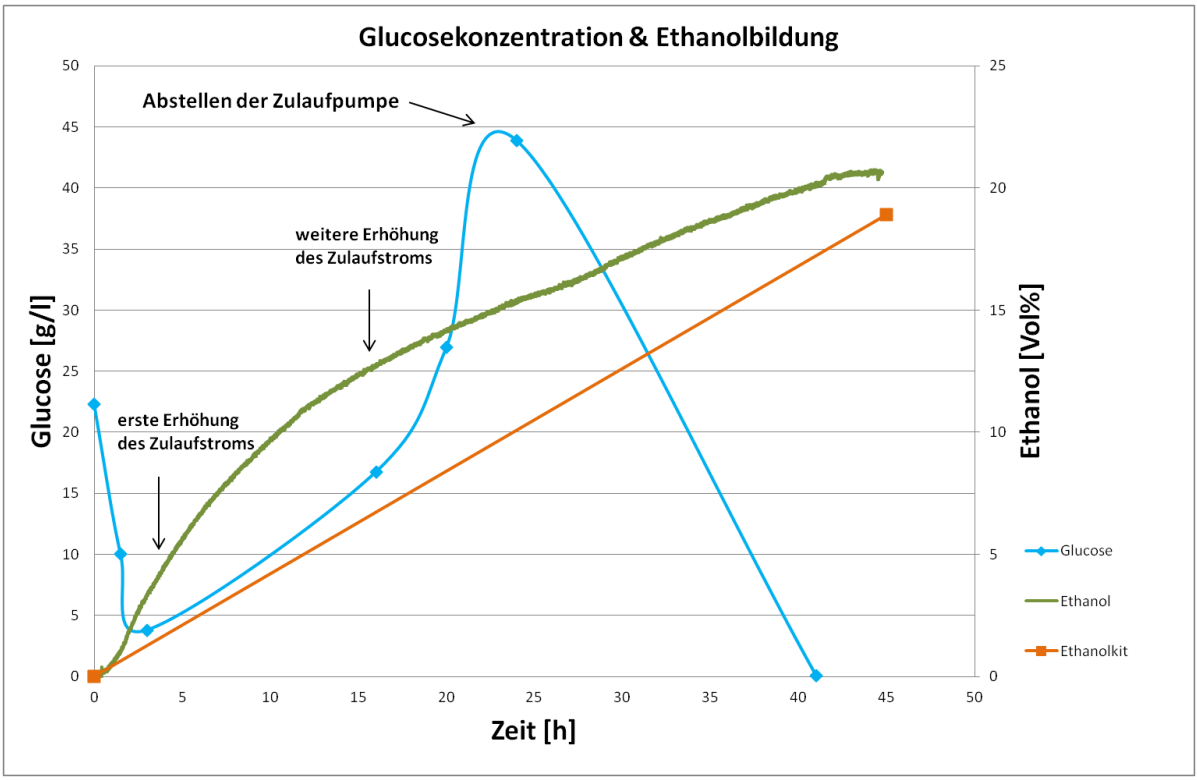


Abbildung 25: Fedbatch Nr. 2 Glucosekonzentration und Ethanolbildung

Fedbatch-Fermentation Nr. 2

Bei der zweiten Fedbatch-Fermentation (Abb. 24) wurde eine stufenweise Erhöhung des Zulaufstroms ausgetestet. Die Einstellung der Zulaufpumpe wurde am ersten Tag der Fermentation, nach 4 Stunden Fermentationszeit, erhöht. Eine weitere Erhöhung wurde nach 16 Stunden durchgeführt. Auf den Verlauf des CH-Signals hatte die Erhöhung des Stromes jedoch keine sichtbare Auswirkung. Erst nach Abschalten der Pumpe, bei einer maximalen Füllmenge des Reaktors, stieg der Verlauf des CH-Signals, wie schon bei der Fedbatch-Fermentation Nr.1, aufgrund der ausbleibenden weiteren Verdünnung an. Der nun noch vorhandene Zucker, konnte daraufhin endgültig verstoffwechselt werden. Der Anstieg der optischen Dichte zu einem Zeitpunkt von etwa 25 Stunden, könnte auf eine unzureichende Aufwärmung der Lampe des Photometers zurückzuführen sein, durch die es zu deutlichen Abweichungen gekommen sein könnte. Es wurde eine Ethanol-Endkonzentration von 20,65 Vol% beim Signal des CH-Sensors und einem ermittelten Wert von 18,9 Vol% durch den enzymatischen Test erreicht.

Die Abweichungen des Sensorwertes von dem Wert des Testkits sind vermutlich auf die gleichen Faktoren wie bei der ersten durchgeführten Fedbatch-Fermentation zurückzuführen. Somit ist zu sagen, dass ein kontinuierlicher Zulaufstrom wie er bei Fedbatch-Fermentation Nr. 1 durchgeführt wurde, innerhalb dieser Versuchsreihe einen höheren Ethanolwert erzielen konnte, als mit stufenweise gesteigertem Zulaufstrom. In dem Verlauf der Glucosekonzentration und Ethanolbildung (Abb.25) kann man wieder einen deutlichen Anstieg des Glucosewertes im Reaktor erkennen, welcher darauf schließen lässt, dass der Organismus mehr Zucker zur Verfügung hatte, als er verwerten konnte.

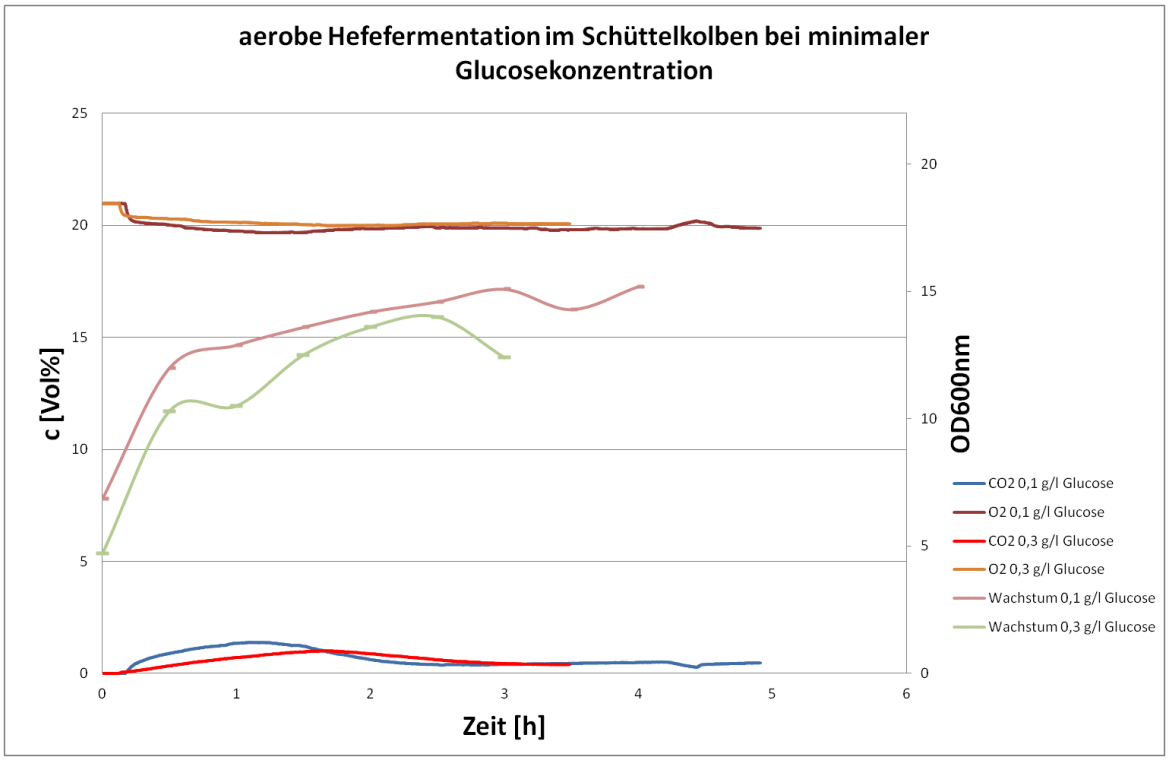


Abbildung 26: Fermentationen im Schüttelkolben mit minimaler Glucosekonzentration

Tabelle 17: enzymatischer Test auf Ethanol Endbestimmung

enzymatischer Ethanol-Test Endbestimmung			
Zeit [h]	c EtOH [Vol%] c[Glc] 0,1 g/l	Zeit [h]	c EtOH 2 [Vol%] c[Glc] 0,3 g/l
0	0	0	0
4	**0,01**	3	**0,275**

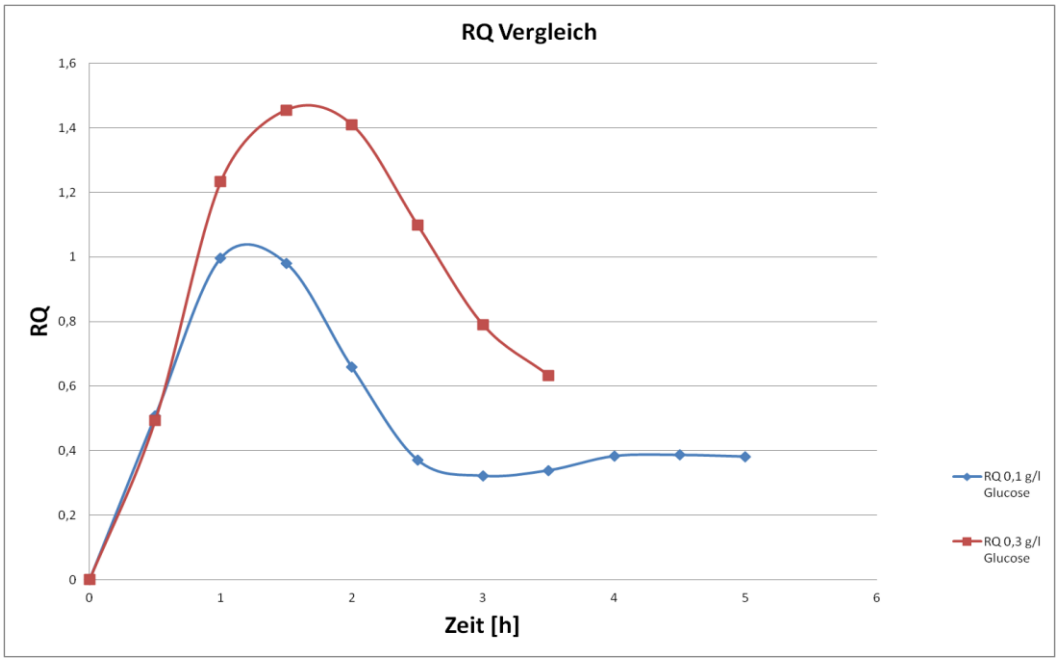


Abbildung 27: Vergleich Respirationsquotienten der Schüttelkolben

Fedbatch-Fermentation Nr. 3.1 : Ermittlung der optimalen Minimal-Glucosekonzentration für ein vorrausgehendes Wachstum unterhalb des Crabtree Effektes.

Der Vorversuch in den Schüttelkolben (Abb.26) zeigt, dass sowohl Sauerstoff verbraucht, als auch CO_2 in geringen Mengen gebildet wird. Die mit dem enzymatischen Test-Kit ermittelten Werte für die Ethanolkonzentration am Ende der Fermentation sprechen jedoch dafür, dass der Ansatz mit der niedrigen Glucosekonzentration bei 0,1 g/l einen sehr geringen Ethanolwert von 0,01 Vol% erreicht hat. Der Ansatz mit einer Konzentration von 0,3 g/l Glucose hat laut Enzymtest einen höheren Ethanolwert von 0,275 Vol% erreicht. Die Werte für die optische Dichte zeigen, dass das beste Wachstum bei einer Glucosekonzentration von 0,1 g/l erreicht wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumskurve bei dieser Konzentration gleichmäßig ansteigt und ein Maximum bei einer optischen Dichte von OD 15,2 erreicht wird. Die Wachstumskurve bei einer Glucosekonzentration von 0,3 g/l hingegen, liegt deutlich unter dieser und erreicht nur einen Wert von OD 14. Das Verhalten des Wachstums und die Tatsache, dass bei der Konzentration von 0,3 g/l mehr Ethanol entstanden ist, weisen auf den Crabtree-Effekt hin, bei dem der Organismus weniger Zellmasse und dafür unter aeroben Bedingungen Ethanol aus Glucose produziert. Diese Annahme wird zudem noch durch die Ermittlung des respiratorischen Quotienten (Abb. 27)

gestützt, welcher bei dem Ansatz mit der niedrigen Glucosekonzentration hauptsächlich unter einem RQ von 1 liegt. Der Ansatz bei einer Glucosekonzentration von 0,3 g/l hingegen liegt deutlich über einem RQ von 1, was die Vermutung des Crabtree-Effektes stützt und somit ein Indiz für einen anaeroben Metabolismus der Zellen sein könnte (s. Kap. 3.4.5)

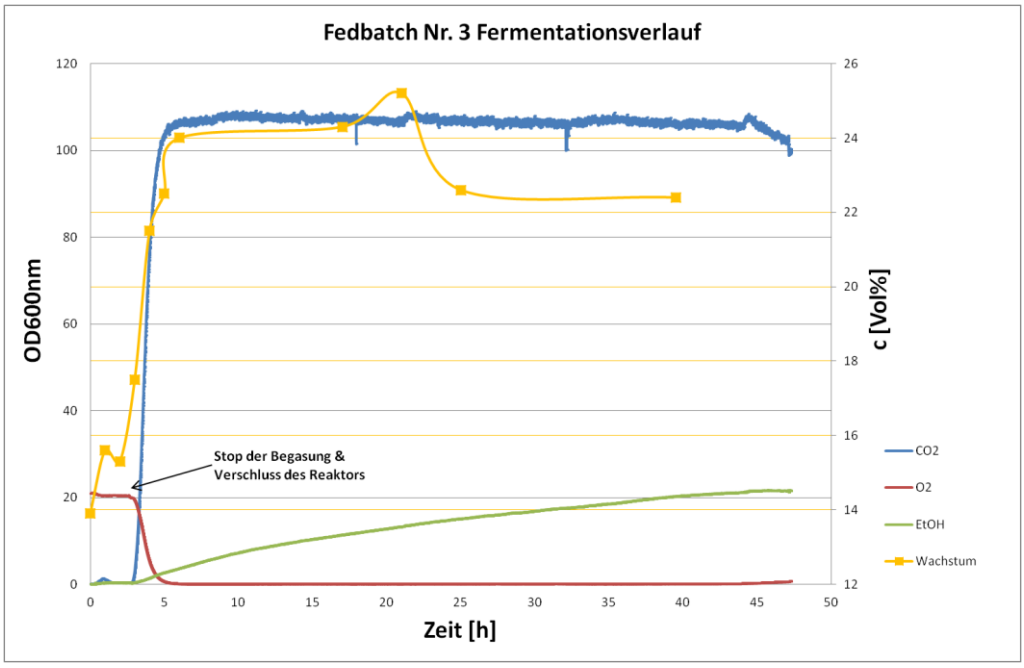


Abbildung 28: Fedbatch Nr. 3: aerobe Anzucht der Hefe unter Crabtree-Effekt mit minimaler Glucosekonzentration im Batch (0,1 g/l) – später Verschluss des Reaktors mit Starten des Zulaufstroms Glucosekonzentration 500 g/l

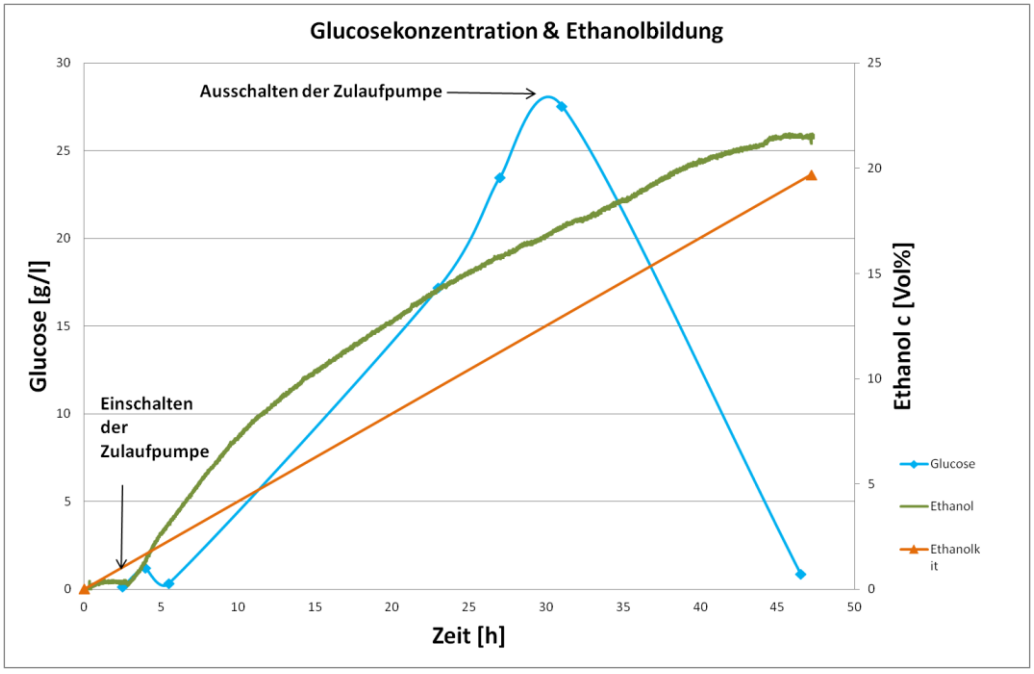


Abbildung 29: Fedbatch Nr. 3 Glucosekonzentration und Ethanolbildung

Fedbatch Nr. 3.2: Großer Ansatz

Aus dem Vorversuch (Abb.26) hat sich gezeigt, dass eine minimale Zuckerkonzentration von 0,1 g/l Glucose für eine Anzucht der Hefen unter aeroben Bedingungen, bestens geeignet ist. Die Hefen nutzen bei dieser Konzentration das vorhandene Substrat für ihr Wachstum, anstatt zur Produktion von Ethanol (Tabelle 7). Daher wurde dieser Ansatz zunächst ohne weiteren Zuckerzulauf gestartet und begast.

Ab einem Zeitpunkt von 2 Stunden begann die optische Dichte jedoch wieder zu sinken, so dass die Begasung gestoppt und der Reaktor gasdicht verschlossen wurde (Abb. 28). Daraufhin wurde die Zulaufpumpe gestartet, so dass der Organismus kontinuierlich mit Substrat versorgt wurde und sich eine gleichmäßige Ethanolproduktion einstellen konnte(Abb. 29). Man erkennt, dass das Wachstum nach Starten des Zulaufs deutlich zunahm und sein Maximum nach 21 Stunden erreicht hat (Abb. 28). Der Ethanolgehalt stieg nun, durch die Zugabe des Substrates, gleichmäßig an (Abb. 29). Da die Pumpe jedoch, wie schon in den Fedbatch-Ansätzen zuvor, mehr Zucker in den Reaktor gefördert hat, als der Organismus verbrauchen konnte, stieg die Glucosekonzentration in Lösung bis zum maximalen Füllstand kontinuierlich an. Durch die Verdünnung der Substratlösung ist bei der Messung der optischen Dichte nach 25 Stunden wieder ein Abfall dieser zu verzeichnen, wie er auch schon in den Fedbatch-Fermentationen zuvor aufgetreten ist (s. Fedbatch-Fermentation Nr. 1 & 2). Nach Abschalten des Feed wurde der überschüssige Zucker nun weiter zu Ethanol verarbeitet, bis ein maximaler Wert von 21,94 Vol% des CH-Signals und einem durch das Ethanol-Kit bestimmten Wert von 19,7 Vol% erreicht wurde. Dieser liegt wider erwarten etwas unter den Werten des Fedbatch-Ansatzes Nr. 1.

Tabelle 18: Maximal erreichte Ethanolwerte aller Fedbatch-Fermentationen mit *S.cerevisiae*

	Fedbatch Nr. 1	**Fedbatch Nr. 2**	**Fedbatch Nr. 3**
maximal erreichte Ethanolwerte	Sensor: 23 Vol% Enzymtest: 21,3 Vol%	Sensor: 20,65 Vol% Enzymtest: 18,9 Vol%	Sensor: 21,94 Vol% Enzymtest: 19,7 Vol%

Alle erreichten Ethanolwerte, der durchgeführten Fedbatch-Ansätze, lagen nahe an einem Wert von 20 Vol% (Tabelle 18), welcher für die Fermentation von nicht optimierter Hefe relativ hoch ist. Somit kann man zusammenfassend erwähnen, dass dieser Teil positive Ansätze für eine Prozessoptimierung ergeben hat.

4.4 Fermentation rekombinanter *E.coli* Bakterien

Die Fermentationen der rekombinanten *E.coli*-Bakterien unterscheiden sich deutlich von denen der Hefen. Die *E.coli* Organismen müssen vor dem Einsatz im Glasfermenter in LB-Medium (Luria-Bertani s. Medien) vorkultiviert werden. Desweiteren wird ein umfangreicheres Medium (SD-8 Komplexmedium s. Medien) verwendet, um ein optimales Wachstum und eine Produktion der erwünschten Metabolite zu erzielen. Das Medium wird vor dem Animpfen mit einem Antibiotikum versehen, welches eine selektive Wirkung hat. Es wachsen nur die Bakterienstämme, welche eine Antibiotikaresistenz tragen.

Tabelle 19: Übersicht verwendeter *E.coli* Stämme

***Escherichia coli* Stamm BL21 (ΔD3) pLB4:** **konstruiert von Prof. Dr.-Ing Lars M. Blank,** **(RWTH Aachen Institut für angewandte Mikrobiologie)** **Ausstrich auf Agarfestmedium aus Kryokultur an der TU Dortmund**
1659 *E.coli* BW25113 pLB4, Ampicillin-Resistzenz, ältere Kultur
1659 *E.coli* BW25113 pLB4, Ampicillin-Resistzenz, neue Kultur
1661 *E.coli* nvOG pLB4, Ampicillin-Resistzenz, neue Kultur

4.4.1 Wachstumskurven in LB Medium zur Charakterisierung der optimalen Vorkultivierung

4.4.1.1 Durchführung

Die Messung einer Wachstumskurve in LB-Medium, dient der Überprüfung des Wachstumsverhaltens. Dazu wird ein steriler 100 ml Schüttelkolben mit einem Volumen von 30 ml LB-Medium befüllt. Anschließend werden dem Medium 6 µl Carbenicillin Stock Solution (Ampicillin Derivat) sowie 6 µl Inokulum aus einer Kryo-konservierten Kultur zugesetzt. Anschließend wird der Kolben bei 37°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von der Kultur wird jede Stunde eine Probe entnommen und die optische Dichte bestimmt.

4.4.1.2 Ergebnisse & Diskussion

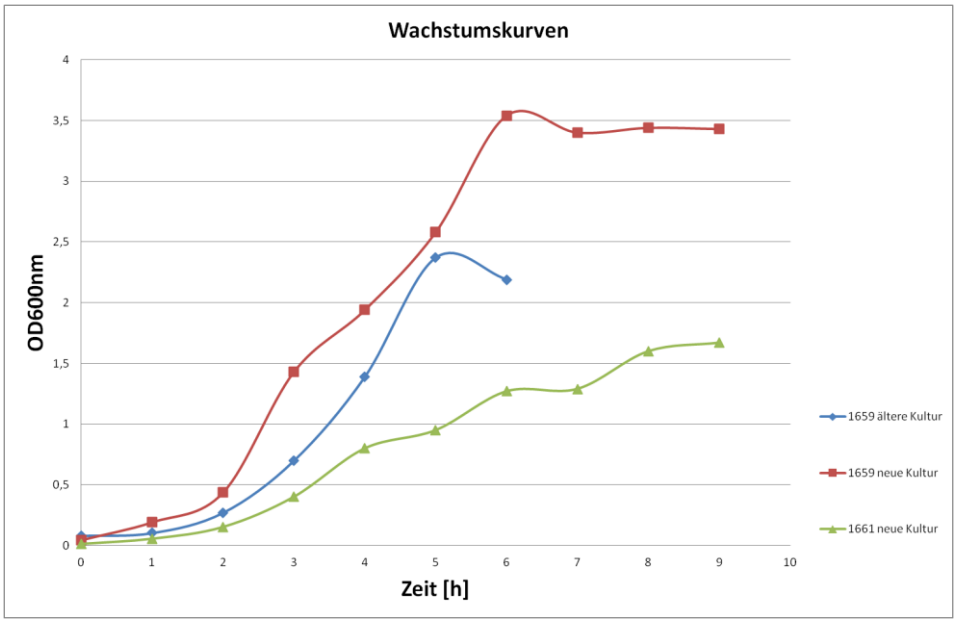


Abbildung 30: Wachstumskurven der Stämme *E.coli* BL21 (λD3) pLB 4 in LB-Medium: 1659 E. coli BW 25113 (ältere und neue Kultur) & pLB4 & 1661 E.coli nvOG pLB4

Der Vergleich der Wachstumskurven (Abb. 30) der drei Stämme (Tabelle 19) zeigt eine deutliche Variation im Verhalten der Organismen. So liegt die ermittelte optische Dichte des Stammes *E.coli* 1661 nvOG pLB4 deutlich niedriger als die der beiden Stämme *E.coli* 1659 BW25113 pLB4. Die beiden 1659er Stämme hingegen unterscheiden sich untereinander deutlich in der ermittelten optischen Dichte. So erreicht der Stamm der älteren Kultur maximale Werte zwischen OD 2,19 und OD 2,36 die neue Kultur hingegen Werte zwischen OD 3,4 und OD 3,54.

4.4.2 Batch Ansatz im Glasfermenter

4.4.2.1 Durchführung

Für die Vorkultur werden 30 ml LB-Medium (Luria Bertani s. Medien) in sterile 100 ml Schikanenkolben überführt. Dem Medium werden nun 6 µl Carbenicillin Stock-Solution zugeführt. Anschließend wird ein Inokulum von ebenfalls 6 µl aus einer Kryo-konservierten Kultur in den Schüttelkolben überführt. Dieser wird unmittelbar nach dem Animpfen in den Schüttler gestellt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Der Reaktor wird mit 1600 ml SD-8 Komplexmedium befüllt und mit 1 ml Carbenicillin-Stock Solution versehen. Der auf die Messung vorbereitete Reaktor wird mit einem aus der Vorkultur entnommenen Inokulum von 10 ml angeimpft. Während des gesamten Fermentationszeitraums werden folgende Proben genommen: OD, Glucosekonzentration, zellfreie Proben für die HPLC-Analytik.

4.4.2.2 Ergebnisse & Diskussion

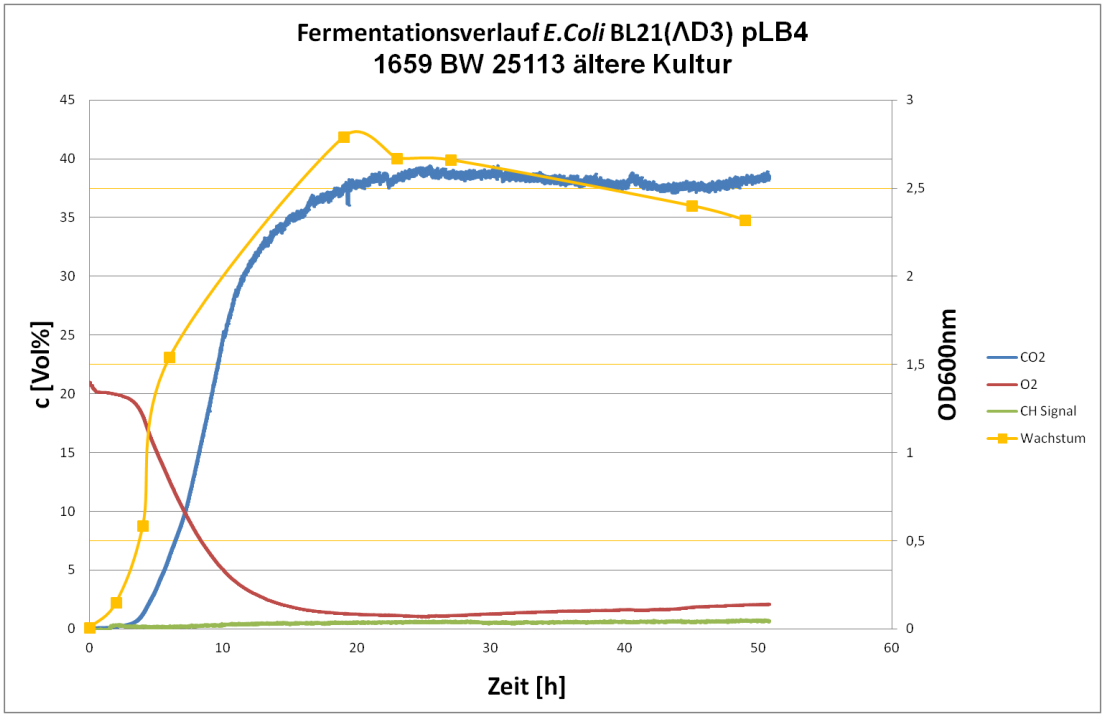


Abbildung 31: Batch Fermentation Nr. 1 *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113 ältere Kultur

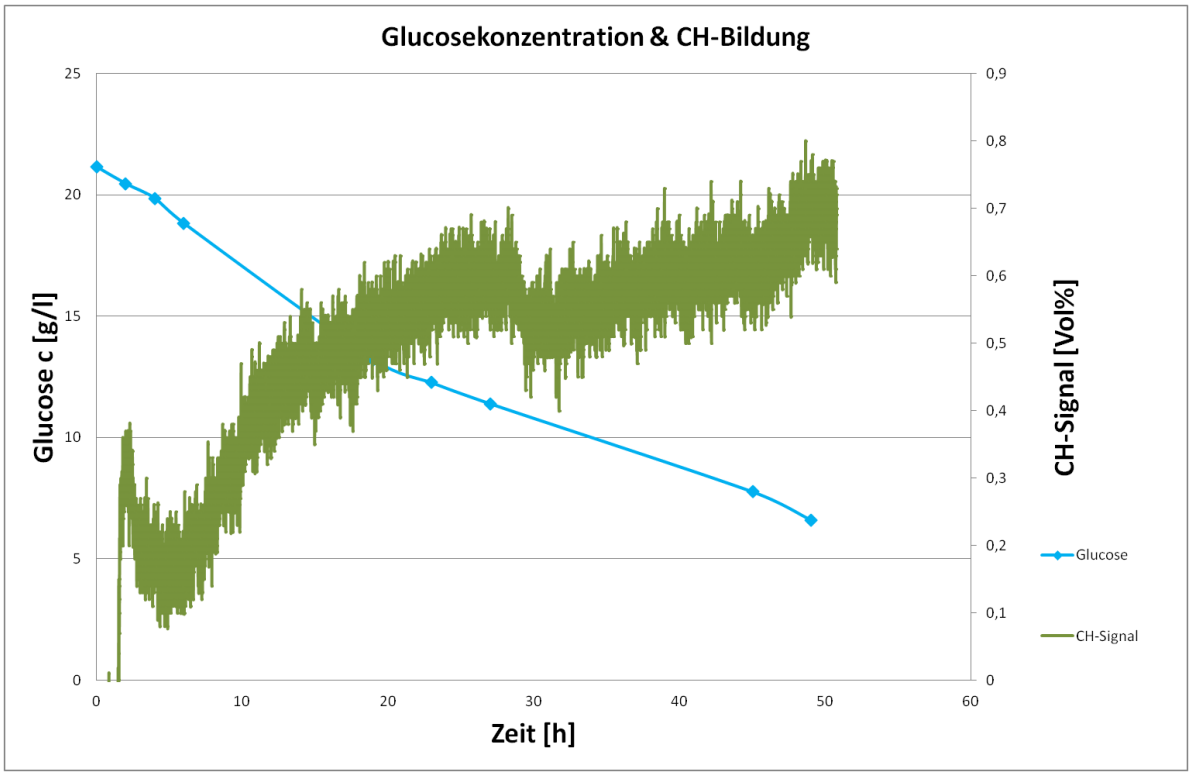


Abbildung 32: Glucosekonzentration und CH-Signal Batch Nr. 1

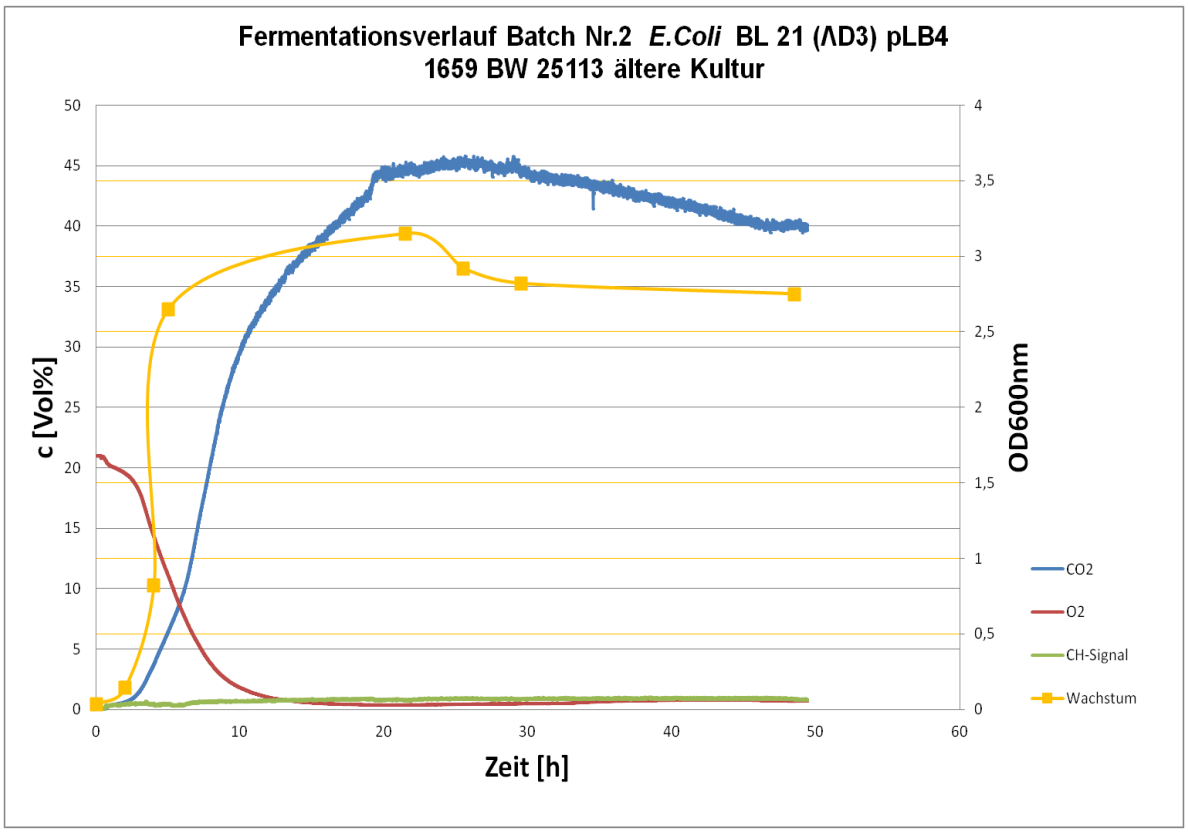


Abbildung 33: Batch Fermentation Nr. 2 *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113 ältere Kultur

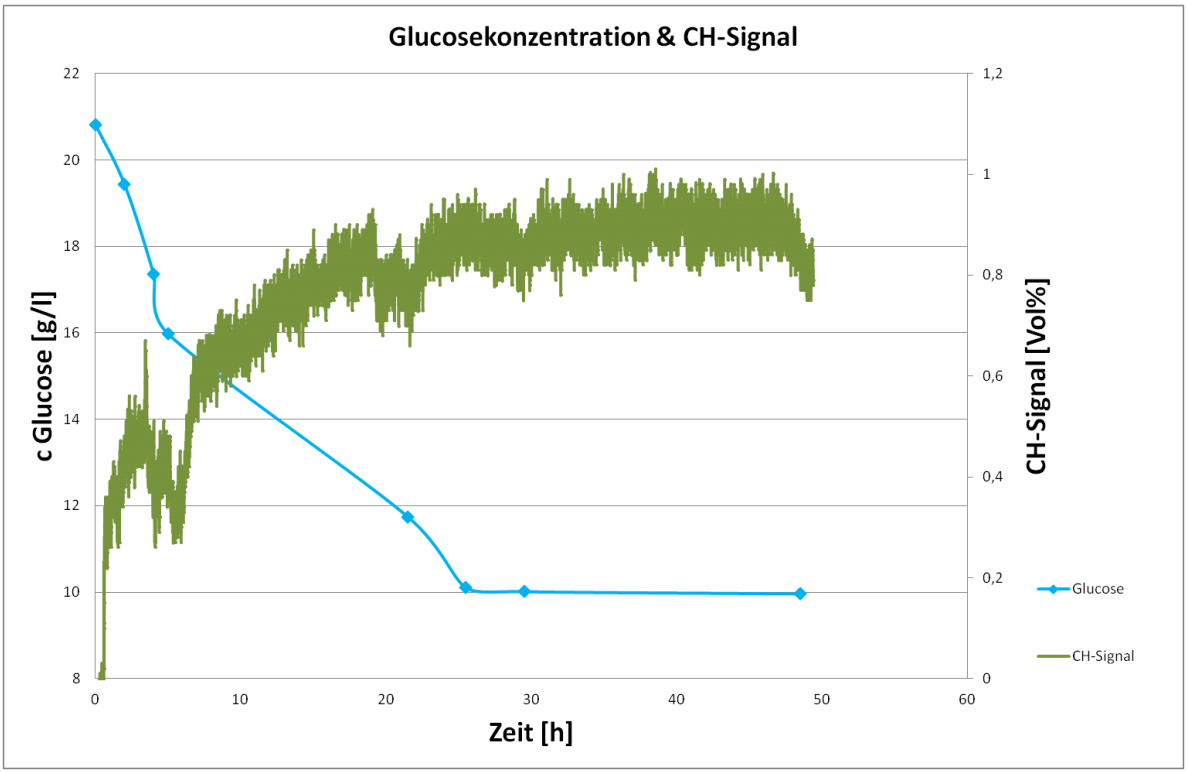


Abbildung 34: Glucosekonzentration und CH-Signal Batch Nr. 2

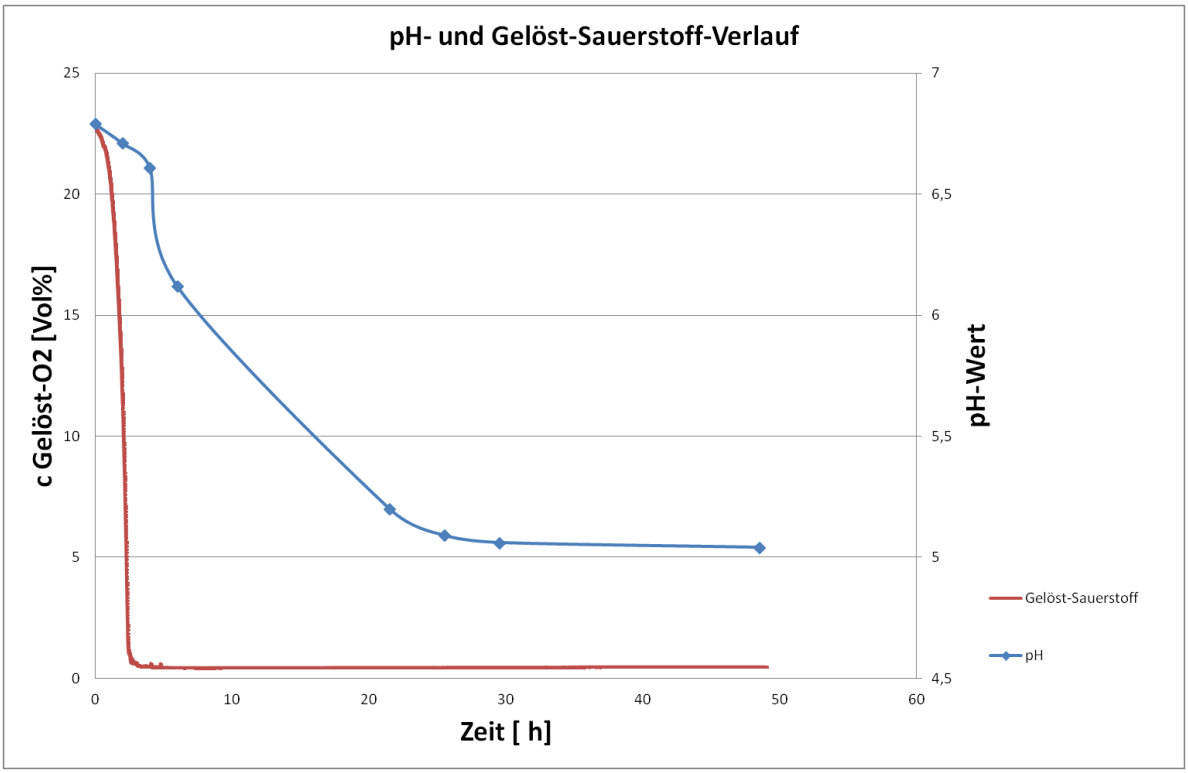


Abbildung 35: pH- und Gelöst-Sauerstoffkonzentration

Batch-Fermentationen Nr. 1 & 2 ältere Kultur

***(E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113)**

Die Fermentationen der älteren Kultur des Bakterienstamms *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113 (Abb. 31 & 33), wurden über einen Zeitraum von 50 Stunden fermentiert. Bei beiden Ansätzen wurden vergleichbare Mengen an CO_2 gemessen (Batch Nr. 1 zwischen 35-40 Vol%; Batch Nr. 2 zwischen 40-45 Vol%), bzw. O_2 verbraucht. Bei Batch Nr.1 sank der Sauerstoffwert im Abgas nur bedingt gegen einen Wert von 0 Vol% und stieg am Ende der Fermentation wieder an, was auf eine Gas-Undichtigkeit des Reaktors hindeuten könnte. In beiden Ansätzen belief sich die Messung der optischen Dichte im Bereich von unter OD 3,5. Jedoch war ein Wachstum deutlich zu erkennen. Die Glucosekonzentrationen nahmen während der Fermentation bei beiden Ansätzen ab (Abb. 32 &34). Die Summensignale des CH-Sensors zeigen bei beiden Verläufen einen Anstieg zu Beginn der Fermentation und einen weniger signifikanten Anstieg im restlichen Verlauf dieser. Dies könnte ein Hinweis auf die acidogene und solventogene Produktionsphase des Organismus sein (Vgl. Blank [4]; s. Metabolismus Abb. 1 Kap.2.1), bei dem die Bakterien ihr Substrat zunächst zu Acetat umwandeln und aus diesen dann im Anschluss Aceton produzieren. Die Beobachtung des CH-Signals (um ca. 1 Vol%) lässt vermuten, dass nur geringe Mengen an Kohlenwasserstoffen produziert wurden. Daher wurde eine neue Kultur von der TU-Dortmund für die Batch-Fermentation Nr. 3 verwendet. Der Verlauf des pH-Wertes (Abb.35) hingegen verlief, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Arbeit von Blank [4], anders als erwartet. Nach Blank [4], kommt es während der acidogenen Phase der Fermentation zu einem deutlichen Abfall des Wertes, welcher während der solventogenen Produktionsphase wieder steigen sollte. Ein Abfall des pH-Wertes war bei beiden Fermentationen zu beobachten, jedoch war dieser nicht so niedrig wie erwartet (pH-Wert von etwa 4,5) und blieb zum Ende der Fermentationen konstant auf einem pH-Wert von etwa 5.

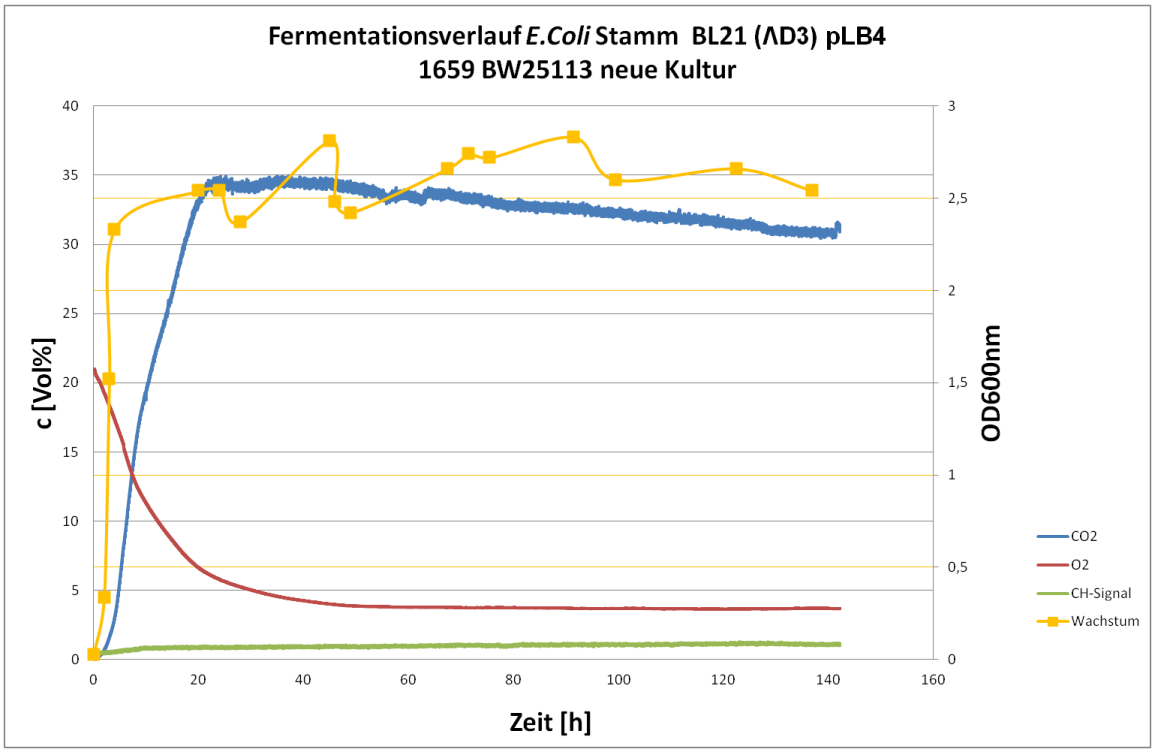


Abbildung 36: Fermentationsverlauf Batch Nr.3 Batch *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113 neue Kultur

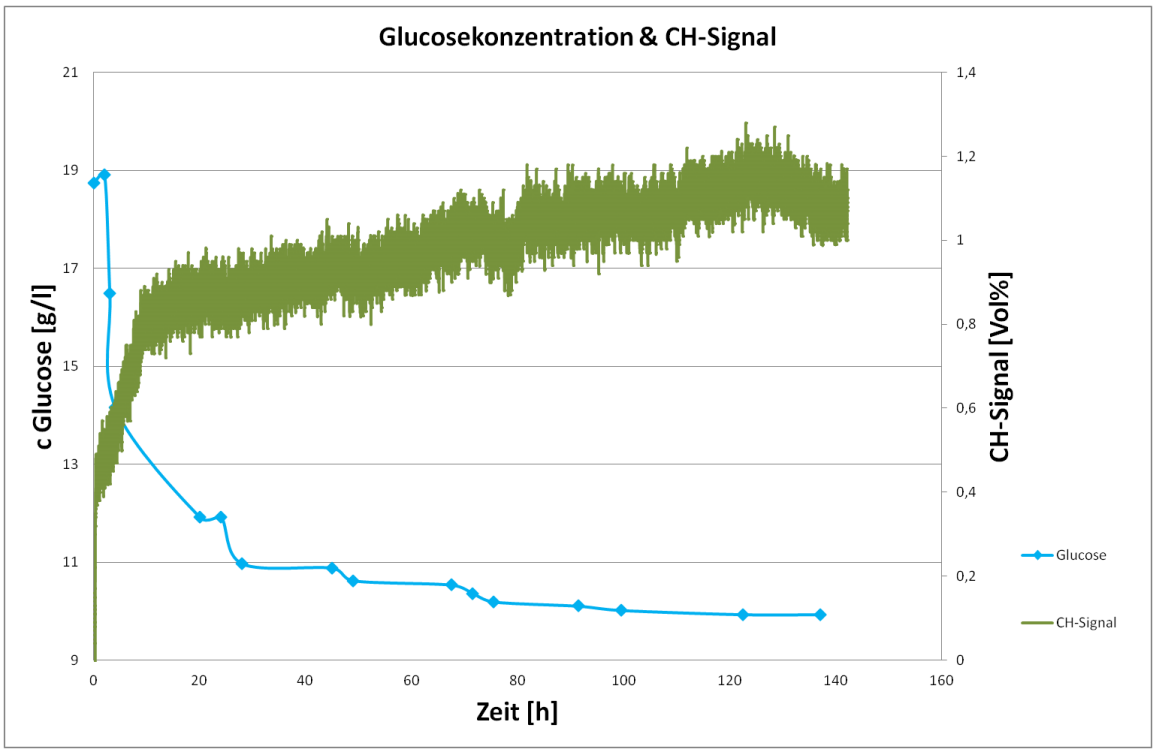


Abbildung 37: Glucosekonzentration und CH-Signal Batch Nr. 3

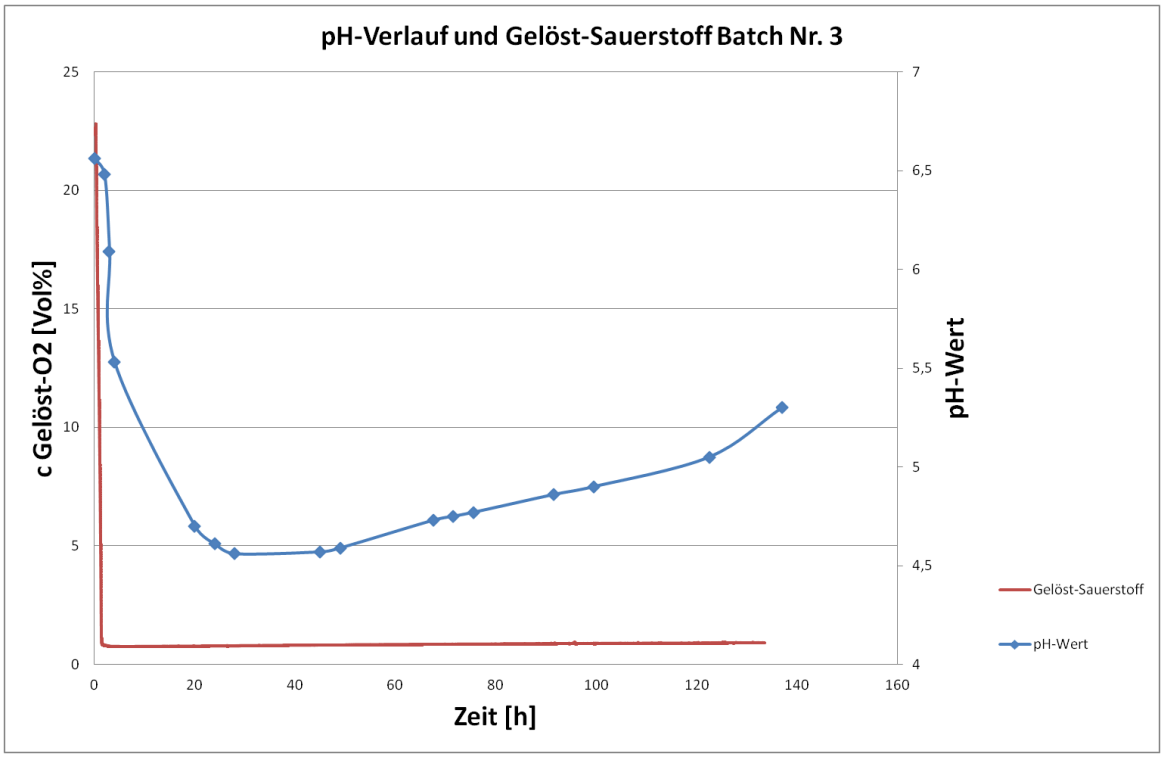


Abbildung 38: pH-Verlauf und Gelöst-Sauerstoff Batch Nr. 3

Batch Fermentation Nr. 3

neue Kultur (*E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113)

Der dritte Ansatz im Glasfermenter wurde mit einer neuen Kultur des Bakterienstammes angesetzt. Es fällt auf, dass die Kultur dieses Ansatzes eine deutlich längere Vitalität aufweist, als die Kulturen beider zuvor abgelaufenen Fermentationen (Abb. 36). Das Wachstum dieses Stammes erreicht maximale optische Dichten zwischen OD 2,5 und OD 2,8 und unterscheidet sich somit nicht signifikant von den Ansätzen mit der älteren Kultur. Die Produktion von CO_2 ist vergleichbar mit der des Ansatzes Nr.1 der älteren Kultur. Auch die Sauerstoffabnahme hat eine deutliche Ähnlichkeit zu Ansatz Nr.1, bei der ein Restanteil des Sauerstoffes in der Gasphase des Reaktors verblieb. Der Verlauf der Glucosekonzentration (Abb. 37) zeigt hierbei erneut, dass der Organismus den Zucker zu Beginn der Fermentation stärker verbraucht, als in der restlichen Fermentationszeit. In Abbildung 38 erkennt man deutlich, den für den Organismus in der Arbeit von Blank [4] beschriebenen pH-Verlauf. Dieser sinkt in der acidogenen Phase stark auf einen Wert von pH 4,5. In der solventogenen Phase hingegen steigt er auf einen Wert von pH 5,3 mit steigender Tendenz.

Das Signal des CH-Sensors lässt vermuten, dass dieser Stamm unter den gegebenen Reaktionsbedingungen geringfügig höhere Kohlenwasserstoff-Konzentrationen produziert. Die maximal erreichten CH-Signale liegen insgesamt zwischen Werten von 1,1 -1,2 Vol % und erreichen damit zwar eine höhere Konzentration als die vorherigen Ansätze (Nr. 1 & Nr. 2), stellen jedoch keine signifikante Steigerung gegenüber diesen dar.

Gelöst-Sauerstoff

Die Werte des Gelöst-Sauerstoffes (Abb. 35 & 38). verlaufen bei allen drei Batch-Ansätzen im Glasfermenter nahezu identisch. Dieser sinkt zu Beginn der Fermentation rapide ab und bleibt konstant auf einem minimalen Niveau. Dieser Verlauf wurde schon bei den Fermentationen von *S.cerevisiae* (s. Kap. 4.3.1) beobachtet, und lässt darauf schließen, dass die fakultativ anaeroben Organismen den Sauerstoff in Lösung direkt verwerten.

Aufgrund der niedrigen Produktion von Kohlenwasserstoffen im Großen Reaktor lässt sich vermuten, dass dieser Umstand mit dem Übertrag vom kleinen auf den Großen Maßstab zusammenhängen könnte [5].

4.4.3 Batch Ansatz im gerührten Schüttelkolben

4.4.3.1 Durchführung

Die Vorgehensweise im gerührten Schüttelkolben unterscheidet sich vom Glasfermenter im Aufbau und in der Menge der Zugaben des Mediums, Antibiotikums und der Menge des Inokulums. Die Kolben werden vor Beimpfung mit dem Organismus steril mit 300 ml SD-8 Medium befüllt und mit 300 µl Carbenicillin-Stock Solution versehen. Aus der Vorkultur werden 2 ml Inokulum in den Reaktor überführt. Dieser wird vor der Zugabe des Organismus mit CO_2 und CH Sensoren versehen, in einen mit Wasser gefüllten Behälter gestellt und mit PVC-Schläuchen, welche an den Kryostaten angeschlossen sind, umwickelt (s. Abb. 9; Kap. 2.5). Dies ist nötig, um die Kolben auf eine Temperatur von 37°C zu bringen, da diese nicht über eine Doppelwand verfügen. Zudem wird aus apparativen Gründen, nur einer der Reaktoren mit einem pH-Sensor bestückt. Der pH-Wert des zweiten Reaktors wird mit pH-Messstäbchen kontrolliert.

Auf einen Einsatz des Gelöst-Sauerstoff-Sensors wird in diesem Versuch ebenfalls aufgrund fehlender Anschlussmöglichkeiten verzichtet. Alle anderen Schritte entsprechen denen des Batch Ansatzes im Glasfermenter (s. Kap. 4.4.2.1).

4.4.3.2 Ergebnisse & Diskussion

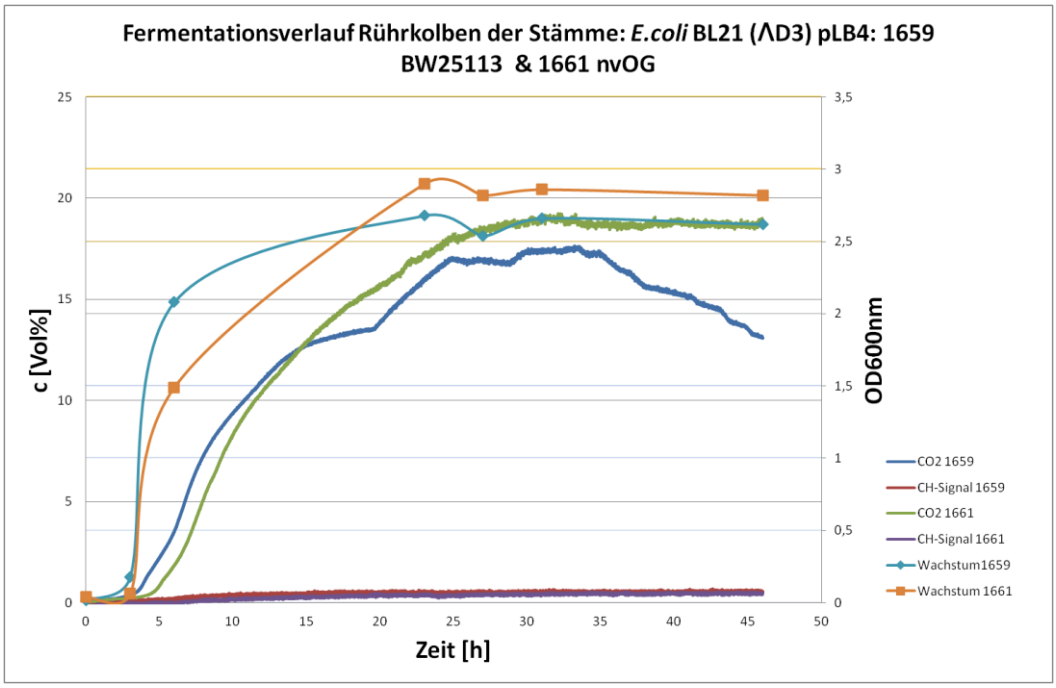


Abbildung 39: Rührkolbenversuch der Stämme *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4: 1659 *E. coli* BW 25113 & pLB4 & 1661 *E.coli* nvOG pLB4 (neue Kulturen)

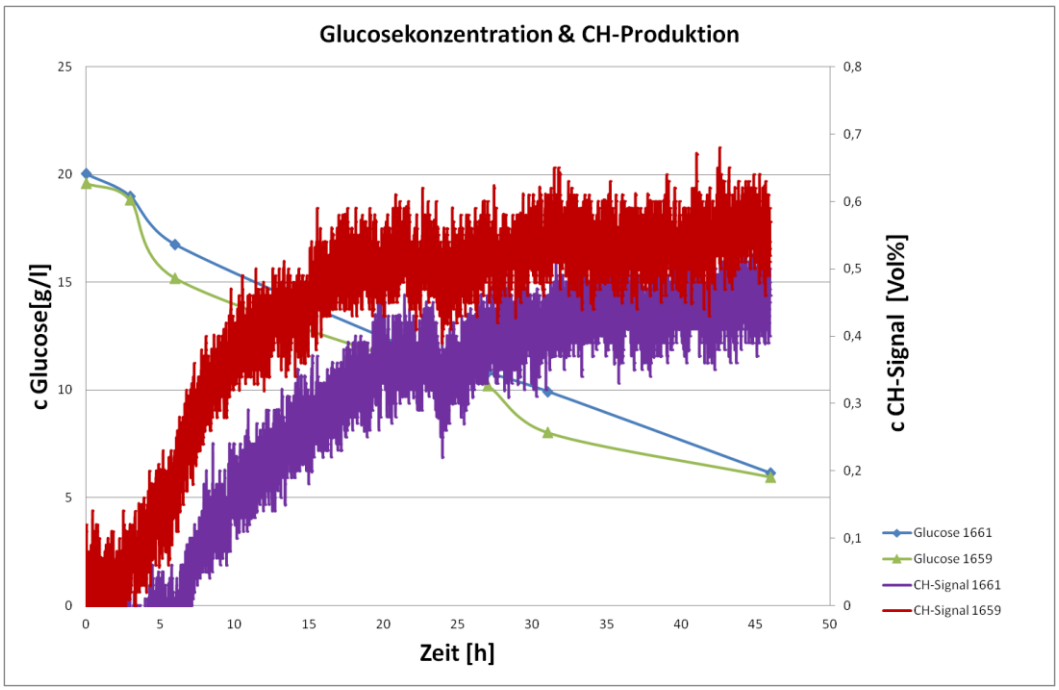


Abbildung 40: Glucosekonzentration und CH-Signal

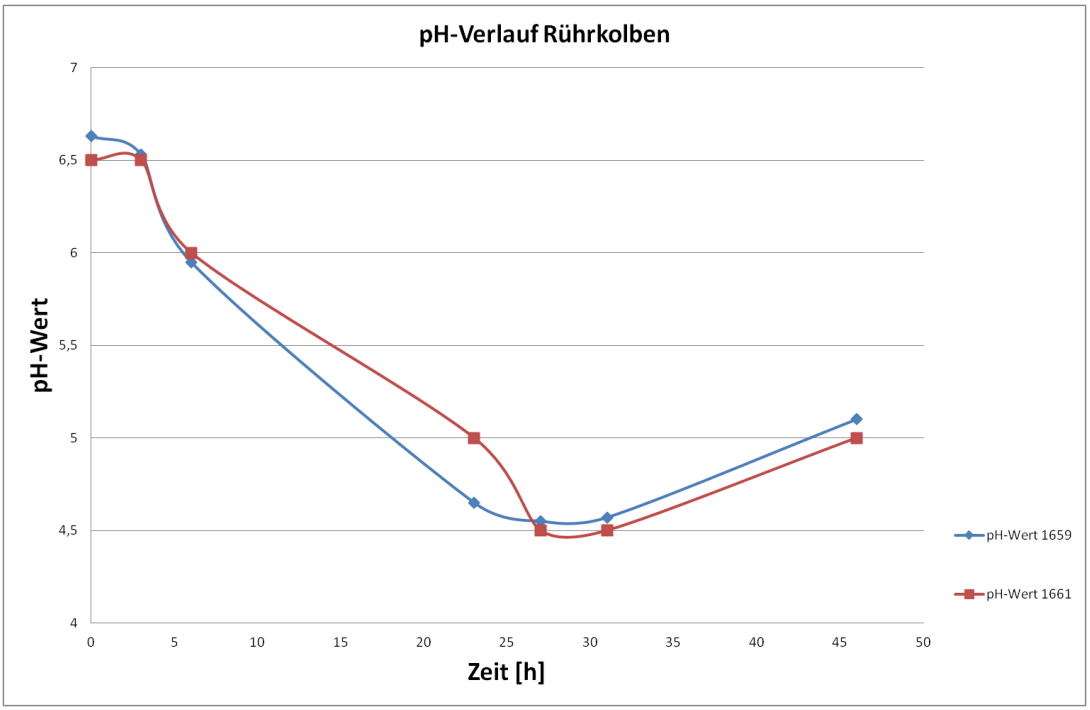


Abbildung 41: pH-Verlauf Rührkolbenversuch

Durch den Rührkolbenversuch sollte herausgestellt werden, ob die relativ geringe Produktion von Kohlenwasserstoffen mit der Größe des Reaktionsgefäßes im Zusammenhang steht. Hierbei wurde durch die Möglichkeit zwei Ansätze parallel zu fahren, zusätzlich zum ersten Stamm (*E.coli* 1659 BW25113 pLB4), auch der zweite Stamm der neuen Kultur (1661 E.coli nvOG pLB4), kultiviert. Die Fermentationen verliefen weitestgehend ähnlich (Abb. 39). Der Stamm 1659 hingegen konnte minimal höhere Werte in CO_2 Produktion erzielen. Jedoch lagen diese deutlich unter denen der vorrausgehenden Ansätze im Glasfermenter. Zudem wies der CO_2 Verlauf des Stammes 1661 einige Unebenheiten auf (Abb. 39), was möglicherweise auf die nicht zu 100% genaue Temperierung der Kolben zurückzuführen sein könnte. Diese wurde lediglich durch einen mit dem Kryostaten verbundenen, in ein Wasserbad getauchten PVC-Schlauch, gewährleistet. Der Verlauf des pH-Wertes (Abb. 41) zeigt hier wieder den für den rekombinanten *E.coli*-Stamm charakteristischen Verlauf (Blank [4]) bei beiden Stämmen und sinkt zu Beginn der Fermentation rapide, bis auf pH-Werte von etwa 4,5, um im späteren Verlauf der Fermentation wieder zu steigen. Beide Organismen verbrauchten zudem deutlich mehr Zucker, als die Ansätze im großen Maßstab (Abb. 40).

Es wurden Werte für die optische Dichte, ähnlich zu denen des größeren Ansatzes (Batch-Ansatz im Glasfermenter Nr. 1-3), von OD 2,5 erzielt. Eine verbesserte Produktion von Kohlenwasserstoffen blieb, bezogen auf die gemessenen CH-Signale (0,4 Vol% und 0,6 Vol%), dennoch aus. Zur Überprüfung einer gesteigerten Produktion von Kohlenwasserstoffen, während einer Kultivierung im geschüttelten Reaktor, wurde abschließend ein Ansatz beider Stämme in temperierten Schüttelkolben durchgeführt.

4.4.4 Batch Ansatz im Schüttelkolben

4.4.4.1 Durchführung

Der Ansatz der Fermentation im Schüttelkolben kann direkt mit dem Aufbau des Reaktors und den Prozessbedingungen des vorrangegangenen Rührkolben-Versuches, verglichen werden (s. Kap 4.4.3.1). Die Reaktoren werden hierbei über eine Heizhaube bei 37°C temperiert und bei 200 rpm geschüttelt statt gerührt. Ebenfalls wird auf die Installation einer pH-Elektrode verzichtet (da diese während des Schüttelns beschädigt werden könnte). Der pH-Wert wurde mittels pH-Messstäbchen bestimmt.

4.4.4.2 Ergebnisse & Diskussion

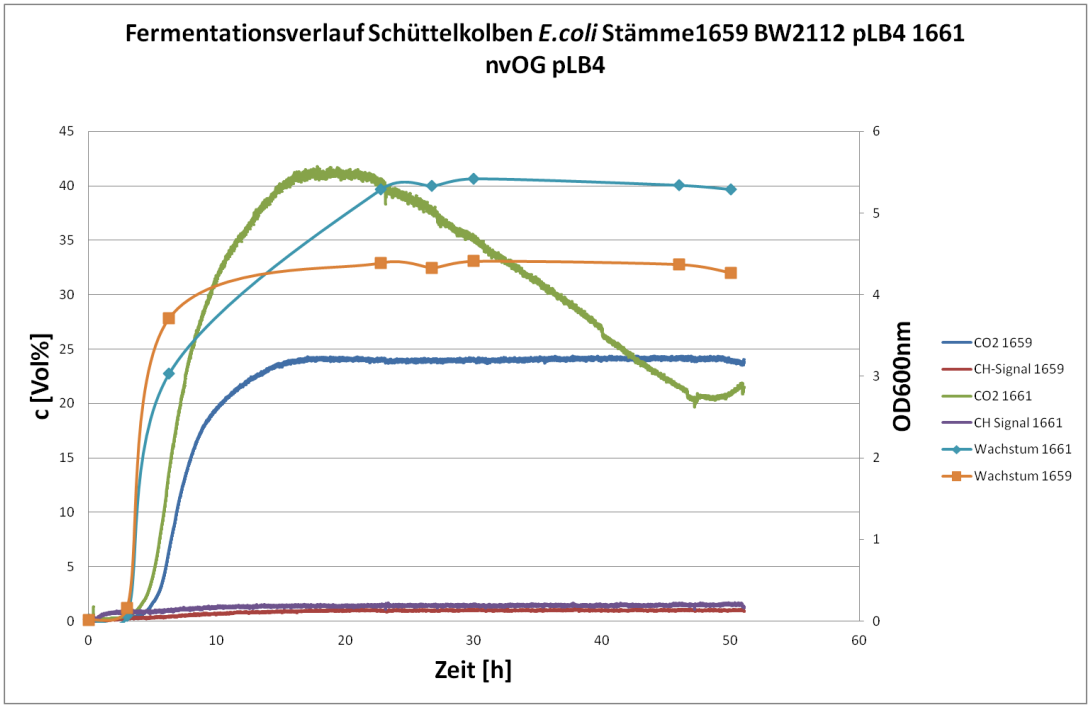


Abbildung 42: Fermentationsverlauf im Schüttelkolben der Stämme *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4: 1659 *E. coli* BW 25113 & pLB4 & 1661 *E.coli* nvOG pLB4 (neue Kulturen)

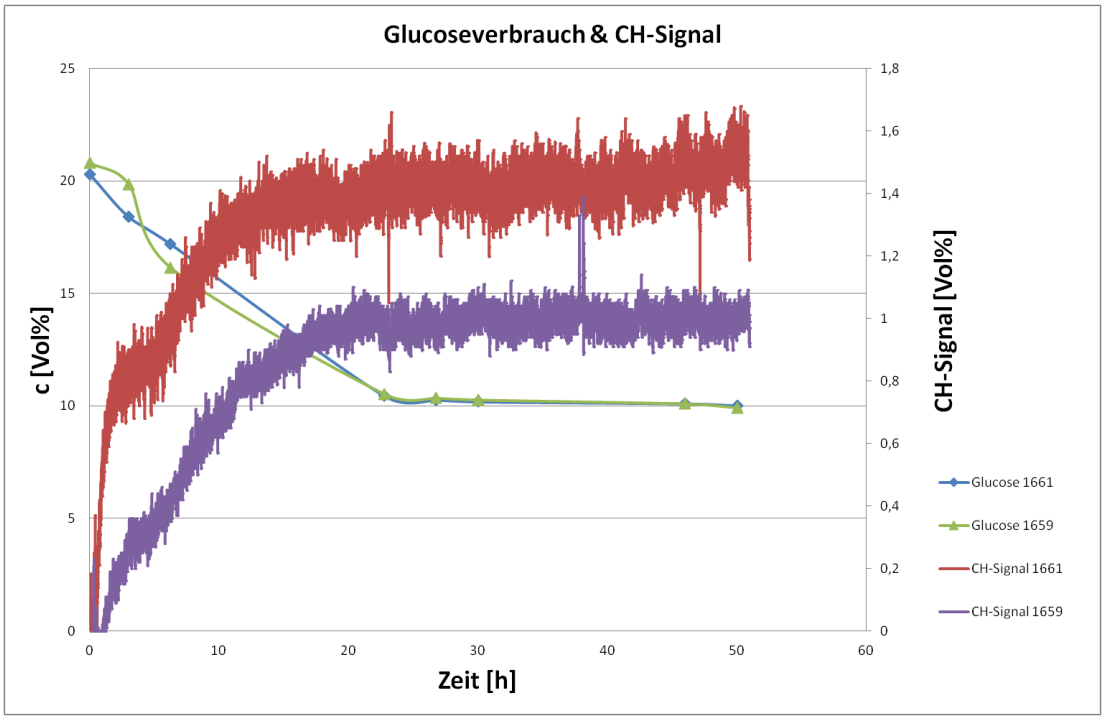


Abbildung 43: Glucosekonzentration und CH-Signal Schüttelkolben-Ansatz

Die Fermentationen im Schüttelkolben (Abb. 42) unterschieden sich deutlich von denen im Glasfermenter (s. Kap. 4.4.2). Der zweite Stamm (*E.coli* 1661 nvOG pLB4) erzielte eine wesentlich höhere CO_2- und CH- Produktion als der erste Stamm (*E.coli* 1659 BW25113 pLB4) im Rührreaktor. Auch beim Wachstum wurden deutlich höhere Werte erzielt, im Gegensatz zu den Ansätzen im Glasfermenter. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Produktion im geschüttelten System eine größere Menge an Produkt erzielen konnte als im großen Rührreaktor. Diese Annahme bestätigte sich auch im Hinblick auf die entnommenen Proben, welche mittels HPLC analysiert wurden. Der erste genutzte Stamm (*E.coli* 1659 BW25113 pLB4) zeigt bei diesem Versuch anhand des gemessenen CH-Signals (Abb. 43), einen ähnlichen Verlauf wie im großen Ansatz. Die HPLC-Analytik verdeutlicht jedoch, dass bei beiden Stämmen mehr Aceton gebildet werden konnte. Ein erfolgreicher Übertrag von einem kleineren auf einen größeren Ansatz (Scale up) hängt von vielen Faktoren ab. Dabei können schon kleinste Abweichungen der Prozessbedingungen zu deutlich anderen Ergebnissen führen [5]. Die pH-Verläufe wurden in diesem Ansatz mit pH-Messstäbchen durchgeführt. Die Verläufe zeigten, dass gleiche Muster wie im Rührkolbenversuch (s. Kap. 4.4.3) und sanken zu Beginn der Fermentation von einem relativ neutralen pH-Wert von 6,5 auf einen pH-Wert von etwa 4,5.

Zum Ende der Fermentation stiegen diese wieder an und erreichten pH-Werte von etwa 5,5. Aufgrund des gleichen Verhaltens und der damit entstehenden Redundanz dieser Werte wurde der Verlauf hier nicht nochmals graphisch aufgetragen.

4.5 Ergebnisse der HPLC Auswertung aller Fermentationen mit *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4

4.5.1 Ergebnisse & Diskussion

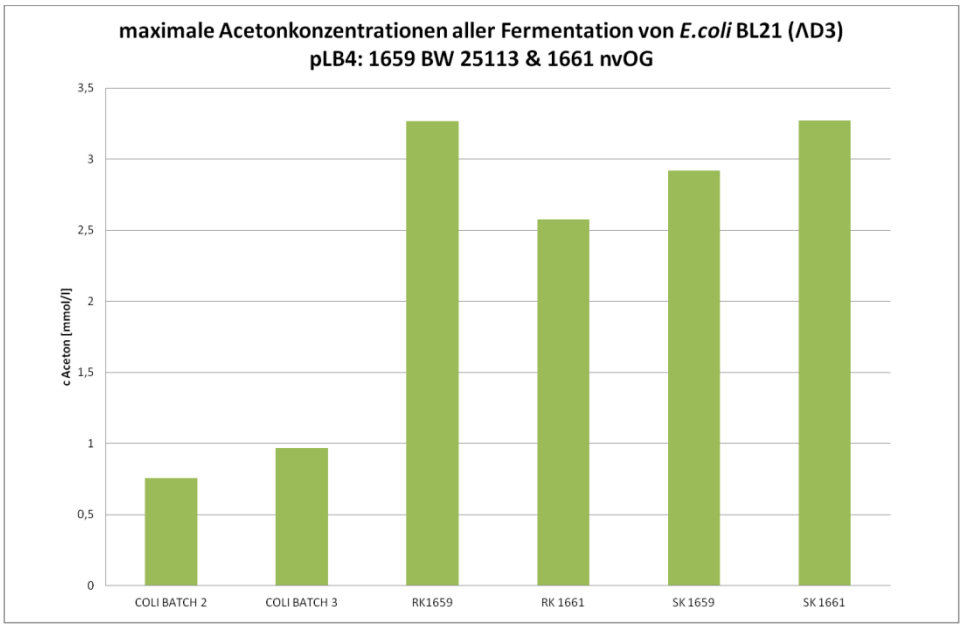


Abbildung 44: maximale Acetonkonzentrationen aller Fermentationen mit *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4

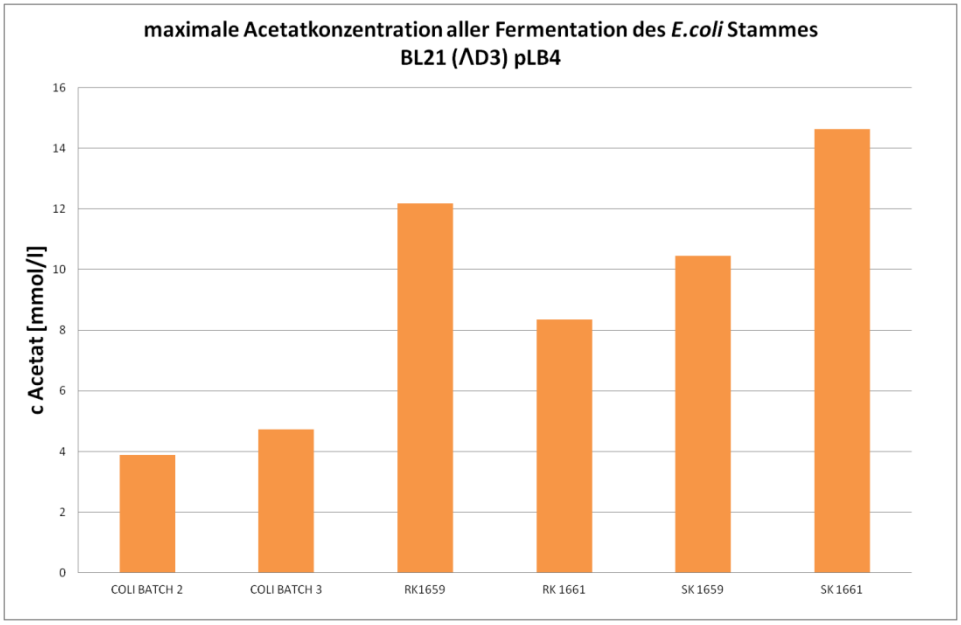


Abbildung 45: maximale Acetatkonzentration aller Fermentationen mit *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4

Die Analyse der entnommenen HPLC Proben zeigt, dass zwar Aceton und vor allem Acetat gebildet wurde, die Menge des Acetons jedoch weitaus niedriger war als die von Blank [4] erzielten Ergebnisse. Die maximalen Konzentrationen (Abb. 44 & 45) wurden im Rührkolben mit dem Stamm *E.coli* BL21(ΛD3) pLB4 1659 BW25113 mit einer maximalen Acetonkonzentration von 3,2657 mmol/l und einer Acetatkonzentration von 12,1797 mmol/l erzielt. Im Schüttelkolben-Ansatz wurde ein maximaler Wert vom Stamm *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4 1661 nvOG mit einer Acetonkonzentration von 3,2702 mmol/l und einer Acetatkonzentration von 10,4596 mmol/l erreicht. Unter Zunahme der Tatsache, dass Aceton ein sehr flüchtiger Stoff ist und durch die Probenumfüllung in Glasvials für die HPLC-Analytik, ein Teil des Stoffes verloren gegangen sein könnte, sind die hiermit ermittelten Werte jedoch so gering, dass Sie nicht mit den erreichten Werten von Blank [4] verglichen werden können. Dieses Ergebnis war angesichts des geringen CH-Signals möglicherweise schon zu erwarten. Trotz allem kann man auch hier deutlich erkennen, dass im kleineren Ansatz (wenn auch nur geringfügig) bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Diese Tatsache könnte mit der schon zuvor erwähnten Problematik des Scale up zusammenhängen [5]. Die Acetatmengen sind hierbei in allen Ansätzen, im Gegensatz zur gebildeten Acetonmenge, relativ hoch. Das könnte darauf hindeuten, dass der Organismus diese nicht erfolgreich in Aceton umwandeln konnte (s. Stoffwechsel Abb. 1, Kap.2.1).

5. Zusammenfassung, Ausblick & Fehlerbetrachtung

5.1 Zusammenfassung

Die Zusammenfassung gliedert sich in drei Unterpunkte, welche die drei Hauptversuchsthemen abschließend beschreiben

Charakterisierung der Stoffübergänge mittels Natriumsulfitmethode

Die Charakterisierung der Stoffübergänge verlief innerhalb dieser Versuchsreihe erfolgreich. Alle getesteten Parameter konnten bestimmt werden. Die für die Fermentationen gewählten Werte, waren allerdings nicht optimal und mussten unter dem Aspekt der Nutzung der Inline-Messtechnik, an die Gegebenheiten angepasst werden.

Fermentation von *S.cerevisiae*

Die Fermentationen der Hefe S.cerevisiae verliefen, bezogen auf eine gesteigerte Ethanolbildung im Rahmen einer Prozessoptimierung, sehr erfolgreich. Die vorrausgehende Beobachtung des Organismus auf sein Verhalten auf die Prozessbedingungen, ließ eine gute Vorrausplanung für eine Prozessoptimierung zu. Diese konnte dank der ermittelten Ergebnisse der Batch-Ansätze umgesetzt werden, wodurch eine deutliche Steigerung der Ethanolproduktion (Faktor 4) erzielt werden konnte. Einzig Fedbatch-Fermentation Nr. 3, bei der eine Vergrößerung der Zelldichte zu einer weiteren Erhöhung der Ethanolproduktion, brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Versuche mit rekombinanten *E.coli* Stämmen

Die Versuche der rekombinanten *E.coli* Stämme konnten nicht an den Literaturwerten (Arbeit Blank [4]) anknüpfen. Durch die lange Kultivierungszeit und die geringe Produktion an Aceton, konnten in dem vorgegebenen Zeitraum weder eine Fedbatch-Fermentation, noch ein kontinuierlicher Fermentationsansatz durchgeführt werden. Der Vergleich der Ansätze im Glasfermenter, mit denen im Schüttelkolben ergab jedoch Grund zur Annahme, dass das Verhalten des Organismus mit dem Scale up zusammenhängen könnte [5]. Weiterhin ist zu bemerken, dass der CH-Abgassensor eine gute Option zur Überprüfung einer Kohlenwasserstoffbildung ist. Eine quantitative Aussage über die einzelnen Mengen der gebildeten CH-Verbindungen zu fällen, ist mit diesem allerdings bisher noch nicht möglich. Der Sensor zeigt lediglich, dass sich Kohlenwasserstoffe gebildet haben, unterscheidet allerdings nicht, welcher Stoff in welcher Menge produziert wurde. Für Fermentationen, bei denen nur ein signifikanter Kohlenwasserstoff gebildet wird (wie z.B. Hefe/Ethanolbildung), ist der Sensor dennoch eine sehr gute Möglichkeit, um eine quantitative Aussage zu treffen. Fermentationen, bei denen hingegen viele unterschiedliche CH-Verbindungen produziert werden, kann er nur zur Messung von Summenparametern eingesetzt werden. Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass der Sensor ursprünglich nicht für die Messung von Aceton, sondern für die Messung von Ethanol entwickelt und optimiert wurde.

5.2 Ausblick

In weiteren Versuchsreihen, sollte ein noch besserer Stoffübergang des Sauerstoffes von der Gas- in die Flüssigphase verwirklicht werden. Dies ließe sich möglicherweise mit längeren Inline-Messonden oder einem Reaktor erzielen, dessen Anschluss für die Inline-Messtechnik etwas niedriger positioniert ist. Somit wären eine verminderte Befüllung und dadurch die Möglichkeit eines optimierten Stoffübertrags von Gas- in Flüssigphase für Fermentationen möglich.

Den Fermentationsansätzen mit *Saccharomyces cerevisiae* könnte man, zellstabilisierende Spurenelementzusätze wie z.B. Magnesium oder Calcium hinzufügen. Das könnte Produktinhibierung durch Ethanol verringern. Eine weitere Möglichkeit wäre es, optimierte Hefen für die Produktion von hohen Ethanolmengen zu nutzen. Diese werden in der Getränkeindustrie bereits erfolgreich für eine höhere Ethanolbildung eingesetzt. Eine zusätzliche Möglichkeit der Prozessverbesserung wäre es, einen kontinuierlichen Ansatz durchzuführen. Dadurch wäre es ggf. ebenso möglich, einer eventuellen Produktinhibierung durch das gebildete Ethanol entgegenzuwirken und möglicherweise die Gesamtmenge des gebildeten Ethanols weiter zu steigern.

Bei den Fermentationen rekombinanter *E.coli* Stämme, welche für die Produktion hoher Acetonmengen geplant wurden [3 & 4], ist zu bestimmen, wie man den erfolgreichen Ansatz im Schüttelkolben auf einen größeren Ansatz übertragen kann. Weiterhin könnte man mit Hilfe des metabolic engineering versuchen, die Bakterienstämme weiterhin zu optimieren, um eine gesteigerte Umsetzung des gebildeten Acetats zu Aceton zu induzieren.

Desweiteren besteht die Möglichkeit die Probenentnahme zu verbessern, so dass ein Konzentrationsverlust flüchtiger Verbindungen (z.B. Aceton, Ethanol) minimiert wird, um somit eine noch genauere Analytik zu erreichen.

Abschließend ist zu erwähnen, dass der genutzte CH-Abgassensor eine gute Möglichkeit darstellt, die Ethanolkonzentration im Abgas zu detektieren und zu quantifizieren. Eine Entwicklung und Optimierung für die Messung von Aceton ist ebenfalls möglich und kann in Zukunft umgesetzt werden.

5.3 Fehlerbetrachtung

Im Folgenden sind alle Fehlerquellen und die maximal erreichten Werte der CH-Signale mit den dazu passenden Sensorabweichungen aufgelistet:

Tabelle 20: Abweichungen Messzylinder, Waagen, Abgassensoren

Fehlerquellen				
Messzylinder		**Waagen**		**Abgassensoren Blue Sens**
Volumen	Abweichung	Typ	Abweichung	Abweichung
50 ml	+ - 1 ml	Kern PCB	d= 0,1 g	Messwert: + - 3%
100 ml	+ - 1 ml	MT PL 3001-S	d= 0,1 g	Messbereichsendwert: +- 0,2 %
250 ml	+ - 1 ml	MT AL 204	d= 0,1 mg	
500 ml	+ - 5 ml			
1000 ml	+ - 10 ml			

Tabelle 21: Abweichungen Photometer [1]

Photometer	
Art	Abweichung
Wellenlängengenauigkeit	+ - 2nm
Wellenlängen-reproduzierbarkeit	+ - 0,5 nm
Photometrische Linearität	± 0.5% oder ± 0.005A bis 2.000A bei 546 nm
Stabilität	± 0.002A/h at 0A nach Aufheizen
Rauschen	± 0.001A nahe 0A und ± 0.002A nahe 2A bei 600 nm

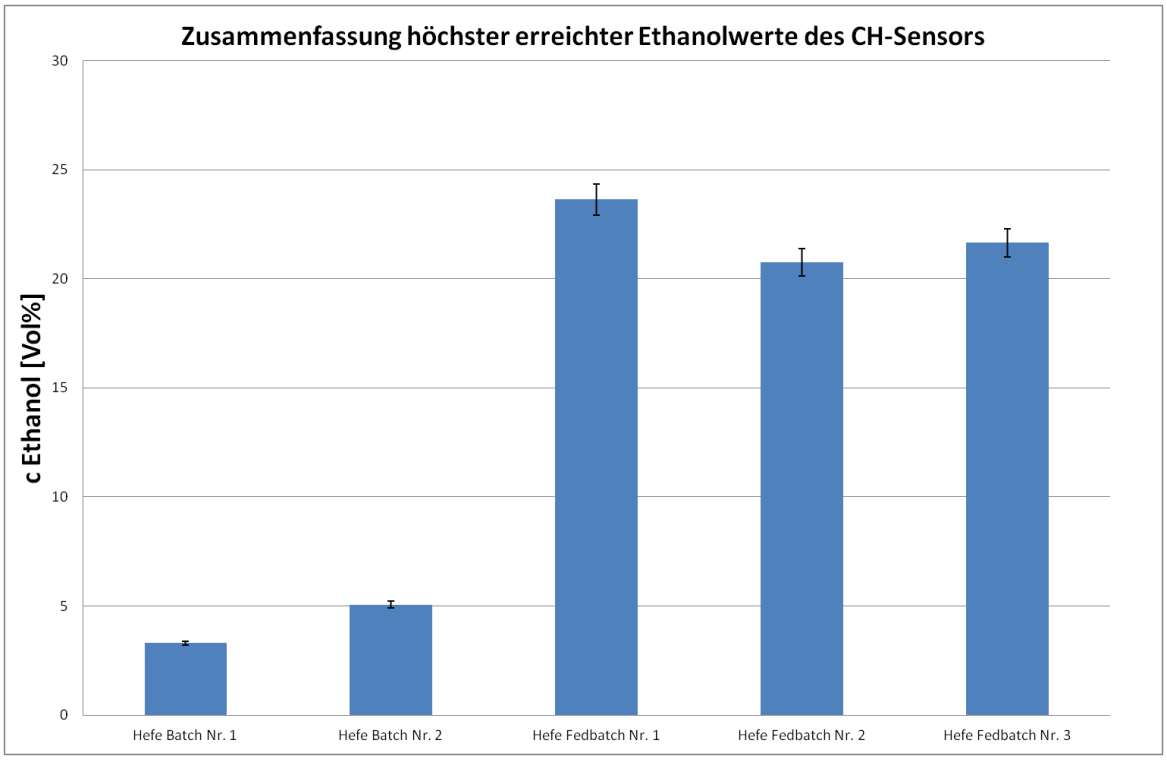


Abbildung 46: Hefe Batch & Fedbatch: maximal erreichte Ethanolwerte mit Abweichung der CH-Sensoren

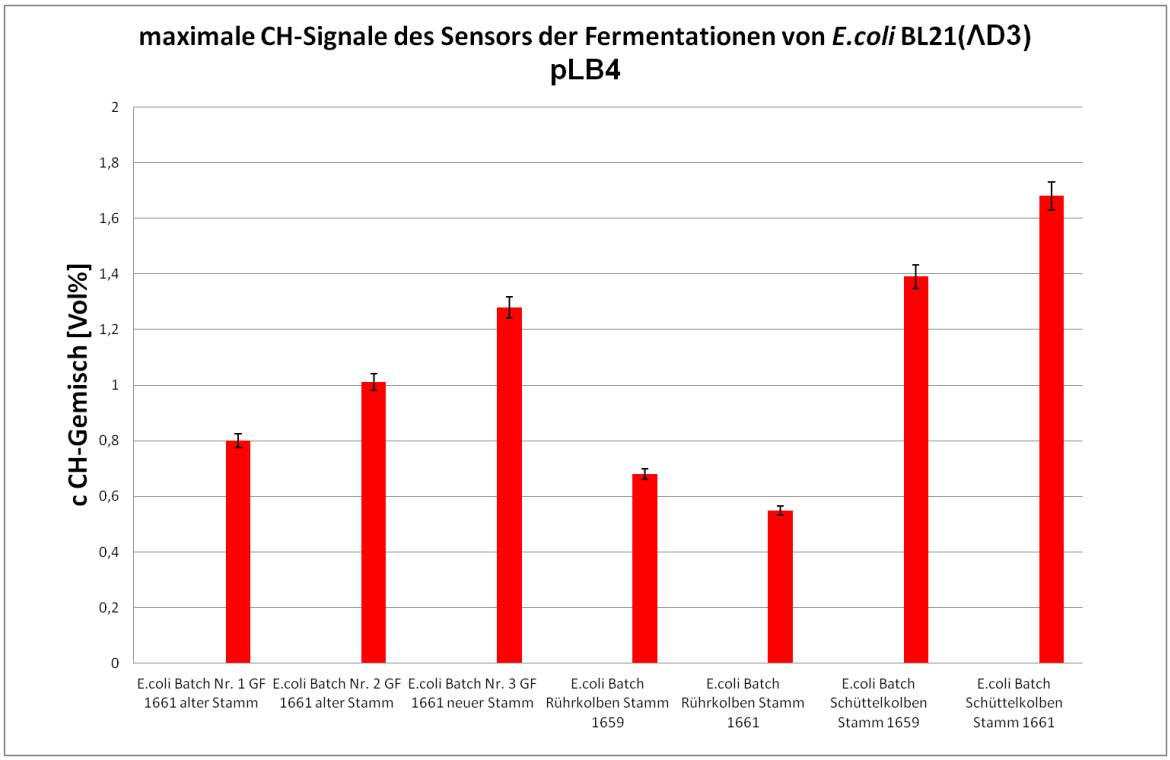


Abbildung 47: maximale CH-Sammelsignale mit Sensorabweichung aller Fermentationen mit *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4: 1659 *E. coli* BW 25113 (ältere und neue Kultur) & pLB4 & 1661 *E.coli* nvOG pLB 4

Die Abweichungen der Messzylinder und der Waagen (Tabelle 20) beeinflussen hauptsächlich die Herstellung der Lösungen und Medien. Sie beeinträchtigen die Messung, bei einer gründlichen Arbeitsweise, nur geringfügig und sind daher als nicht signifikante Abweichungen zu werten. Die Abweichungen der Sensorik und des Photometers hingegen (Tabellen 20 & 21), beeinflussen die Ergebnisse der Messungen und sind als signifikante Fehlerquellen zu nennen. Somit entstehen zwar Abweichungen in der Messung, diese sind jedoch bekannt und können berücksichtigt und mit in die Auswertung einbezogen werden. Dadurch wir es ermöglicht, eine präzise Einschätzung der erhaltenen Messdaten zu treffen. Die Abbildungen 46 & 47 zeigen die maximal erreichten Werte des CH-Signals, bei allen durchgeführten Fermentationsversuchen. Durch das Rauschen dieses Sensorsignals, kann es zu Abweichungen von bis zu 3% kommen, welche als Fehlerbalken in die Grafik eingezeichnet wurden. Weitere Abweichungen, welche die Messung und Auswertung der erhaltenen Ergebnisse beeinflussen, ergeben sich durch das Photometer (Tabelle 21). Dieses kann bei fehlerhafter Bedienung, zu falschen Messergebnissen führen (beispielsweise bei einer zu kurzen Aufwärmphase der Lampe). Weitere Abweichungen können, generell bei photometrischen Messungen, durch Verdünnungen der Proben entstehen. Hierbei steigt der Fehlerwert proportional zur steigenden Verdünnung. Von dieser Problematik sind auch die enzymatischen Test-Kits betroffen. Diese können jedoch mit Standards verglichen werden, um die entsprechende Abweichung zu ermitteln (s. Kap 4.3.2.2 Fedbatch Fermentation Nr. 1) und in das Ergebnis der Messung mit einzubeziehen.

6. Literaturverzeichnis

[1] Amersham Biosciences, Datenblatt: Ultrospec 1100 pro, UV/VIS Spectrophotometer

[2] Bast, E., (2001) Mikrobiologische Methoden, Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

[3] Bermejo et. al., (1998) Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Genes in *Escherichia coli* for Acetone Production and Acetate Detoxification, applied and enviromental Microbiology Mar. 1998, p. 1079–1085 , Vol. 64, No. 3

[4] Blank, L., (1997) Molekularbiologische und fermentative Charakterisierung eines rekombinaten Stammes von *C. acetobutylicum* zur Optimierung der Stoffwechselwege, Diplomarbeit

[5] Chmiel, H., (2006) Bioprozesstechnik, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

[6] Fuchs, G., Schlegel, H. (2007) Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage, Thieme Verlag

[7] Haas. C., Pförtner. R., (2011) Praxis der Bioprozesstechnik, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

[8] Hamilton Bonaduz AG, Datenblatt : Visiferm™DO - Inteligent Optical Dissolved Oxygen Sensors

[9] Honzel, M. (2011), Entwicklung und Evaluierung verschiedener Methoden zur Ermittling des Methanolgehaltes in Fermentationsprozessen, Bachelorarbeit

[10] Latscha H.P., Kazmaier, U., Klein H.A. (2005) Chemie für Biologen, 2. Auflage, Springer Verlag

[11] Lederle, Simone M. (2010) Heterofermentative Acetonproduktion, Dissertation

[12] Leuchtenberger, A. (1998)Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie, B.G. Teubner Stuttgart Leipzig, 1.Auflage

[13] Luli, G.W. and W. R. Strohl. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* Strains in batch and fed-batch fermentations. Appl.Environ.Microbiol. 56(4): 1004-1011

[14] Meredos, Bedienungsanleitung pHC pH-Regeleinrichtung

[15] Mettler Toledo, Betriebsanleitung des Sauerstoffsensors MT InPro6800

[16] Meyer, Veronika R. (2009) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 10. Auflage, Wiley-VCH

[17] Mortimer, C.E., Müller, U., (2003) Chemie, Das Basiswissen der Chemie, 8. Auflage, Springer Verlag

[18] Renneberg, R. (2007) Biotechnologie für Einsteiger, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

[19] Roche Diagnostics Ethanol UV-Test (Best Nr.: 10 176 290 035), Bedienungsanleitung

[20] Roche Diagnostcs Glucose UV-Test (Best. Nr. 10 716 251 035) Bedienungsanleitung

Interne Veröffentlichungen der Firma Blue Sens Gas Sensor GmbH
und der AG Bioprozesstechnik:
Verfügbar unter: http://www.apz-rl.de/002_download/index_bluelab_down.htm

[21] SOP_001_KLa
[22] SOP_003_Komplexmedium_001
[23] SOP_022_Praktikum_Glasfermenter
[24] SOP_023_LB-Medium
[25] SOP_024_SD-8-Medium
[26] SOP_006_Begasung
[27] SOP_018_Glukose
[28] 003_Bedienung_CO2
[29] 004_Bedienung_EtOH
[30] 006_Bedienung_O2ec
[31] 009_Bedienung_BACVis
[32] 016_Kalkulationshilfen_OTR/CTR/RQ

7. Abkürzungsverzeichnis

ABE	Aceton Butanol Ethanol
ace 4	synthetisches Acetonoperon
adc	Acetoacetat Decarboxylase Gen
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest, Wasser	Reinstwasser (doppelt destilliert)
C. acetobutylicum	Clostridium acetobutylicum
CH	Kohlenwasserstoff
CTR	Carbon transferrate
ctfAB	Aldehyd/Alkohol Dehydrogenase gen
E.coli	Escherichia coli
g	Gramm
G-6-P	D-Glucose-6-phosphat
Glc	Glucose
HPLC	High Performance Liquid Chromatopgraphy
kBp	kilo Basenpaare
K_La	volumetrischer Sauerstofftransferkoeffizient
LB	Luria Bertani
LED	Lichtemittierende Diode
M	molar
m^3	Kubikmeter
ml	Milliliter
mmol	Millimol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte bei 600 nm
OTR	Oxygen transferrate
PTFE	polytetrafluoroethylen (Teflon)
PVC	Polyvinylchlorid
rpm	revolutions per Minute
RQ	Respirationsquotient
S.cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
thl	Thiolase Gen
™	Trade Mark
Vol%	Volumenprozent
µl	Mikroliter

8. Abbildungs und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Stoffwechselweg von *C.acetobutylicum* 10
Abbildung 2: Glasfermenter 11
Abbildung 3 : Messprinzip der CO_2- & CH- Sensoren 13
Abbildung 4: schematischer Aufbau von pH- Messkette und pH-Einstabmesskette in einer Glaselektrode 15
Abbildung 5 : Aufbau üblicher Photozellen gegenüber der des Sensors Visiferm™ DO 17
Abbildung 6 : dynamic luminescence quenching 18
Abbildung 7: Intensitätskurve des angeregten blauen und des abstrahlenden roten Lichts 18
Abbildung 8: pH-Mess-& Steuergerät Meredos 23
Abbildung 9: beispielhafter Verlauf einer K_La-Messung 28
Abbildung 10: Versuchsaufbau Charakterisierung der Stoffübergänge 32
Abbildung 11: Versuchsaufbau Glasfermenter Versuche 32
Abbildung 12: Versuchsaufbau Rührkolbenversuch 33
Abbildung 13: Versuchsaufbau Schüttelkolbenversuch 33
Abbildung 14: Stoffübergänge Sauerstoff von der Gasphase in Flüssigphase 34
Abbildung 15: Verlauf optischer- und amperometrischer-Sauerstoffsensor 36
Abbildung 16: Batch-Fermentation von *S.cerevisiae* bei einer Glucosekonzentration von 20 g/l 39
Abbildung 17: Glucosekonzentration und Ethanolbildung Hefe-Batch 20 g/l Glucose 39
Abbildung 18: Batch-Fermentation von *S.cerevisiae* bei einer Glucosekonzentration von 30 g/l 40
Abbildung 19: Glucosekonzentration und Ethanolbildung Hefe-Batch 30 g/l 40
Abbildung 20: pH-Verlauf und Gelöstsauerstoff 42
Abbildung 21: Temperaturverlauf 43
Abbildung 22: Fedbatch Ansatz Nr. 1 kontinuierliche Fütterung mit Glucosekonzentration 500 g/l 45
Abbildung 23: Fedbatch Nr. 1 Glucosekonzentration und Ethanolbildung 45
Abbildung 24: Fedbatch Ansatz Nr. 2 Steigerung des Zulaufstroms: Glucosekonzentration 500 g/l 47
Abbildung 25: Fedbatch Nr. 2 Glucosekonzentration und Ethanolbildung 48
Abbildung 26: Fermentationen im Schüttelkolben mit minimaler Glucosekonzentration 49
Abbildung 27: Vergleich Respirationsquotienten der Schüttelkolben 50
Abbildung 28: Fedbatch Nr. 3: aerobe Anzucht der Hefe unter Crabtree-Effekt 51
Abbildung 29: Fedbatch Nr. 3 Glucosekonzentration und Ethanolbildung 51
Abbildung 30: Wachstumskurven der Stämme *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 54
Abbildung 31: Batch Fermentation Nr. 1 *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113 ältere Kultur 55
Abbildung 32: Glucosekonzentration und CH-Signal Batch Nr. 1 56
Abbildung 33: Batch Fermentation Nr. 2 *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4 1659 BW 25113 ältere Kultur 56
Abbildung 34: Glucosekonzentration und CH-Signal Batch Nr. 2 57
Abbildung 35: pH- und Gelöst-Sauerstoffkonzentration 57
Abbildung 36: Fermentationsverlauf Batch Nr.3 Batch *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 1659 neue Kultur 59
Abbildung 37: Glucosekonzentration und CH-Signal Batch Nr. 3 59
Abbildung 38: pH-Verlauf und Gelöst-Sauerstoff Batch Nr. 3 60
Abbildung 39: Rührkolbenversuch der Stämme *E.coli* BL21 (ΛD3) pLB 4: 1659*&* 1661 62
Abbildung 40: Glucosekonzentration und CH-Signal 62
Abbildung 41: pH-Verlauf Rührkolbenversuch 63

Abbildung 42: Fermentationsverlauf im Schüttelkolben der Stämme *E.coli* BL21 (ΛD3) : 1659 &1661 64
Abbildung 43: Glucosekonzentration und CH-Signal Schüttelkolben-Ansatz 65
Abbildung 44: maximale Acetonkonzentrationen aller Fermentationen mit *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4 66
Abbildung 45: maximale Acetatkonzentration aller Fermentationen mit *E.Coli* BL21(ΛD3) pLB4 66
Abbildung 46: Hefe Batch & Fedbatch: maximal erreichte Ethanolwerte mit Abweichung der CH-Sensoren .. 71
Abbildung 47: maximale CH-Sammelsignale mit Sensorabweichung aller Fermentationen mit *E.coli* 71

8.2 Tabellen

Tabelle 1: Legende Nernst-Gleichung 15
Tabelle 2: Legende zur Berechnung der enzymatischen Test-Kits 21
Tabelle 3: verwendete Geräte 24
Tabelle 4: Komplexmedium für Fermentationen von *Saccharomyces cerevisiae* 24
Tabelle 5: Luria Bertani (LB) Komplexmedium für die Vorkultivierung von *Escherichia Coli* 24
Tabelle 6: 5-fach Basissalzlösung in 500 ml bidest. H_2O (autoklavieren): 25
Tabelle 7: 1 M $MgSO_4$ * 7 H_2O in 100 ml H_2O (steril filtrieren): 25
Tabelle 8: Spurenelementlösung in 100 ml 5 M HCl (pH 7 ist einzustellen, steril filtrieren): 25
Tabelle 9: SD-8 Medium (1 L) Zusammensetzung: 26
Tabelle 10: Weitere Chemikalien 26
Tabelle 11: Legende OTR-Berechnung 28
Tabelle 12: Legende K_La-Wert Berechnung 29
Tabelle 13: Ergebnisse kLA-Wert Berechnung 34
Tabelle 14: Vor- und Nachteile der Sauerstoffsensoren 37
Tabelle 15: Umsatz zwischen Glucoseverbrauch zu Ethanolbildung bei 20 g/l und 30 g/l c[Glc] ... 41
Tabelle 16: Versuchsübersicht Fedbatch-Fermentationen 44
Tabelle 17: enzymatischer Test auf Ethanol Endbestimmung 49
Tabelle 18: Maximal erreichte Ethanolwerte aller Fedbatch-Fermentationen mit *S.cerevisiae* 53
Tabelle 19: Übersicht verwendeter *E.coli* Stämme 53
Tabelle 20: Abweichungen Messzylinder, Waagen, Abgassensoren 70
Tabelle 21: Abweichungen Photometer 70