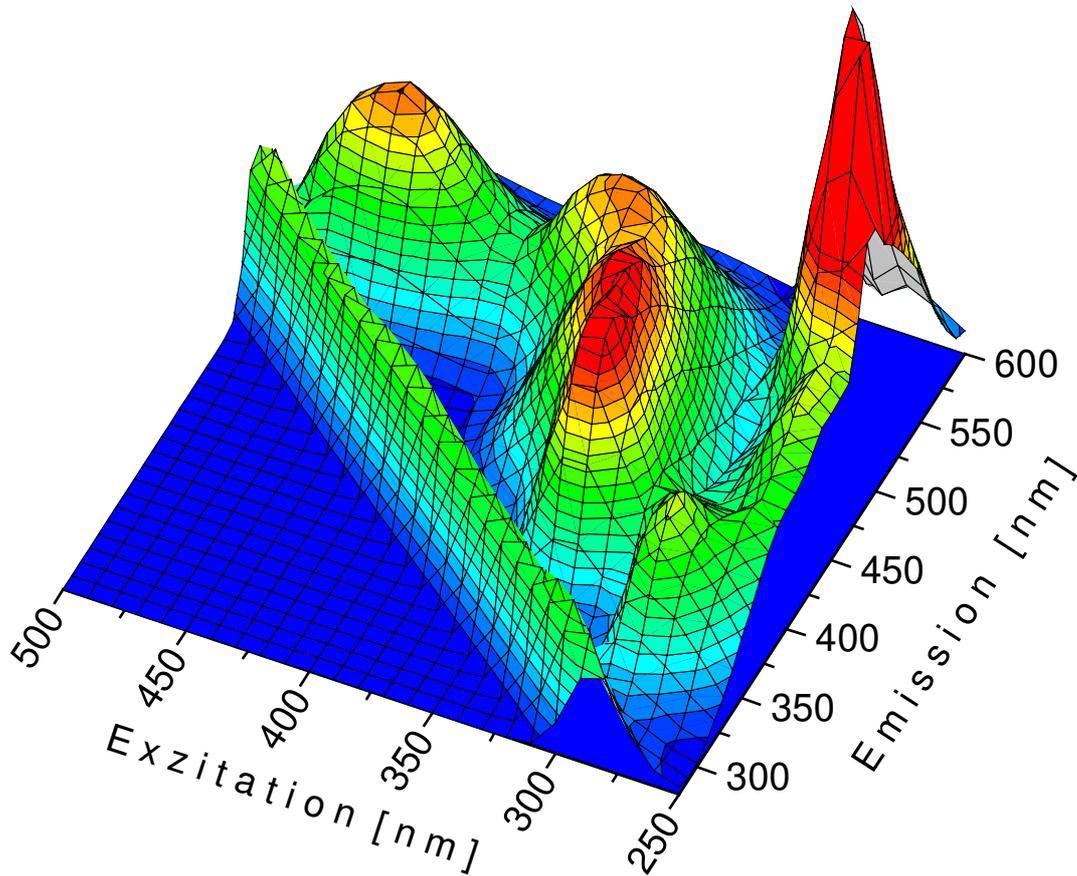


Stefan Marose

# Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie



# **Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie**

**Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

**- Dr. rer. nat. -  
genehmigte**

**DISSERTATION**

**von**

**Dipl.-Chem. Stefan Marose  
geboren am 3. Juli 1969, in Hamburg**

**Hannover 1999**

**Referent:** Prof. Dr. Thomas Scheper  
**Korreferent:** PD Dr. Bernd Hitzmann  
**Tag der Promotion:** 30.04.1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 1996 bis Oktober 1998 im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm danke ich besonders für die Möglichkeiten, die er mir im Verlauf meiner Promotion eröffnete.

PD Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und die Ideen in der Zusammenarbeit am EU-Projekt.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie danke ich für die lockere Atmosphäre und jederzeitige Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich das angenehme Klima in unserer „Schreib-Bibliothek“ (trotz Zugluft und extremer Temperaturen...).

Speziell bedanke ich mich bei:

der Europäischen Union, die mit ihrer finanziellen Förderung diese Arbeit ermöglichte und bei allen Partnern im „Bio-View-Projekt“ für die Zusammenarbeit,

Ralf Finke und Egbert Stärk für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten und weit darüber hinaus,

Young-Lok Cha für seine Unterstützung bei der Datenauswertung,

Marcus Hesse für seinen „unermüdlichen“ Arbeitseinsatz beim Kultivieren von *E. coli*,

Markus Ganzlin für die Durchführung der Kultivierung von *Aspergillus niger*,

Miriam Menge für die Zusammenarbeit beim Kultivieren von *Claviceps purpurea* und für ihre ansteckende gute Laune, die sie trotz des problembeladenen Kultivierungsalltags nicht verloren hat,

Christopher Schippers, Torsten Müller und Karen Geßner für die Zusammenarbeit bei den Kultivierungen von *Sphingomonas yanoikuyae*,

Egbert Stärk für perfektes, uneigennütziges Teamwork bei einem Dutzend Hefekultivierungen und den Kultivierungen von *Aspergillus niger*,

Marco Rieseberg für die Durchführung der Durchflußcytometrie zur Klärung des Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* und der Größenverteilung der PHB-Grana,

Volker Gorenflo für die motivierte Zusammenarbeit bei der Quantifizierung von Polyhydroxybuttersäuren (was lange währt, wird endlich gut...).

Vielfach sind aus der Zusammenarbeit gute Freundschaften entstanden, für die ich sehr dankbar bin.

Für das Korrekturlesen danke ich oben genannten Personen, außerdem Anne Lämmel, Ursula Hinsken, meiner Schwester und meinem Vater.

# Abstract

Stefan Marose

## Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie

2D-Fluoreszenzspektroskopie ermöglichte in dieser Arbeit schnelle, empfindliche, selektive und nicht invasive Fluoreszenzmessungen in einem weiten Wellenlängenbereich von Exzitation und Emission. Die quasi kontinuierlich, in-vivo aufgenommenen relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) erlaubten die simultane Detektion mehrerer verschiedener Analyte, die neben extrazellulärer Analytik Informationen direkt aus der Zelle lieferten, wie z. B. über Zellwachstum, den physiologischen Zustand der Zellen, Substrat- und Produktkonzentration.

Drei Fluorometer wurden eingesetzt: das Fluoreszenzspektrophotometer F-4500 (Hitachi, Japan), der Fluorosensor (Ingold, Schweiz) und der BioView (Delta Light & Optics, Dänemark). Offline-Messungen wurden in verschiedenen Küvetten, einem 10-mL-Minireaktor und einem Feststoffadapter durchgeführt. Den Schwerpunkt der Arbeit bildete die Online-Bioprozeßanalytik. Über flexible Lichtwellenleiter wurden zum einen in einer Durchflußzelle im Bypass und zum anderen direkt im Edelstahlrührkesselreaktor In-situ-Messungen durchgeführt. Für die in sehr großer Menge anfallen Meßdaten wurde eine neue Auswertemethode entwickelt. Anhand von Differenzspektren wurden Bereiche ermittelt, in denen die RFI gemittelt wurde. Dadurch wurde die Streuung der RFI-Verläufe minimiert. Zusätzliche Informationen lieferte die Bildung des Verhältnisses von zwei RFI-Verläufen.

So konnten mit einem RFI-Verhältnis bei der Untersuchung von Stoffwechselflüssen von *Escherichia coli* bei unterschiedlicher Sauerstoffversorgung Sauerstofflimitierungen erkannt werden. Bei kurzfristiger Sauerstofflimitierung sank dieses Verhältnis, während ein Anstieg im Verlauf mehrerer Batch-Kultivierungen eine einsetzende Sauerstofflimitierung anzeigte und darüber hinaus eine grobe Quantifizierung von Sauerstofflimitierungen im Verlauf von kontinuierlichen *E. coli*-Kultivierungen ermöglichte. Die Produktion von GFP durch *Aspergillus niger* in Fed-Batch-Kultur konnte mit Hilfe von 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden. Ergotalkaloidproduktion und Proteingehalt wurden mit dieser Methode in Batch-Kultivierungen von *Claviceps purpurea* erfaßt. Da wäßrig und mizellar gelöstes Phenanthren mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie von ungelöstem, kristallinem unterscheidbar war, konnte ein Abbaumechanismus für den mikrobiellen Phenanthren-Abbau durch *Sphingomonas yanoikuyae* unter Tensidzusatz postuliert werden. Entscheidende Zeitpunkte im Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* wurden durch 2D-Fluoreszenzmessungen an synchronen Kulturen deutlich erkannt.

Synthetische Fluoreszenzfarbstoffe wurden zur Steigerung des Informationsgehaltes der 2D-Fluoreszenzspektroskopie gezielt eingesetzt. Durch den Zusatz externer Fluorophore zur Bioprozeßbeobachtung konnten pH-Wert und Gelöstsauerstoffgehalt online verfolgt werden. Offline ermöglichte der Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen die Entwicklung eines Vitalitätstests mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie. Verschiedene biologische Polyhydroxyalkansäuren konnten offline als Grana und auch in vivo in den Zellen nach Nilrotzugabe qualitativ und quantitativ mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden.

Stichworte: 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Online-Bioprozeßbeobachtung, Optischer Sensor

# Abstract

Stefan Marose

## Bioprocess monitoring by two-dimensional fluorescence spectroscopy

In this thesis, two-dimensional fluorescence spectroscopy is presented as a fast, sensitive, selective and noninvasive technique. Fluorescence measurements were performed in a wide range of excitation and emission wavelengths. The almost continuous, *in-vivo* monitoring of relative fluorescence intensities (RFI) allowed the simultaneous detection of various different analytes inside and outside of cells. Thus information was gathered about cell growth, their physiological state and concentrations of substrates and products.

Three fluorometers were used: the fluorescence spectrophotometer F-4500 (Hitachi, Japan), the Fluorosensor (Ingold, Switzerland) and the BioView (Delta Light & Optics, Denmark). Most of the measurements were performed on line, using a flexible liquid light conductor. Evaluation of the data was improved by means of RFI in relevant areas, which were found by subtraction spectra. Additional information was supplied by the ratio of RFI courses.

Limitations of oxygen were found with the ratio of RFI in metabolic flux analysis of *Escherichia coli* at different oxygen supplies. The ratio sank at short limitations of oxygen. During batch cultivations an increase of the ratio indicated a beginning of oxygen limitation, which could be quantified during continuous cultivation of *E. coli*. The production of green fluorescent protein (gfp) by *Aspergillus niger* in fed batch culture was followed by two-dimensional fluorescence spectroscopy. With this method the production of ergotalkaloids and the concentration of proteins was detected in batch cultivations of *Claviceps purpurea*. Phenanthrene dissolved in water and in micells showed different fluorescence properties from undissolved, crystalline phenanthrene, which allowed a postulation to be made on a mechanism for the effect of surfactants in microbial phenanthrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae*. Decisive changes in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* were found by two-dimensional fluorescence measurements of synchronous cultures.

Synthetic fluorescent dyes were used to improve the content of information of two-dimensional fluorescence spectroscopy. Dissolved oxygen and pH could be monitored on line by adding external fluorophores. Adding fluorescent dyes off line allowed the establishment of a test of cell viability by two-dimensional fluorescence spectroscopy. Different polyhydroxyalkanoic acids produced biologically could be detected off line both qualitatively and quantitatively by two-dimensional fluorescence spectroscopy. For this purpose suspensions of grana and also of cells were stained with Nile red.

Key words: two-dimensional fluorescence spectroscopy, on-line bioprocess monitoring, optical sensor

*No other instrumental methods available at comparable cost,  
can equal or surpass  
fluorimetry and phosphorimetry  
in analytical sensitivity.*

[SCHULMAN, 1976]

# Lebenslauf

**Name:** Stefan Marose

**Geburtsdatum:** 03.07.1969

**Geburtsort:** Hamburg

## Schulbildung

1976 - 1980 Grundschule Maienbeeck in Bad Bramstedt

1980 - 1989 Jürgen-Fuhlendorf-Gymnasium in Bad Bramstedt

Mai 1989 Abitur

## Grundwehrdienst

Juni 1989 - August 1990

## Studium

Oktober 1990 Beginn des Studiums Chemie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Februar 1993 Diplom-Vorprüfung

April 1993 Fortsetzung des Studiums Chemie (Diplom) Studienschwerpunkt Biochemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

März bis September 1994 *Research scholar* an der University of Toledo, Ohio, USA

1993-1995 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Juni bis Dezember 1995 Diplomarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster über das Thema: „Untersuchungen zur Anwendung eines Prozeßspektralfluorometers für die On-line-Bioprobebeobachtung“ unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

April 1996 bis März 1999 Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

30. April 1999 Promotionsprüfung

Hamburg, den 01.05.1999

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN</b>	<b>2</b>
2.1	Optische Sensoren zur Bioprozeßbeobachtung .....	2
2.1.1	Vorteile und Probleme optischer Sensoren zur Bioprozeßbeobachtung .....	2
2.1.2	Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der optischen Sensoren .....	4
2.2	Fluoreszenzspektroskopie .....	6
2.2.1	Grundlagen .....	6
2.2.2	Einflüsse auf die Fluoreszenz .....	7
2.2.3	Darstellung von Fluoreszenzspektren .....	8
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
3.1	Verwendete Fluorometer .....	13
3.1.1	Fluorosensor .....	14
3.1.2	Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500 .....	14
3.1.3	BioView .....	14
3.2	Aufbau für Fluoreszenzmessungen .....	17
3.2.1	Fluoreszenzmessungen offline .....	17
3.2.2	Fluoreszenzmessungen online .....	18
3.3	Methoden der Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren .....	20
3.3.1	Addition von 2D-Fluoreszenzspektren .....	20
3.3.2	Auswertung von RFI-Verläufen .....	21
<b>4</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN VON STOFFWECHSELFLÜSSEN BEI UNTERSCHIEDLICHER SAUERSTOFFVERSORGUNG IN BATCH- UND CHEMOSTAT-KULTIVIERUNGEN VON <i>ESCHERICHIA COLI</i></b>	<b>24</b>
4.1	Theorie des <i>metabolic engineering</i> .....	24
4.2	Verwendete Mikroorganismen .....	24
4.3	Kultivierungsbedingungen und durchgeführte Analytik .....	25
4.4	Begasungs-Shift-Experiment .....	26
4.4.1	Wechsel der Begasung von aeroben zu anaeroben Bedingungen .....	26
4.4.2	Metabolische Veränderungen nach dem Begasungswechsel .....	28
4.5	Experiment zur Entkopplung der Atmungskette .....	30
4.6	<i>E. coli</i> -Batch-Kultivierungen .....	31
4.6.1	2D-Fluoreszenz-Differenzspektren über den gesamten Kultivierungsverlauf .....	31
4.6.2	Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im Proteinbereich .....	33
4.6.3	Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im Pyridoxalphosphatbereich .....	34
4.6.4	Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im FMN/FAD- und NAD(P)H-Bereich .....	35
4.7	Kontinuierliche <i>E. coli</i> -Kultivierungen .....	39
4.7.1	2D-Fluoreszenzspektrum in einem stationären Zustand .....	39
4.7.2	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen stationären Zuständen .....	40
4.8	Einfluß einer Sauerstofflimitierung im Stoffwechsel von <i>E. coli</i> auf die 2D-Fluoreszenzspektren .....	41
4.8.1	Einfluß kurzfristiger Sauerstofflimitierung auf die 2D-Fluoreszenzspektren .....	41
4.8.2	Erkennen von Sauerstofflimitierungen im Verlauf von Batch-Kultivierungen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie .....	42
4.8.3	Quantifizierung von Sauerstofflimitierungen mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie .....	45

<b>5</b>	<b>GFP-PRODUKTION DURCH <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IN FED-BATCH-KULTUR</b>	<b>48</b>
5.1	Theorie.....	48
5.2	Kultivierungsbedingungen.....	49
5.3	Fluoreszenzeigenschaften des untersuchten GFPs .....	50
5.4	Fed-Batch-Kultivierung .....	51
5.5	Diskussion.....	58
<b>6</b>	<b>BATCH-KULTIVIERUNGEN VON <i>CLAVICEPS PURPUREA</i> ZUR ERGOTALKALOIDPRODUKTION</b>	<b>59</b>
6.1	Theorie.....	59
6.2	Kultivierungsbedingungen.....	59
6.3	2D-Fluoreszenzspektren reiner Ergotalkaloide.....	61
6.4	Bioprozeßbeobachtung mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie .....	61
6.4.1	2D-Fluoreszenz-Differenzspektren über den gesamten Kultivierungsverlauf.....	61
6.4.2	Verlauf der Fluoreszenzintensitäten .....	63
6.5	Fluoreszenzspektroskopie an Kulturüberständen .....	65
6.6	Diskussion.....	68
<b>7</b>	<b>MIKROBIELLER PHENANTHREN-ABBAU DURCH <i>SPHINGOMONAS YANOIKUYAE</i> UNTER TENSIDZUSATZ</b>	<b>71</b>
7.1	Theorie.....	71
7.2	Kultivierungsbedingungen.....	71
7.3	Phenanthrenfluoreszenz im festen und im gelösten Zustand.....	73
7.4	Einfluß von Sophoroselipid auf die Fluoreszenz von Phenanthren .....	74
7.4.1	Qualitativer Einfluß von Sophoroselipid auf die Fluoreszenz von Phenanthren .....	74
7.4.2	Zugabe von Phenanthren zu einer Sophoroselipidlösung .....	75
7.4.3	Zugabe von Sophoroselipid zu einer Phenanthrensuspension.....	76
7.5	Kultivierungen mit unterschiedlichen Sophoroselipidgehalten .....	78
7.5.1	Korrelation der 2D-Fluoreszenzdaten mit Phenanthren und Biomasse.....	78
7.5.2	Veränderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren im Kultivierungsverlauf.....	80
7.5.3	Fluoreszenzverläufe bei Kultivierungen von <i>S. yanoikuyae</i> mit unterschiedlichen Sophoroselipidgehalten.....	82
7.6	Versuche mit Bodenproben .....	85
7.7	Diskussion.....	87
<b>8</b>	<b>SYNCHRONES WACHSTUM VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b>	<b>92</b>
8.1	Theorie des synchronen Wachstums .....	92
8.2	Kultivierungsbedingungen.....	93
8.3	Zellzyklusanalyse .....	95
8.3.1	Zellzyklusanalyse anhand von 2D-Fluoreszenzspektren mit dem BioView und dem F-4500.....	95
8.3.2	Zellzyklusanalyse über viele Oszillationen mit dem BioView .....	97
8.3.3	Analytik eines einzelnen Zellzyklus mit dem F-4500 .....	101
8.4	Diskussion.....	104
8.4.1	Zellzyklus.....	104
8.4.2	Substratpulse.....	106
8.4.3	Ausblick.....	107

<b>9</b>	<b>STEIGERUNG DES INFORMATIONSGEHALTES DER 2D-FLUORESZENZ-SPEKTROSKOPIE ZUR BIOPROZEBBEOBACHTUNG DURCH DEN ZUSATZ EXTERNER FLUOROPHORE</b>	<b>108</b>
9.1	Anforderungen an externe Fluorophore zur erweiterten Bioprozeßüberwachung .....	108
9.2	Kultivierungsbedingungen.....	109
9.3	Sauerstoffabhängigkeit ausgewählter Fluorophore.....	110
9.3.1	Beispiele sauerstoffabhängiger Fluorophore .....	110
9.3.2	Online-Detektion des Sauerstoffgehaltes durch einen extern zugesetzten Ru(II)-Komplex bei einer <i>E.coli</i> -Kultivierung.....	111
9.4	pH-Abhängigkeit ausgewählter Fluorophore .....	112
9.4.1	Beispiele ausgewählter Fluorophore zur pH-Detektion .....	112
9.4.2	Online-Detektion des pH-Wertes durch extern zugesetztes Fluorescein bei einer Hefe-Kultivierung .....	114
9.5	Diskussion.....	115
<b>10</b>	<b>ENTWICKLUNG EINES VITALITÄTSTESTS MIT HILFE DER 2D-FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE</b>	<b>116</b>
10.1	Theorie.....	116
10.2	Meßbedingungen.....	116
10.3	Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe .....	117
10.4	Vitalitätsmessungen mit Propidium-Iodid an <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	119
<b>11</b>	<b>FLUORESZENZANFÄRBUNG VON BAKTERIELLEN POLYHYDROXYALKANSÄUREN MIT NILROT</b>	<b>122</b>
11.1	Theorie.....	122
11.2	Meßbedingungen.....	122
11.3	2D-Fluoreszenzspektren verschiedener Polyhydroxyalkansäuren .....	123
11.4	Quantifizierung von bakteriellen Polyhydroxyalkansäuren mit Nilrot .....	125
11.5	Diskussion.....	128
<b>12</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>130</b>
<b>13</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>139</b>
<b>14</b>	<b>ANHANG</b>	<b>149</b>
14.1	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis .....	149
14.2	Kulturmedien .....	151
14.2.1	<i>E. coli</i> -Kultivierung (Kap. 4).....	151
14.2.2	<i>A. niger</i> -Kultivierung (Kap. 5) .....	152
14.2.3	<i>C. purpurea</i> -Kultivierung (Kap. 6).....	153
14.2.4	<i>S. yanoikuyae</i> -Kultivierung (Kap. 7) .....	154
14.2.5	<i>S. cerevisiae</i> -Kultivierung (Kap. 8, 9 und 10).....	154
14.3	Analytik .....	156
14.4	Verwendete Geräte .....	159
14.5	Technische Zeichnungen.....	163

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Fluoreszenzspektroskopie gehört heute zu den am weitesten verbreiteten analytischen Methoden in der Umwelt- und Bioanalytik [WINTER und NOLL, 1998]. Gründe dafür sind vor allem ihre Empfindlichkeit in Kombination mit hoher Spezifität.

Trotzdem sind Fluoreszenzmessungen für die Online-Routine-Analytik in der industriellen Bioprozeßbeobachtung im allgemeinen nicht etabliert und werden nur in Ausnahmefällen durchgeführt, da die Interpretation der Meßdaten oft Probleme bereitet. Online-Messungen beschränken sich auf Temperatur, pH-Wert, Gelöstsauerstoffgehalt ( $pO_2$ ) und teilweise noch optische Dichte (OD). Die Akzeptanz für den Einsatz neuer Meßmethoden ist oft gering.

Dabei ist die Voraussetzung für die optimale Ausnutzung von biologischem Material eine effektive Prozeßkontrolle, die eine Steigerung von Produktivität und Produktqualität ermöglicht [SCHEPER, 1991]. Dies gilt vor allem für automatisierte Systeme, die wegen eines kontinuierlichen Informationsflusses ohne personellen Aufwand der Offline-Analytik, die wiederholte Probenahme erfordert, überlegen ist. Nur eine ausreichende Datengrundlage ermöglicht die Durchführung von Modellierungen oder Simulationen.

Für In-vivo-Messungen in der Biotechnologie bieten sich optische Sensoren an, da sie sehr empfindlich, spezifisch und nicht invasiv sind. Neuere Entwicklungen bei Sonden zur Messung der optischen Dichte, bei optischen Biosensoren, bei der In-situ-Mikroskopie, bei faseroptischen, Infrarot- und Fluoreszenz-Sensoren demonstrieren ihre wachsende Bedeutung. So sind beispielsweise Fluoreszenzmeßgeräte zur sekundenschnellen Aufnahme von 2D-Fluoreszenzspektren, die in einem weiten Wellenlängenbereich von Exzitation und Emission aufgenommen werden, entwickelt worden (z. B. F-4500, Hitachi, Japan; FL-3D, I.S.A., Grasbrunn und BioView, Delta Light & Optics, Dänemark).

Dadurch ist diese Meßtechnik für die Online-Bioprozeßanalytik interessant geworden. In dieser Arbeit sollen die 2D-Fluoreszenzspektroskopie an verschiedenen Beispielen angewendet und die dabei in sehr großer Menge anfallen Meßdaten interpretiert werden. Das sind während einer kontinuierlichen Kultivierung etwa 5 MB ASCII-Daten. Es soll untersucht werden, inwieweit die 2D-Fluoreszenzspektroskopie einen detaillierten Einblick in die Zelle sowie in ihre chemische und physikalische Umgebung ermöglicht. Informationen über das Zellwachstum, den metabolischen Zustand der Zellen, Substrat- und Produktkonzentration sollen durch Fluoreszenzmessungen vorwiegend direkt im Bioreaktor (in situ) gewonnen werden. Den Schwerpunkt soll die Messung der intrinsischen Fluoreszenz biogener Fluorophore, die von der Zelle produziert werden, bilden. Daneben sollen auch synthetische Fluoreszenzfarbstoffe gezielt eingesetzt werden.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Optische Sensoren zur Bioprozeßbeobachtung

#### 2.1.1 Vorteile und Probleme optischer Sensoren zur Bioprozeßbeobachtung

Die optische Spektroskopie umfaßt alle analytischen Methoden, die auf einer Wechselwirkung von Materie mit Licht beruhen. Optische Sensoren, die automatisiert und oft kontinuierlich Informationen über einen Prozeß liefern, erlauben die Durchführung von nicht-invasiven und kontinuierlichen Messungen oft mehrerer Analyte gleichzeitig. Aus diesen Gründen werden sie vermehrt für die Beobachtung und Kontrolle von Bioprozessen eingesetzt. Eine Übersicht über Vorteile und Probleme von optischen Sensoren für die Bioprozeßbeobachtung gibt Tabelle 2.1.

Optische Messungen beeinflussen den Zellmetabolismus im allgemeinen nicht und ermöglichen daher neben extrazellulärer Analytik in vivo den Zugriff auf intrazelluläre Informationen, die mit anderen Methoden kaum zugänglich sind. Zusätzlich sind eine Probenahme, bei der immer das Risiko einer Kontamination gegeben ist, und eine zeitaufwendige Probenvorbereitung generell nicht nötig für optische Sensoren. Es wird in den meisten Fällen kein Analyt verbraucht. Sowohl qualitative als auch quantitative Messungen sind möglich. Bei Bioprozessen können neben der chemischen (z. B. pH-Wert und Gelöstsauerstoffkonzentration) und der physikalischen (z. B. Temperatur) Umgebung der Zelle auch biologische Größen (z. B. Morphologie und Zellwachstum) detektiert werden.

Die meisten In-situ-Sensoren sind nicht sterilisierbar und daher zur Beobachtung von vielen Bioprozessen ungeeignet. Systeme, die optische Lichtwellenleiter benutzen, können dagegen an einen laufenden Prozeß beliebig angeschlossen und von ihm getrennt werden. Der Lichtwellenleiter ermöglicht eine Distanz zum Prozeß, so daß Messungen auch in schwer zugänglicher Umgebung, für gefährliche (z. B. explosive oder radioaktive) Stoffe und bei hoher Feuchtigkeit und Temperatur möglich sind. Sofern der Anschluß durch ein Sichtfenster vorbereitet wurde, stellt eine Sterilisation selbst für empfindliche Sensoren kein Problem dar. Optische Kabel haben außerdem den Vorteil, nicht durch elektromagnetische Felder gestört zu werden, so daß eine Informationsübertragung über lange Distanzen (bis zu einigen hundert Metern) möglich ist. Sie sind außerdem sehr stabil gegenüber aggressiven Chemikalien, und es entstehen keine Funken, die Explosionen auslösen könnten. Der Einsatz von Fasern ermöglicht eine Miniaturisierung und eine enge lokale Begrenzung der gemessenen Umgebung. So sind beispielsweise Messungen an verschiedenen Stellen im Reaktor möglich.

Viele optische Methoden lassen sich kontinuierlich, online und in Echtzeit durchführen. Dies bedeutet, daß die Ergebnisse sofort zur Verfügung stehen, was für eine direkte Prozeßkontrolle eine wichtige Voraussetzung darstellt. Daher bieten optische Techniken das Potential für schnelle und selektive Messungen, verbunden mit der erforderlichen Spezifität und Empfindlichkeit wie auch mit vergleichsweise geringen Kosten.

Tabelle 2.1: Vorteile und Probleme von optischen Sensoren für die Bioprozeßbeobachtung

Vorteile von optischen Sensoren für die Bioprozeßbeobachtung	Probleme
<p>vielseitig einsetzbar</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ sehr empfindlich</li> <li>◆ vielfach spezifisch</li> <li>◆ Messungen ohne Zeitverzögerung (in Echtzeit) und kontinuierlich</li> <li>◆ online</li> <li>◆ In-vivo-Messungen <ul style="list-style-type: none"> <li>- kein Verbrauch des Analyten</li> <li>- nicht invasiv, nicht destruktiv, keine Beeinflussung des Metabolismus</li> <li>- Messungen intrazellulärer und extrazellulärer Größen</li> </ul> </li> <li>◆ In-situ-Messungen <ul style="list-style-type: none"> <li>- keine Probenahme notwendig (reduziertes Risiko einer Kontamination)</li> <li>- keine zeitaufwendige Probenvorbereitung</li> </ul> </li> <li>◆ gleichzeitige Messung mehrerer Analyte <ul style="list-style-type: none"> <li>- quantitative und qualitative Analytik</li> <li>- chemische und physikalische Umgebung der Zelle detektierbar</li> <li>- Informationen über biologische Größen</li> </ul> </li> </ul> <p>einfache Handhabung</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ keine Sterilisationsprobleme</li> <li>◆ keine Wechselwirkungen mit magnetischen oder elektrischen Feldern</li> <li>◆ vergleichsweise geringe Kosten</li> <li>◆ bessere Informationsübertragung durch Lichtwellenleiter als über elektrische Leitungen (störungsfreier, längere Distanzen möglich)</li> <li>◆ Messungen auch in schwer zugänglicher Umgebung, in gefährlichen (z. B. explosiven oder radioaktiven) Stoffen und bei hoher Feuchtigkeit und Temperatur möglich</li> <li>◆ Lichtwellenleiter ermöglicht Distanz zum Prozeß</li> <li>◆ faseroptische Lichtwellenleiter ermöglichen Miniaturisierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ vergleichsweise geringes Signal-Rausch-Verhältnis</li> <li>◆ Trübung</li> <li>◆ Gasblasen</li> <li>◆ Absorption durch Bestandteile des Mediums oder durch Stoffwechselprodukte</li> <li>◆ Streuung an Zellen und Feststoffen</li> <li>◆ Mehrphasensysteme (Emulsionen, Suspensionen)</li> <li>◆ schwierige Interpretation der Meßdaten <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wechselwirkungen und Überlagerungen der optischen Eigenschaften</li> <li>- hohe Datenvielfalt</li> <li>- komplexe Systeme und Zusammenhänge</li> </ul> </li> <li>◆ Außenlicht kann stören</li> <li>◆ hohe Bestrahlung kann Analyten verändern</li> </ul>

Optische Messungen werden in Forschungslaboratorien eingesetzt und sind auch geeignet für eine Vielzahl industrieller Anwendungen. Trotzdem sind optische Sensoren für die Routine-Analytik in der biotechnologischen Industrie nur gering verbreitet. Der Grund dafür sind die Schwierigkeiten, die sich aus der Vielzahl komplexer Wechselwirkungen ergeben. So kann sich beispielsweise die Trübung im Verlaufe eines Prozesses drastisch ändern und damit optische Messungen stark beeinflussen. Blasen, die bei begasten und gerührten Kultivierungen auftreten, beeinträchtigen die Empfindlichkeit optischer Messungen. Multiphasensysteme aus Medium, Zellen, Gasblasen und anderen flüssigen oder sogar festen Phasen verursachen Schwierigkeiten, da optische Messungen meist nicht zwischen der Verteilung einer Komponente in den unterschiedlichen Phasen unterscheiden können. Streuungen an Zellen oder Feststoffen wirken sich negativ aus. Die Morphologie von Zellen (Dicke der Zellwand, Form der Zelle) kann sich im Verlauf einer Kultivierung stark ändern. Bestandteile des Mediums oder Stoffwechselprodukte können durch Absorption, die sich häufig sichtbar in einer Anfärbung des Mediums äußert, die Messungen beeinträchtigen. Viele optische Sensoren sind empfindlich gegenüber einem Bewuchs durch Mikroorganismen. Außenlicht kann stören und muß dann abgeschirmt werden. Bei hoher Bestrahlung kann der Analyt verändert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist häufig wesentlich geringer als bei vergleichbaren Methoden, die nicht auf optischen Prinzipien beruhen. Entgegengewirkt wird diesem Problem häufig durch eine hohe Meßfrequenz und eine aufwendige mathematische Bearbeitung der Meßdaten.

Da häufig eine große Datenflut anfällt, ist die Interpretation oft sehr problematisch. Mit dem Gebrauch leistungsfähiger Computer und chemometrischer Modelle wie Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis* (PCA)) und künstlicher neuronaler Netze (*artificial neural networks* (ANN)) wird die relevante Information aus diesen Daten extrahiert. Mit dieser Methode sollen auch die komplexen Wechselwirkungen und Überlagerungen der optischen Eigenschaften eliminiert werden.

### **2.1.2 Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der optischen Sensoren**

Die schnell fortschreitende Entwicklung der Datenauswertung und Interpretation war sicherlich neben der vielseitigen Einsetzbarkeit und der einfachen Handhabung bei günstigen Kosten der Grund dafür, daß in den letzten Jahren viele optische Sensoren weiterentwickelt worden sind.

Die erhältlichen Sonden zur Messung der optischen Dichte sind noch nicht robust genug für Messungen in industriellen Prozessen, obwohl es zur Zeit die verbreitetsten In-situ-Geräte zur Online-Bestimmung von Biomasse sind [KONSTANTINOV *et al.*, 1994]. Bei Trübungsmessungen stört häufig neben den generellen Problemen von optischen Sensoren (Tabelle 2.1) die Bildung von Zell-Aggregaten als Folge von Zell-Zell-Adhäsion. In diesem Fall kann die Korrelation zur Biomasse durch die Verwendung von neuronalen Netzen deutlich verbessert werden [NAIMIMOHASSES *et al.*, 1995].

Im Verlauf von Kultivierungen ist eine In-situ- und Online-Charakterisierung von Zellkonzentration und Morphologie mit Hilfe von In-situ-Mikroskopie möglich [SUHR *et al.*, 1995].

Optische Biosensoren benötigen eine aseptische Online-Probenahme aus dem Bioreaktor, wenn, wie in fast allen Fällen, die biologische Komponente des Biosensors nicht sterilisierbar ist. Trotz der Probleme mit Rekalibrierungen und Regenerierungen, Zellbewuchs und Enzymstabilität wächst der Einsatz von Biosensoren ständig an [Schügerl *et al.*, 1996]. Mit Hilfe von evaneszierenden Wellen, die von einem faseroptischen Biosensoren produziert wurden, gelang es CHANG *et al.* ein von *Staphylococcus aureus* produziertes Protein in einer Konzentration von bis zu 1 ng/mL zu detektieren [CHANG *et al.*, 1996].

Faseroptische Sauerstoffsensoren haben gegenüber konventionellen amperometrischen Sensoren den Vorteil, keinen Sauerstoff zu verbrauchen und nicht von der Rührerdrehzahl abhängig zu sein. Es wurden außerdem faseroptische Sensoren zur Messung von CO<sub>2</sub>, pH, Ethanol- und Chloridionen-Konzentration entwickelt [MAROSE *et al.*, 1999].

Sogar in komplexem Medium ist es möglich, mit Hilfe von Infrarot-Spektroskopie Glucose, Glutamin, Ammonium, Lactat und Glutamat simultan zu messen, sofern multivariante Kalibrationsmodelle mit partial-least-squares (PLS) Analytik verwendet werden [CHUNG *et al.*, 1995 und 1996].

Die meisten kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-Sensoren für den Einsatz in der Biotechnologie beruhen auf dem Prinzip der Messung von Nicotinamidadenindinucleotid (NADH), dessen Fluoreszenz sowohl Zellwachstum als auch Veränderungen im Zellmetabolismus anzeigen kann [BEYERLE *et al.*, 1983; SCHEPER, 1991].

Um mehr Analyte zu erfassen, wurden Geräte zur Messung bei zwei unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen [SCHEPER und SCHÜGERL, 1986] und fünf unterschiedlichen Anregungswellenlängen [LI *et al.*, 1991] entwickelt, die zeigten, daß andere biogene Fluorophore (z. B. Tryptophan) zur Bioprozeßbeobachtung aussagekräftiger sein können als NADH.

Durch den Anschluß eines zweiarmigen Lichtleiters wurde ein kommerziell erhältliches Fluoreszenzspektrophotometer zur Beobachtung unterschiedlicher Kultivierungen in einem weiten Bereich von Anregungs- und Emissionswellenlänge (2D-Fluoreszenzspektroskopie) eingesetzt [HILMER, 1996]. Mit Hilfe einer schrittweisen multiplen Regression (*stepwise multiple regression procedure*) wurden aufbauend auf diesen Messungen im 2D-Fluoreszenzspektrum Domänen hoher Korrelation zwischen Fluoreszenzdaten und Prozeßvariablen bestimmt [TARTAKOWSKY *et al.*, 1996].

Ein modular aufgebautes Diodenarray-Fluoreszenzspektrometer [CHENINA, 1993] ermöglichte eine Untersuchung des Pyren-Metabolismus der höheren Pilze *Crinipellis* und *Aspergillus* [DOCHNAHL, 1997].

Speziell für den industriellen Einsatz in der biotechnologischen Produktion wurde der BioView-Sensor entwickelt [MAROSE *et al.*, 1998], der Filterräder zur Einstellung verschiedener Anregungs- und Emissionswellenlängen benutzt (Kap. 3).

Aufgrund des Einsatzes von grün-fluoreszierendem Protein (*green fluorescent protein*, GFP) als Sonde zur Überwachung der Bildung spezieller Proteine werden Fluoreszenzsensoren zur Bioprozeßbeobachtung vermehrt eingesetzt (Kap. 5).

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie hat das Potential, verglichen mit etablierten amperometrischen und elektrochemischen Sensoren, für verschiedene Prozeßvariablen (pH-Wert, Glucosekonzentration, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt) in vergleichbarer Empfindlichkeit und zu teilweise sogar geringeren Kosten angeboten zu werden [BAMBOT *et al.*, 1995].

Durch Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer war die Messung von Kohlendioxid im Abgas von Bioreaktoren möglich [SIPIOR *et al.*, 1996]. Diese Sensoren sind vergleichsweise günstig herzustellen und können durch Verwendung eines Lichtwellenleiters potentiell *in vivo* eingesetzt werden.

Selbst in extrem trüben Medien sind Messungen mit Hilfe von zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie möglich [SZEMACINSKI und LAKOWICZ, 1996].

Neben der reichhaltigen Weiterentwicklung von Geräten und Auswerteverfahren sind immer leistungsfähigere Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt worden, die die Nachweisgrenze durch extrinsische Fluoreszenz erniedrigen.

## 2.2 Fluoreszenzspektroskopie

### 2.2.1 Grundlagen

Als Fluoreszenz wird die ungerichtete Emission von Licht bezeichnet, die im Unterschied zur Phosphoreszenz nur so lange auftritt, wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption elektronisch angeregt werden [WEDLER, 1987]. Sie wird häufig bei kondensierten aromatischen Verbindungen beobachtet, die elektronisch leicht anregbare  $\pi$ -Elektronen aufweisen. Fluoreszierende Moleküle werden als Fluorophore bezeichnet. Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten oder sichtbaren Bereich werden sie innerhalb von  $10^{-15}$  s in einen elektronisch angeregten, energiereichen Zustand überführt. In der folgenden inneren Umwandlung (Vibrations- und Rotationsübergänge) erfolgt unter Temperaturengleich mit der Umgebung innerhalb von etwa  $10^{-13}$  s der strahlungslose Übergang zum ersten angeregten Singulettzustand. Die Desaktivierung zum Grundzustand kann neben strahlungsloser Energieabgabe durch Emission eines Lichtquants erfolgen, die als Fluoreszenz bezeichnet wird und etwa  $10^{-8}$  s dauert.

Bedingt durch die der Fluoreszenz vorangehende innere Umwandlung ist die Fluoreszenzwellenlänge immer energieärmer (länger) als die eingestrahlte Anregungswellenlänge. Erfolgt die Desaktivierung durch strahlungslosen Energietransfer auf andere Moleküle, wird sie als Fluoreszenzlöschung (Fluoreszenzquenching) bezeichnet. Es wird zwischen der dynamischen Fluoreszenzlöschung durch Kollisionsprozesse und der statischen Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung unterschieden, die beide von der Konzentration der

Löschermoleküle (Quencher) abhängig sind. Der Anteil der Fluoreszenz an den verschiedenen Prozessen der Desaktivierung wird durch die Quantenausbeute ( $\Phi$ ) angegeben.

Das emittierte Licht wird direkt gemessen. Daraus resultiert eine zwei bis drei Größenordnungen höhere Empfindlichkeit gegenüber den indirekten Absorptionsmessungen, bei denen die Differenzbildung mit einer Referenz erforderlich ist, da das nichtabsorbierte Licht gemessen wird [SCHMIDT, 1994].

Die Intensität der Fluoreszenz steht in verdünnten Lösungen im linearen Zusammenhang mit der Konzentration des Fluorophors, der neben stoffspezifischen Größen (z. B. der Quantenausbeute und dem molaren Absorptionskoeffizienten) auch von gerätespezifischen Größen abhängt (z. B. der Schichtdicke der Meßzelle). Daher wird die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) angegeben.

Bei einer Fluoreszenzmessung werden im Idealfall nur Fluorophore erfaßt, ohne daß andere Moleküle das Ergebnis beeinflussen. Diese Spezifität wird noch dadurch vergrößert, daß die Fluorophore sich durch unterschiedliche Anregungswellenlängen (Exzitation,  $E_x$ ) und Fluoreszenzwellenlängen (Emission,  $E_m$ ) unterscheiden.

### 2.2.2 Einflüsse auf die Fluoreszenz

In Tabelle 2.2 werden die vielfältigen Wechselwirkungen der Fluorophore mit ihrer Umgebung aufgelistet, die im Verlauf einer Kultivierung In-situ-Fluoreszenzmessungen beeinflussen. Bei höherer Temperatur kommt es zur Abnahme der Fluoreszenzintensität, da die Wahrscheinlichkeit von desaktivierenden Stößen mit anderen Molekülen wächst. Eine Protonierung biogener Fluorophore verändert häufig deren Fluoreszenzeigenschaften (Intensität, Lage der Fluoreszenzpeaks), was den Einfluß des pH-Wertes erklärt.

Gasblasen stören optische Messungen. Deshalb haben Begasung und Rührerdrehzahl Einfluß auf die Fluoreszenz. Auch Veränderungen von Dichte, Polarität und Viskosität des Mediums wirken sich aus. Im Verlauf von Kultivierungen können Fluorophore in unterschiedliche Lösungsumgebung gelangen (z. B. bei der Verwendung oder Entstehung von Emulsionen), was die Fluoreszenzeigenschaften verändern kann.

Durch das Wachstum von Zellen vergrößert sich die Trübung, und das Streulicht nimmt zu. Damit wird die Eindringtiefe des Anregungslichtes und auch die mittlere freie Weglänge des Emissionslichtes verringert. Fluoreszenzlöschung kann durch neutrale Moleküle (z. B. Sauerstoff), Anionen (z. B. Iodide, Bromide, Nitrate) oder Kationen (z. B.  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), aber auch durch Zellmembranen erfolgen. Vor allem gefärbte Medien liefern ein nach außen sichtbares Zeichen für Fluoreszenzlöschung durch vermehrte Absorption. Konzentrations-Fluoreszenzlöschung (*concentration quenching*) zeigt sich als Abnahme der RFI, wenn die Konzentration des Fluorophors oberhalb des Sättigungsbereiches liegt. Hierbei wirkt sich der *Inner-filter*-Effekt aus, denn bei hoher Fluorophorkonzentration wird das Anregungslicht so stark absorbiert, daß es von den Fluorophoren herausgefiltert und an einem tieferen Eindringen gehindert wird. *Inner-filter*-Effekte wirken sich besonders bei Küvettenmessungen aus.

Als Kaskadeneffekt wird die Reabsorption emittierter Fluoreszenzstrahlung zur Anregung weiterer Fluorophore verstanden, die eine geringere Konzentration des zuerst angeregten Stoffes vortäuscht. Fluoreszenzsignale können sich überlagern, und Fluoreszenzmaxima

können verschoben werden. Excimere entstehen aus Wechselwirkungen zwischen angeregten Monomeren und Molekülen im Grundzustand. Als Fluoreszenz-Photobleaching wird die Veränderung oder gar Zerstörung von Fluorophoren durch energiereiches Anregungslicht bezeichnet [UDENFRIED, 1964; Guilbault, 1973; ZANDER, 1981; ICHINOSE, 1991].

Tabelle 2.2: Einflüsse auf die Fluoreszenz

Temperatur
pH-Wert
Rührerdrehzahl, Begasung
Dichte, Polarität, Viskosität des Mediums
Lösungsmittel
Streulicht
Fluoreszenzlöschung
<i>Inner-filter</i> -Effekt
Kaskadeneffekt
Überlagerungen von Fluoreszenzsignalen
Dimeren- und Excimerenbildung
Photobleaching

### 2.2.3 Darstellung von Fluoreszenzspektren

Die Darstellung der RFI in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge bei gegebener, fester Anregungswellenlänge wird als Fluoreszenz-Emissionsspektrum (Abb. 2-1 a) bezeichnet, dieses Spektrum wird in der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie erhalten. Die Auftragung der RFI bei einer konstanten Emissionswellenlänge gegen die jeweilige Anregungswellenlänge führt zum Fluoreszenz-Exzitationsspektrum (Abb. 2-1 b). Werden beide Wellenlängen gleichzeitig in einem festen Frequenzabstand voneinander verändert (gescannt), so wird ein Synchronspektrum (Abb. 2-1 c) erhalten. Da sich diese Spektren in Form einer Kurve darstellen lassen, werden sie als eindimensionale Verfahren bezeichnet.

Bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wird der gesamte Anregungs- und Emissionsbereich erfaßt. Es werden bei verschiedenen äquidistanten Anregungswellenlängen Fluoreszenz-Emissionsspektren aufgenommen. Die 3D-Darstellung kann als Kontur-Plot (Abb. 2-1 d) mit Höhenlinien ähnlich einer topographischen Karte oder als anschauliches 3D-Diagramm (Abb. 2-2) erfolgen. Bereiche gleicher RFI erhalten den gleichen Farbton. Die niedrigsten RFI sind blau dargestellt, mit zunehmenden Intensitäten erfolgt ein Übergang über grün nach rot. In Abb. 2-1 d sind die „Schnitte“, aus denen sich die eindimensionalen Spektren ergeben, farblich dargestellt.

Im 3D-Diagramm können kleinere Peaks verdeckt werden, deshalb werden im folgenden die 2D-Fluoreszenzspektren meist als übersichtliche Kontur-Plots dargestellt. Sie erlauben eine schnelle Charakterisierung komplexer Fluorophorgemische. Einflüsse auf die Fluoreszenz einzelner Fluorophore können im Gesamtzusammenhang betrachtet werden. Überlagerungen und Verschiebungen von Fluoreszenzmaxima werden erkannt. Der Fingerabdruckcharakter von 2D-Fluoreszenzspektren erlaubt beispielsweise eine schnelle Identifizierung verschiedener Erdöle [MEINE, 1998].

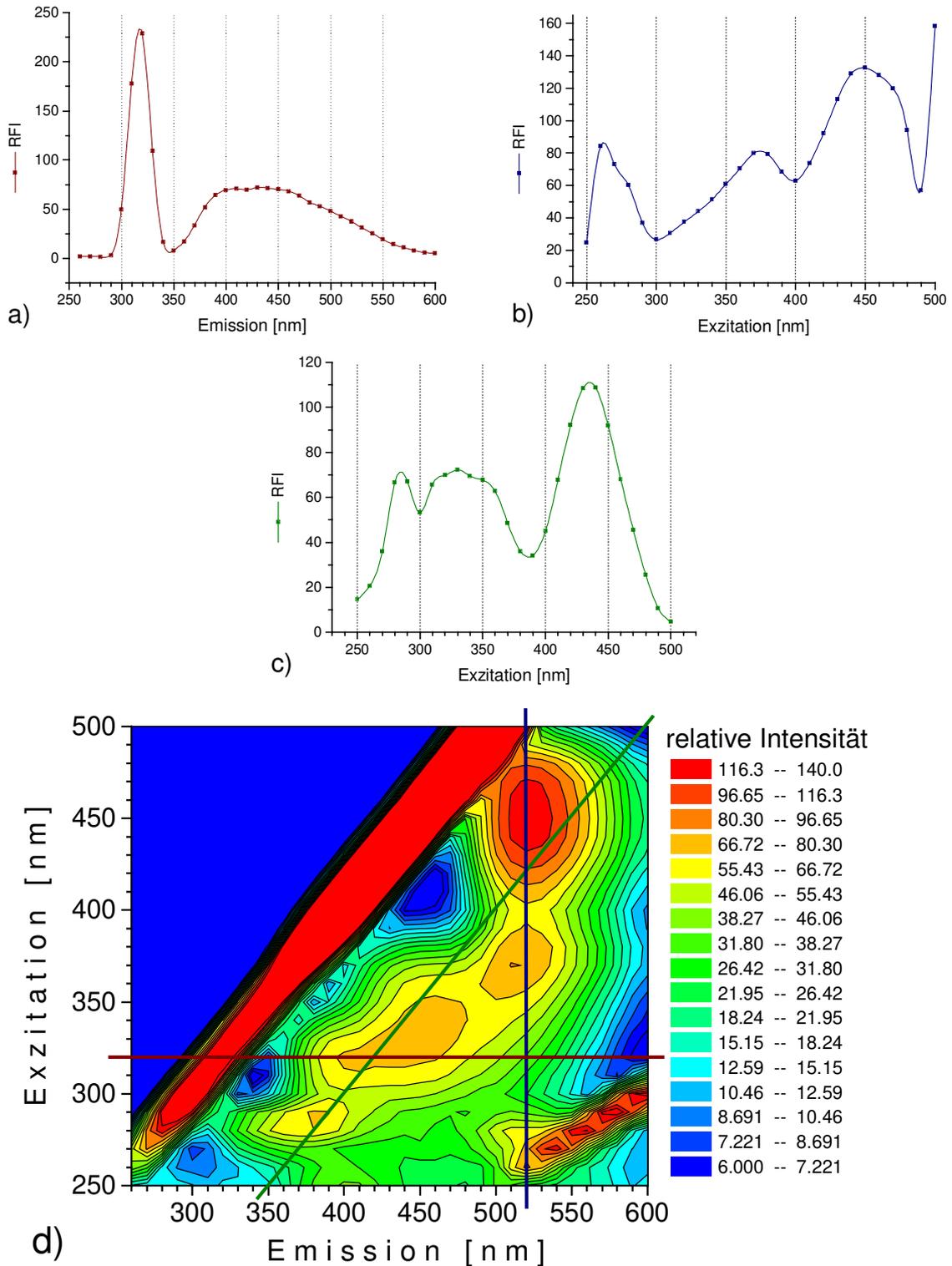


Abb. 2-1: a) Fluoreszenz-Emissionsspektrum bei  $\lambda_{Ex} = 320$  nm, b) Fluoreszenz-Exzitationspektrum bei  $\lambda_{Em} = 520$  nm, c) Fluoreszenz-Synchronspektrum  $\lambda_{Ex} = 250-500$  nm  $\lambda_{Em} = 260-600$  nm bei  $\Delta\lambda = 100$  nm, d) 2D-Fluoreszenzspektrum von  $3 \cdot 10^{-7}$  M Flavinmononucleotid (FMN),  $1 \cdot 10^{-6}$  M (L)-Tryptophan,  $1 \cdot 10^{-6}$  M Pyridoxin und  $1 \cdot 10^{-4}$  M Nicotinamadeninucleotid (NADH), aufgenommen mit Lichtleiter im 10-mL-Minireaktor, Spektrophotometereinstellungen siehe Tabelle 2.3

Einzelne RFI-Meßwerte werden als kleine Quadrate dargestellt. Die Einstellungen des für die Fluoreszenzspektren verwendeten Spektrophotometers F-4500 (Hitachi, Japan) sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Tabelle 2.3: Spektrophotometer-Einstellungen des F-4500 (Hitachi, Japan)

• Exzitationswellenlängenbereich	250-500 nm
• Emissionswellenlängenbereich	260-600 nm
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	12000 nm/s

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie wird in der Literatur nicht eindeutig bezeichnet. Weitere Begriffe sind „Totale Lumineszenz Spektroskopie“ [ROCH, 1994], „Dreidimensionale Fluoreszenzspektroskopie“ [SIEGEL 1985; KOLLER *et al.* 1986], „Multidimensionale Lumineszenz-Messung“ [WARNER *et al.* 1985], „Gesamtlumineszenzspektroskopie“ [SUTER *et al.* 1983] oder „Gesamtfluoreszenz“ [WOLFBEIS u. LEINER 1985]. Das 2D-Fluoreszenzspektrum wird auch als Exzitations-Emissions-Matrix (EEM) bezeichnet [ROCH, 1994].

2D-Fluoreszenzspektroskopie ist den eindimensionalen Techniken für qualitative Analysen überlegen, während letztere vor allem in der quantitativen Analytik eingesetzt werden. Der Zeitaufwand zur Aufnahme eines Spektrums ist in der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wesentlich größer. Bei gleicher zur Verfügung stehender Zeit kann mit 1D-Fluoreszenzspektroskopie mit höherer Präzision (geringere Auflösung und größeres Signal-Rausch-Verhältnis) gemessen werden. Noch besser wird die zur quantitativen Analytik notwendige Präzision bei der Reduzierung auf nur eine Anregungswellenlänge und eine Emissionswellenlänge. Diese Methode (Time-Scan) wird zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs von Prozessen (z. B. bei der Ermittlung von Enzymkinetiken) angewendet.

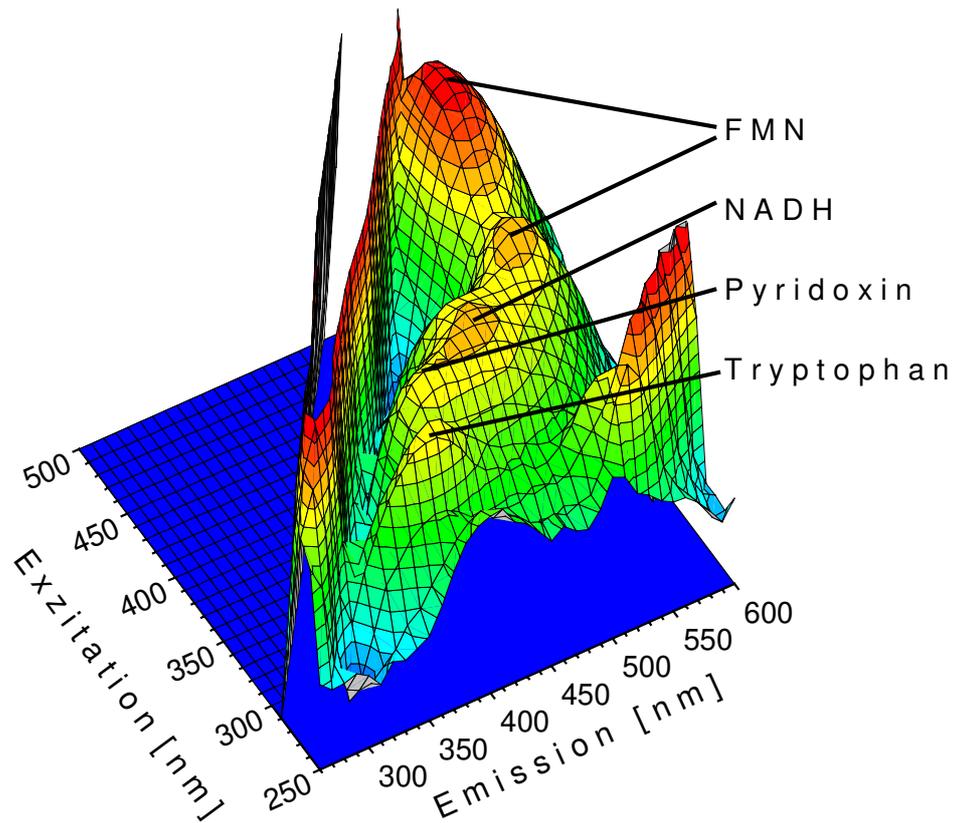


Abb. 2-2: 2D-Fluoreszenzspektrum aus Abb. 2-1 d) in 3D-Darstellung

In den 2D-Fluoreszenzspektren fällt besonders die RAYLEIGH-Streuung als intensive Diagonale gleicher Emissions- und Exzitationswellenlänge auf. Daneben taucht in Abb. 2-1 d und Abb. 2-2 auch bei zur Exzitationswellenlänge doppelten Emissionswellenlänge Streulicht auf. Dies entsteht durch höhere Streuordnungen der in den Monochromatoren verwendeten Gitter. Diese sind auch verantwortlich für scheinbare „Fluoreszenzintensitäten“ jenseits der Streulichtdiagonalen, also in einem Bereich, in dem die Emissionswellenlängen kleiner als die Exzitationswellenlängen sind. Streulichtintensitäten werden in relativen Intensitäten (RI) angegeben.

Fluoreszenz ist nicht lokal streng begrenzt, sondern sie äußert sich in einem Peak, der einen weiten Bereich abdeckt. Der Punkt dieses Peaks mit der höchsten RFI wird als Fluoreszenzmaximum bezeichnet. Wegen Überlagerungen ist vielfach nur eine Schulter zu erkennen (z. B. beim Pyridoxin in Abb. 2-1 d und Abb. 2-2). Zur Angabe des Wertepaares von Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge wird im folgenden für  $\lambda_{\text{Ex}}[\text{nm}] / \lambda_{\text{Em}}[\text{nm}]$  Ex / Em [nm] verwendet.

Eine Vielzahl physiologischer Moleküle zeigt sogenannte intrinsische Fluoreszenz, die im Gegensatz zur extrinsischen direkt biologischen Ursprungs ist. Die wichtigsten biogenen Fluorophore sind in Abb. 2-2 gekennzeichnet. In Tabelle 2.4 werden ihre Fluoreszenzmaxima aufgelistet. Im Vergleich zu den Literaturwerten der reinen Substanzen verschiebt sich in der Mischung die Lage der Fluoreszenzmaxima durch Überlagerungen (z. B. von NADH und Pyridoxin).

Tabelle 2.4: Fluoreszenzmaxima biogener Fluorophore

Fluorophor	Ex / Em [nm] in Abb. 2-1 d und Abb. 2-2	Ex / Em [nm] in der Literatur
FMN	370/520 450/520	365/520 450/530 [WOLFBEIS, 1985]
NADH	340/450	340/460 [GUILBAULT, 1973]
Pyridoxin	320/400	324/390 [FASMAN, 1976]
Tryptophan	290/380	287/348 [WOLFBEIS, 1985]

Die Coenzyme Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadeninucleotid (FAD) sind Derivate von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>). Wie Nicotinamidadeninucleotid(phosphat) (NAD(P)) sind auch die Flavincoenzyme Elektronen-Überträger. FMN nimmt als prosthetische Gruppe der NADH-Q-Reduktase, dem ersten Enzymkomplex in der Atmungskette, die vom NADH gelieferten Elektronen auf. FAD fluoresziert im gleichen Bereich wie Riboflavin und FMN nur etwa 10mal schwächer [WOLFBEIS, 1985]. FADH<sub>2</sub> wird zum Beispiel im Citratcyclus bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase gebildet. Als Bestandteil von Flavoproteinen liefert es Elektronen in die Atmungskette [STRYER, 1991]. Die Flavine fluoreszieren in der oxidierten Form (FMN, FAD), die Nicotinamid-Coenzyme dagegen in bei Kultivierungen verwendeten pH-Werten nur in der reduzierten Form (NAD(P)H). Während NADH zur Erzeugung von ATP dient, wird NADPH fast ausschließlich für reduktive Biosynthesen (z. B. für die Fettsäurebiosynthese) verwendet [STRYER, 1991]. Die Phosphatgruppe hat keinen Einfluß auf die Fluoreszenz, so daß sich NADH und NADPH fluorimetrisch nicht unterscheiden lassen. Pyridoxin (Pyr) ist auch unter der Bezeichnung Vitamin B<sub>6</sub> bekannt. Von den Aminosäuren weisen nur Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) eine ausgeprägte Fluoreszenz auf. In Proteinen ist meist nur noch die Tryptophanfluoreszenz detektierbar, die im Vergleich zur reinen Aminosäure zu geringeren Emissionswellenlängen (308-350 nm) verschoben ist [WOLFBEIS, 1985].

Eine Übersicht über verschiedene Fluorophore liefert SCHULMAN, 1985.

Fluoreszenzmessungen sind empfindlich genug, Fluorophore in lebenden Zellen zu detektieren [DUYSENS und AMESZ, 1957]. Neben vielen intrazellulären Fluorophoren können auch extrazelluläre simultan erfaßt werden [MAROSE *et al.*, 1998]. Die Bestimmungs- und die Nachweisgrenze sind abhängig vom jeweiligen Prozeß und lassen sich nicht absolut angeben. Wie empfindlich die durchgeführten Fluoreszenzmessungen sind, zeigen die in Abb. 2-1 d und Abb. 2-2 verwendeten Konzentrationen (bis  $3 \cdot 10^{-7}$  M). Mit gleicher Meßanordnung waren bei Küvettenmessungen nach Subtraktion des Hintergrundes biogene Fluorophore bis zu einer Konzentration von  $10^{-9}$  M eindeutig detektierbar [STÄRK, 1997]. Der Detektionsbereich erstreckt sich über mehrere Zehnerpotenzen. Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzspektroskopie reicht unter Anwendung von Hochleistungstechniken (z. B. der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie) bis zur Detektion einzelner Moleküle [RIGLER, 1995].

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Fluorometer

In Tabelle 3.1 wird ein Überblick über die verwendeten Fluorometer gegeben.

Tabelle 3.1: Verwendete Fluorometer

Gerätebezeichnung	Fluorosensor	F-4500	BioView
Hersteller	Ingold, Schweiz	Hitachi, Japan	Delta Light & Optics, Dänemark
Charakteristika	Fluoreszenz-Photometer zur Messung der NAD(P)H-abhängigen Kulturfluoreszenz	Fluoreszenzspektrophotometer geeignet für Emissions-, Exzitations- und Synchrospektren, Time-Scan und schnelle 2D-Fluoreszenzspektroskopie	Fluoreszenz-Photometer zur Prozeßkontrolle mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie
Lichtquelle	Niederdruck-Quecksilberlampe	150 W Xenonlampe (L2175, Hamamatsu, Japan)	gepulste Xenonlampe (Hamamatsu, Japan)
Lebensdauer der Lichtquelle	ca. 20000 h	ca. 3000 h	ca. 50000 h (bei 5 Messungen/s)
Wellenlängenbereich Exitation [nm]	360	200 - 730	270 - 550
Wellenlängenbereich Emission [nm]	440 - 460	200 - 730	310 - 590
Strahlengang	je ein Filter für Anregung und Emission, interner Lichtwellenleiter [LINDEMANN, 1994]	Gittermonochromator mit variabler Spaltbreite (2,5 - 20 nm), Küvette oder Lichtwellenleiter [MAROSE, 1995]	je ein Filterrad mit 16 Positionen für Anregung und Emission, Lichtwellenleiter [LINDEMANN, 1998]
Scangeschwindigkeit	Meßfrequenz 10 Hz	500 nm/s eine Messung je Wellenlänge	250 ms für einen Filterwechsel, 1 - 16 Messungen je Wellenlänge
Detektor	Photomultiplier		
relevante Meßpunkte je Spektrum	1	ca. 1050	ca. 112
Steuerung	Steuereinheit	Personalcomputer (PC) (Windows 3.1, Microsoft, USA)	Personalcomputer (PC) (Windows 95, Microsoft, USA)
weitere Besonderheiten			integrierte Software zur Prozeßauswertung, Datenübertragung optisch, in robuster Edelstahlbox

### 3.1.1 Fluorosensor

Im Fluorosensor (Abb. 3-1 a) wird zur Exzitation das von einer Niederdruck-Quecksilberlampe gelieferte Licht mit hohem UV-Anteil durch einen Filter mit enger Bandbreite auf ein Maximum bei 360 nm eingegrenzt. Das Fluoreszenzlicht passiert einen Filter mit einer Durchlaßbandbreite von 440-460 nm, bevor es auf den Photomultiplier trifft. Im Gerät werden Quarzlichtwellenleiter verwendet. Die Fluoreszenzsignale werden in der Steuereinheit verstärkt, und die Datenaufnahme erfolgt nach Umwandlung in einem Analog/Digital-Wandler (A/D-Wandler) über das Prozeßleitsystem. Der Sensorkopf, der die gesamte Optik enthält, wurde direkt im 19 mm Standardstutzen des Bioreaktors befestigt.

Der Fluorosensor ist auf den Fluoreszenzbereich des NAD(P)H beschränkt. In diesem eingeschränkten Meßbereich können Überlagerungen und Wechselwirkungen von Fluorophoren nicht erkannt werden. Die Interpretation der Meßdaten ist dadurch häufig schwierig, teilweise ganz unmöglich.

### 3.1.2 Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500

Im Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500 (Abb. 3-1 b) werden die Wellenlängen von Exzitation und Emission unabhängig voneinander mit Hilfe eines Gittermonochromators (Konkavgitter mit 900 Linien/mm) mit wählbarer Spaltbreite (2,5 nm; 5 nm; 10 nm oder 20 nm) eingestellt. Ein Strahlteiler lenkt einen Teil des Anregungslichts auf einen Referenzphotomultiplier, wodurch Intensitätsschwankungen an der Lichtquelle kompensiert werden. Ein Verschluß (*shutter*) sorgt dafür, daß die Probe nicht ständig angeregt wird. Die Gerätesteuerung und die Datenaufnahme erfolgen über einen Personal-Computer (PC). Für die kontinuierliche Datenaufnahme von Fluoreszenzspektren wurde das *Quick-Basic*-Programm „BioView“ [HILMER, 1996] verwendet.

Das F-4500 kann in kurzer Zeit (ca. 2 min) durch Installation einer Lichtwellenleiterhalterung in der Meßkammer für den Einsatz als Prozeßfluorometer umgerüstet werden [HILMER, 1996]. Da das F-4500 als Laborgerät entwickelt wurde, ist es für den industriellen Einsatz gegenüber Temperatur, Feuchtigkeit und mechanischer Belastung nicht robust genug.

Während der Fluorosensor und der BioView als Fluoreszenz-Photometer nur in bestimmten, durch Filtersysteme voreingestellten Wellenlängen messen können, lassen sich bei dem Fluoreszenzspektrophotometer F-4500 die Wellenlängen im Wellenlängenbereich frei wählen. Deshalb wurde dieses für grundlegende Untersuchungen bevorzugt angewendet.

### 3.1.3 BioView

Der BioView (Abb. 3-1 c) wurde speziell für den Einsatz in der industriellen Bioprozeßbeobachtung in dem EU-BriteEuram-Projekt BE-7991 in interdisziplinärer Zusammenarbeit entwickelt [MAROSE, 1998]. Die wasserdichte Edelstahlbox schützt den BioView vor Temperatureinflüssen, Feuchtigkeit und mechanischer Belastung (Abb. 3-1 c) speziell im industriellen Einsatz. Gegenüber elektromagnetischen Störungen ist er zusätzlich durch die optische Datenübertragung zu dem die Steuerung, Datenaufnahme und -interpretation durchführenden PC abgeschirmt, die eine Datenübertragung über einige hundert Meter ermöglicht.

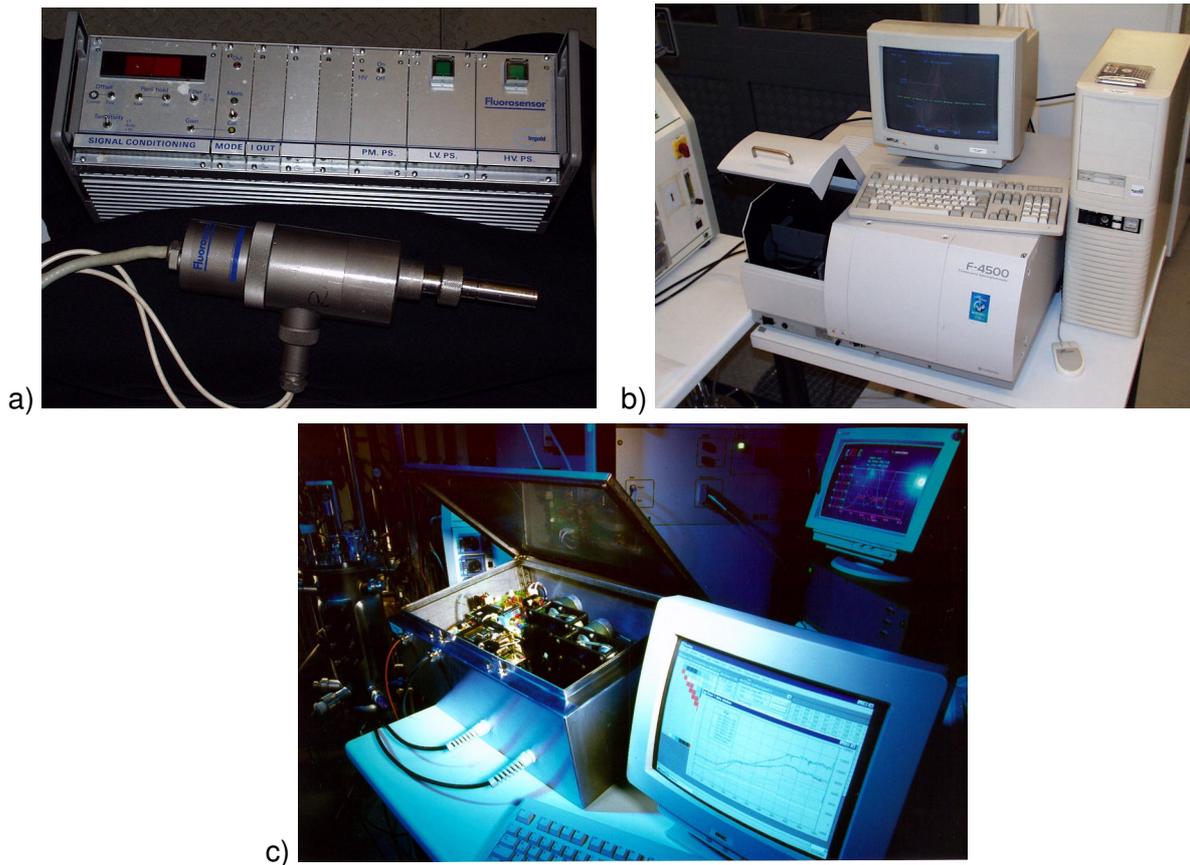


Abb. 3-1: Fotos a) vom Fluorosensor, b) vom F-4500 und c) vom BioView

Durch die Verwendung von zwei unabhängigen, rotierenden Filterrädern mit je 16 verschiedenen Filtern für das Exzitations- und Emissionslicht ist die Aufnahme eines 2D-Fluoreszenzspektrums möglich. Zur besseren Übersichtlichkeit werden in Abb. 3-2 nur 8 Filter je Filterrad gezeigt. Bis zu 16 Mehrfachmessungen sind in jeder Filtereinstellung möglich. Die Filter können individuell dem Prozeß angepaßt werden. Um den in Tabelle 3.1 angegebenen Meßbereich voll auszunutzen, wurden die Schmalband-Interferenzfilter mit 20 nm Bandbreite so gewählt, daß alle 20 nm eine Messung möglich ist. Die Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan) wird gepulst, um eine hohe Lichtintensität bei langer Lebensdauer der Lampe zu gewährleisten.

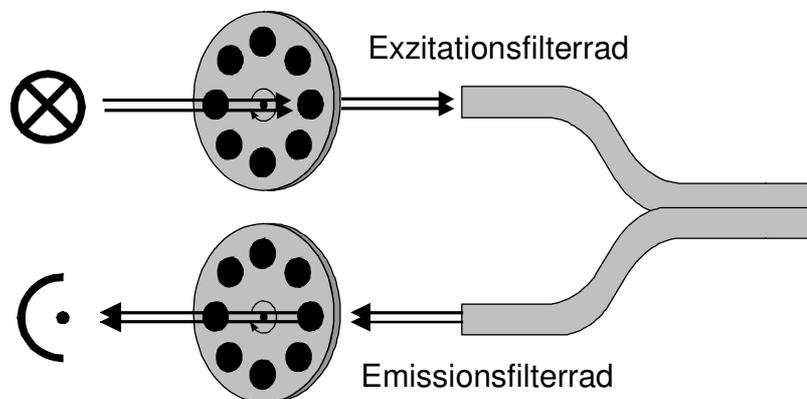


Abb. 3-2: Meßprinzip des BioView

Der BioView vereint die besonders für die quantitative Analyse bekannter Substanzen geeigneten Photometereigenschaften (feste Wellenlängen durch Filtereinstellung) mit der für qualitative Analytik notwendigen Übersicht von 2D-Fluoreszenzspektren. „Intelligent“ wird er durch eine integrierte Software, die eine Umrechnung der Fluoreszenzdaten auf Prozeßvariablen im laufenden Prozeß ermöglicht.

Abb. 3-3 zeigt 2D-Fluoreszenzspektren biogener Fluorophore im Gemisch, aufgenommen mit dem F-4500 (Abb. 3-3 a) und dem Bioview (Abb. 3-3 b). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Meßbereich des F-4500 dem des BioView angepaßt. Der höchste Peak liegt sowohl bei Verwendung des BioView als auch des F-4500 bei Ex 450 / Em 520 nm. Im Vergleich zum F-4500 wies das Spektrum des BioView bei den gewählten Einstellungen eine 19fache RFI auf und wurde zur Normierung durch diesen Faktor geteilt, um eine gleiche Skalierung zu ermöglichen. Mit demselben Lichtwellenleiter wurde die gleiche Lösung jeweils im 10-mL-Minireaktor aufgenommen. Beide Geräte brauchten für die Aufnahme eines Spektrums etwa 2 min. Die 2D-Fluoreszenzspektren in Abb. 3-3 wurden jeweils über drei Spektren gemittelt.

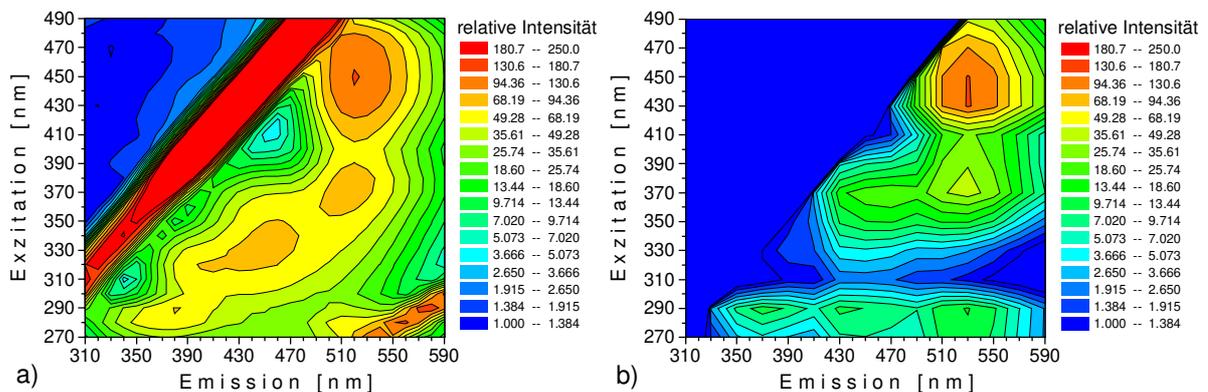


Abb. 3-3: 2D-Fluoreszenzspektren eines Fluorophorengemisches aufgenommen a) mit dem F-4500 und b) mit dem BioView, Konzentrationen der Fluorophore in Abb. 2-1, Einstellungen des F-4500 in Tabelle 2.2, Einstellungen des BioView: 4 Wiederholungen je Meßpunkt bei hoher Empfindlichkeit und einer Photomultipliereinstellung von 1000

Relativ zu dem höchsten Peak sind die Intensitäten der übrigen Peaks bei der Messung mit dem F-4500 wesentlich höher. Die Peaks im Spektrum des BioView bei Ex 290 / Em 430 nm und Ex 370 / Em 470 nm sind auf dem Spektrum des F-4500 nicht vorhanden. Dafür fehlen in dem Spektrum des BioView die im Spektrum des F-4500 sichtbaren Peaks bei Exzitationswellenlängen von 310 nm bis 350 nm. Streulicht wird mit dem BioView nicht detektiert. Bleibt jeweils ein Filterrad leer, können statt dessen bei komplettem Anregungslicht ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum und ohne Selektion der Emissionswellenlänge ein Fluoreszenz-Exzitationsspektrum erhalten werden. Da beim BioView kein Gittermonochromator verwendet wird, entstehen keine störenden höheren Streuordnungen oder scheinbare „Fluoreszenzintensitäten“ jenseits der Streulichtdiagonalen (Kap. 2).

Jede Filterposition führt zu neuen Meßbedingungen, die nicht direkt miteinander vergleichbar sind. So weisen offensichtlich die drei Exzitationsfilter bei 310 nm, 330 nm und 350 nm im Vergleich zu den anderen Filtern eine geringere Absorption auf. Für eine Zuordnung zu

biogenen Fluorophoren ist daher das F-4500 besser geeignet (Kap. 2). Bei der Betrachtung einzelner RFI-Verläufe stimmen die beiden Spektrometer überein (Daten nicht gezeigt).

Um Veränderungen während der Kultivierung zu erfassen, muß die Aufnahme eines 2D-Fluoreszenzspektrums schnell beendet sein. Durch die hohe Scangeschwindigkeit des F-4500 und den schnellen Wechsel der Filtrerräder beim BioView wird bei den in den Kultivierungen verwendeten Einstellungen nur etwa 1 min für die Aufnahme eines ganzen Spektrums benötigt. Die verwendeten Geräteeinstellungen werden in dem jeweiligen Kapitel angegeben.

Die Kalibration der verwendeten Fluorometer erfolgte mit Cumarinlösung (ethanolische 4-Amino-7-methyl-cumarin-Stammlösung, 0,2 mg/mL, [HILMER, 1996 und LINDEMANN, 1998]). Eine Datenkorrektur fand nicht statt.

## 3.2 Aufbau für Fluoreszenzmessungen

### 3.2.1 Fluoreszenzmessungen offline

Fotos der verwendeten Hilfsmittel für die offline durchgeführten Fluoreszenzmessungen werden in Abb. 3-4 gezeigt. Bei Küvettenmessungen wirkt sich der *Inner-filter*-Effekt (Kap. 2.2) besonders stark aus, da die Emission im Winkel von 90° zur Exzitation detektiert wird. Es wurde hauptsächlich die Makroküvette (Abb. 3-4 a Mitte) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Bei geringem Probenvolumen wurde die Mikroküvette (Abb. 3-4 a rechts) parallel zum Anregungslicht verwendet (Kap. 6.5). Für spezielle Anforderungen stand die Dreiecksküvette (Abb. 3-4 a links) zur Verfügung (Kap. 11.3). Da sämtliche Küvetten aus Quarzglas sind, ermöglichen sie im Vergleich zum für Online-Messungen verwendeten Flüssiglichtwellenleiter Messungen bei geringeren Wellenlängen (in Kap. 7.3 verwendet ab 230 nm).

Damit offline in geringem Volumen (ca. 10 mL) bei zur Kultivierung vergleichbaren Bedingungen mit Lichtwellenleiter gemessen werden kann, wurde der 10-mL-Minireaktor (Abb. 3-4 b) entwickelt (Werkstatt Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (TCI), technische Zeichnung in Kap. 14). Das doppelwandige Edelstahlgefäß ermöglicht eine Temperierung durch einen Wasserkreislauf. Im Inneren befindet sich ein Magnetrührstab. Im Deckel kann ein Temperaturfühler eingefügt und durch ein Septum injiziert werden. Der 10-mL-Minireaktor ist autoklavierbar.

Für Messungen mit Feststoffen wurde der Feststoffadapter (Werkstatt TCI, Abb. 3-4 c) verwendet (Kap. 7.3). Mit Hilfe einer Feststellschraube läßt sich der Abstand, bei dem die höchste RFI gemessen wird, justieren [BEUTEL, 1999].

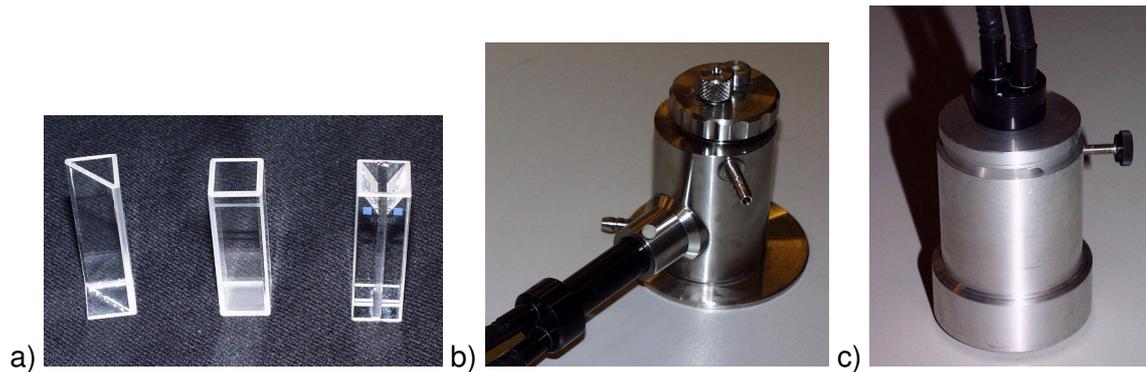


Abb. 3-4: Fotos a) von verschiedenen Küvetten, b) vom 10-mL-Minireaktor und c) vom Feststoffadapter

### 3.2.2 Fluoreszenzmessungen online

Ein zweiarmiger Flüssiglichtwellenleiter (Typ 300, Lumatec, Denzlingen) mit aktivem Durchmesser von 3 mm pro Lichtleiter und einem Öffnungswinkel von  $2\alpha = 72^\circ$  wurde für den BioView (Länge des Lichtwellenleiters 2 m) und das F-4500 (Länge des Lichtwellenleiters 1 m) verwendet [HILMER, 1996]. Die Messung des Fluoreszenzlichts erfolgt nach dem *Open-end*-Prinzip (im Winkel von  $180^\circ$  zum Anregungslicht), wodurch nur die Oberfläche vor dem Sensorkopf angeregt wird und sich dadurch Veränderungen in der Eindringtiefe des Anregungslichtes und Kaskaden- sowie *Inner-filter*-Effekte nicht so stark auswirken wie bei Küvettenmessungen.

Bei Kultivierungen im Glasreaktor wurden die Online-Fluoreszenzmessungen unter Verwendung der Durchflußzelle (Abb. 3-5 a) im Bypass durchgeführt (Kap. 4, 7 und 10). Die Durchflußzelle (Werkstatt TCI, [SCHEPER, 1991]) ist aus Edelstahl und wird im Inneren mit einem Magnetrührstab versehen. Eine Quarzglasscheibe ( $\varnothing = 22,4$  mm, Dicke 3 mm Spindler & Hoyer, Göttingen) trennt den Lichtwellenleiterkopf von dem mit hoher Pumpgeschwindigkeit (ca. 550 mL/min) vorbeiströmenden Kulturmedium.

In Kap. 5, 6 und 8 wurden die Fluoreszenzmessungen direkt im Reaktor durchgeführt. Der Lichtwellenleiter wurde mit Hilfe eines Adapters am 19 mm Standardstutzen an die Bioreaktoren angeschlossen. Wiederum ermöglichte eine Quarzglasscheibe ( $\varnothing = 16$  mm, Dicke 2 mm Spindler & Hoyer, Göttingen) das Anschließen und die Entnahme des Lichtwellenleiters bei laufendem Prozeß.

Zum Einsatz kamen Edelstahlrührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 L (Werkstatt TCI, [HILMER, 1996], Kap. 8), 2 L (Werkstatt TCI, Abb. 3-5 b, in Kap. 14 technische Zeichnung, Kap. 6) und 50 L (Typ U50K, B. Braun Diessel Biotech GmbH, Melsungen, Kap. 5).

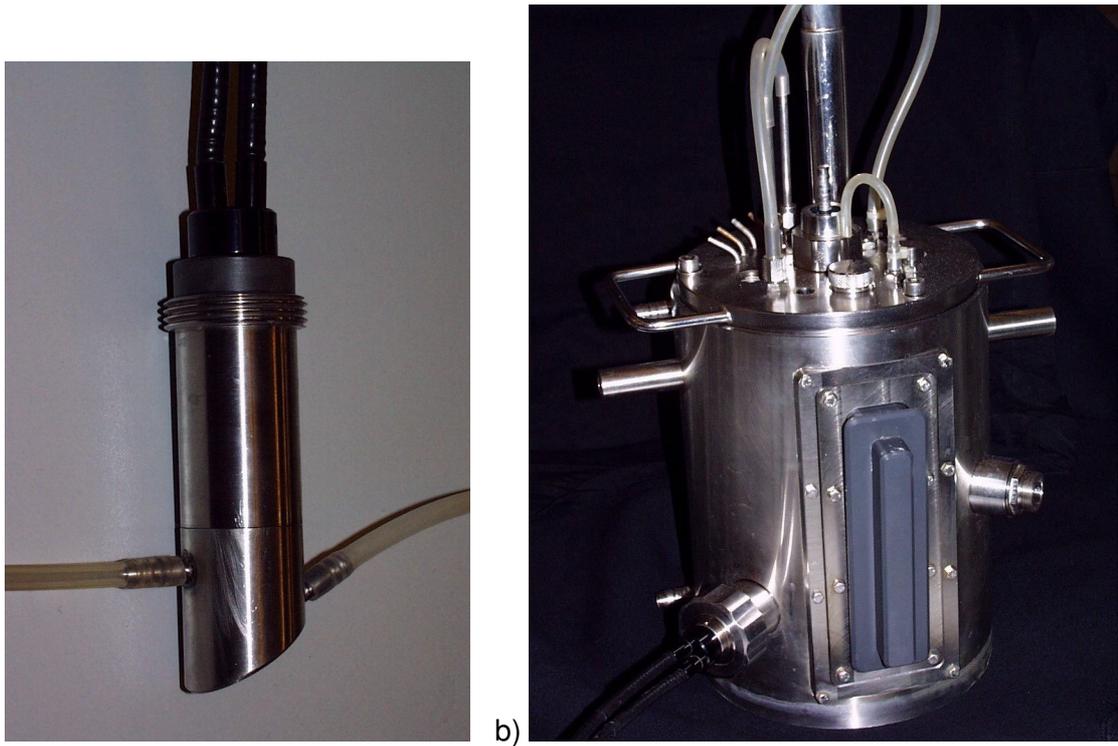


Abb. 3-5: Fotos a) von der Durchflußzelle, b) vom 2-L-Edelstahlrührkesselreaktor

Der Meßaufbau für In-situ-Fluoreszenzmessungen wird in Abb. 3-6 gezeigt.

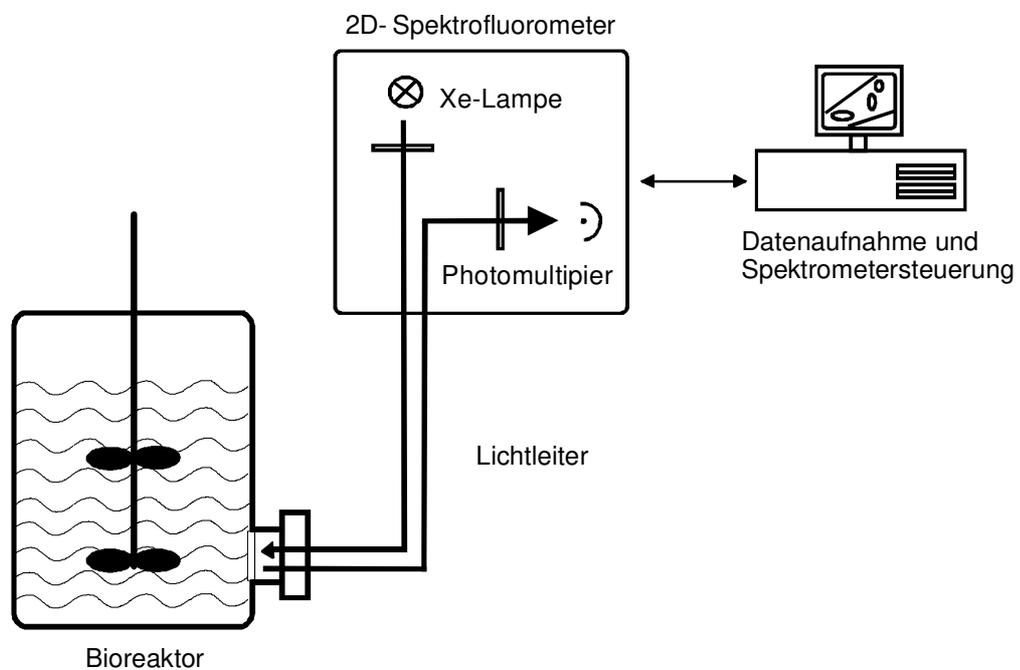


Abb. 3-6: Meßaufbau für In-situ-Fluoreszenzmessungen

### 3.3 Methoden der Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren

#### 3.3.1 Addition von 2D-Fluoreszenzspektren

Abb. 3-7 a zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum von NADH, Abb. 3-7 b das 2D-Fluoreszenzspektrum einer Mischung von Fluorophoren. Durch Addition der Spektren ergibt sich rechnerisch die Zusammensetzung aus Abb. 2-1. Im Unterschied zu diesem Spektrum zeigt das errechnete Summenspektrum (Abb. 3-7 c) neben weitestgehender Übereinstimmung Überlagerungen des NADH-Peaks mit den angrenzenden Peaks von Pyridoxin und FMN. Die durch das gelb gefärbte FMN erfolgende Fluoreszenzlöschung wird durch die rechnerische Addition nicht erfaßt. Im Idealfall sind im 2D-Fluoreszenzspektrum mehrere Komponenten nebeneinander ohne gegenseitige Beeinflussung detektierbar. Diese Selektivität wird zumindest annähernd in Abb. 3-7 gezeigt.

Die Addition von Spektren führt wie gezeigt zum Summenspektrum und findet auch für die Mittelung von 2D-Fluoreszenzspektren Verwendung, bei der nach der Addition durch die Anzahl der gemittelten Spektren geteilt wird. Die Subtraktion von Spektren führt zum Differenzspektrum, das in der Auswertung häufig verwendet wird, um Veränderungen im 2D-Fluoreszenzspektrum darzustellen.

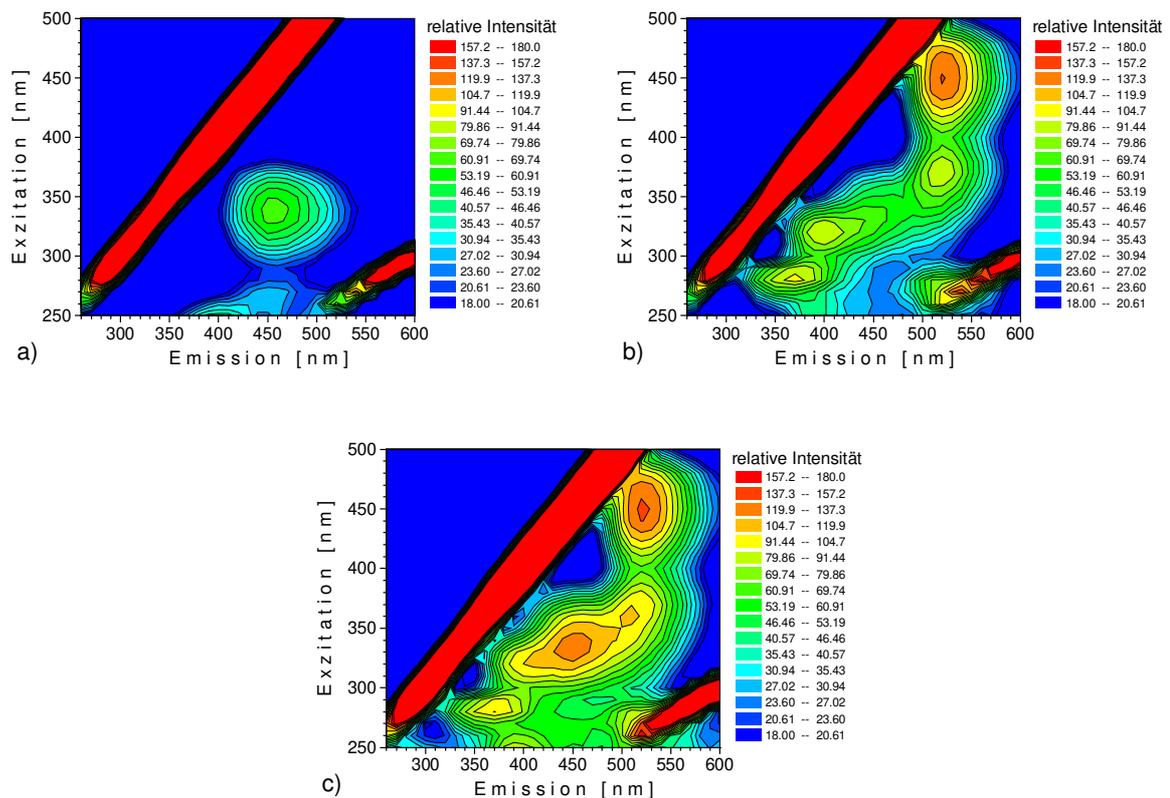


Abb. 3-7: a) 2D-Fluoreszenzspektrum von  $5 \cdot 10^{-5}$  M NADH, b) 2D-Fluoreszenzspektrum von  $3 \cdot 10^{-7}$  M FMN,  $1 \cdot 10^{-6}$  M (L)-Tryptophan,  $1 \cdot 10^{-6}$  M Pyridoxin und  $5 \cdot 10^{-5}$  M NADH, c) Summenspektrum {a) + b)} jeweils in KPP-Puffer (pH = 7) aufgenommen mit dem F-4500 (Konzentrationen aus Abb. 2.1, Spektrophotometereinstellungen aus Tabelle 2.2)

### 3.3.2 Auswertung von RFI-Verläufen

Abb. 3-8 zeigt ein 2D-Fluoreszenzspektrum (gemittelt aus drei Spektren) von der kontinuierlichen *E. coli*-Kultivierung aus Kap. 4 mit einer Verdünnungsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  und einem Sauerstoffgehalt in der Begasung von 9 %, nachdem sich nach sechs Verweilzeiten der stationäre Zustand eingestellt hatte (Spektrometereinstellungen in Tabelle 4.1). Ein Fluoreszenzpeak erstreckt sich jeweils über einen weiten Bereich. Da dieser von der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erfaßt wird, wurden bei der Auswertung Bereiche berücksichtigt. In der Umgebung der Kulturfluoreszenz der Proteine ist der Bereich Ex 270-300 / Em 330-380 nm schraffiert dargestellt. Er wird im folgenden als "schraffierter Bereich" gekennzeichnet. Im Verlauf der Arbeit erfolgt die Kennzeichnung von Bereichen stets in Anführungszeichen.

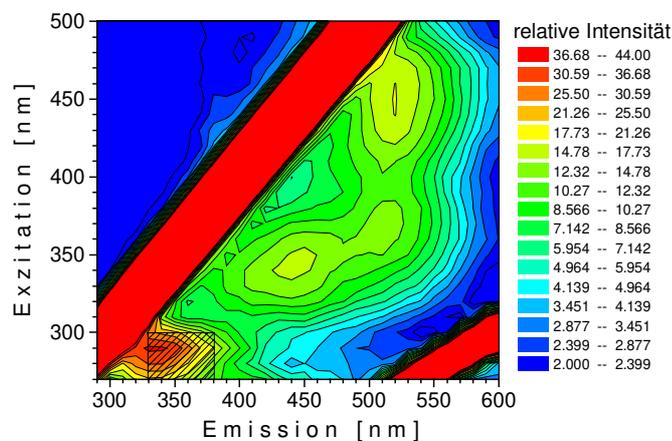


Abb. 3-8: 2D-Fluoreszenzspektrum im stationären Zustand einer kontinuierlichen *E. coli*-Kultivierung mit einer Verdünnungsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  und einem Sauerstoffgehalt in der Begasung von 9 %

Zur Ermittlung der Streuung wurde in einem Zeitraum von 2,5 h alle 5 min ein 2D-Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Über diesen Zeitraum werden in Abb. 3-9 die Verläufe der RFI in den Maxima des Bereiches der Kulturfluoreszenz der Proteine bei Ex 290 / Em 330 nm und Ex 290 / Em 340 nm und der im "schraffierten Bereich" gemittelten RFI gezeigt. Die Skalierung erfaßt jeweils 15 relative Einheiten. Wie in allen folgenden Spektren auch werden einzelne oder bereichsgemittelte RFI als kleines Quadrat dargestellt. Die Linien werden mit der *adjacent-average*-Funktion der Software Origin (Microcal, USA) erhalten. Über wieviele Meßpunkte jeweils gemittelt wird, ist im zugehörigen Text beschrieben. Die Linien in Abb. 3-9 wurden durch zeitliche Mittelung über fünf Punkte erhalten. Es ist deutlich zu erkennen, daß durch Mittelung über den Bereich im Vergleich zu den Fluoreszenzmaxima der RFI-Verlauf eine wesentlich geringere Streuung aufweist.

Mathematisch definiert ist die Streuung  $\sigma$  (Standardabweichung), die die Präzision der Messung angibt, als Wurzel der Varianz var (Dispersion, Streuungsquadrat):

$$\sigma = \sqrt{\text{var } X}$$

wobei gilt:  $\text{var } X = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$ , n ist die Anzahl der Werte X,  $\bar{X}$  der Mittelwert.

Tabelle 3.2 zeigt den Mittelwert, die Streuung und die Streuung in % vom Mittelwert der Verläufe aus Abb. 3-9. Die Schwankungen der RFI betragen prozentual vom Mittelwert - nach der Durchführung der Bereichsmittelung - etwa die Hälfte im Vergleich zu den RFI-Verläufen in den Fluoreszenzmaxima. Die betrachteten Messungen wurden in einem für Fluoreszenzmessungen idealen Medium ohne Feststoffanteil (abgesehen von den Zellen), blasenfrei in der Durchflußzelle im Bypass durchgeführt. Extremere ist die Auswirkung der Bereichsmittelung noch bei größeren Störeinflüssen auf die Fluoreszenz (deutlich sichtbar z. B. im Unterschied von Abb. 4-2 und Abb. 4-3).

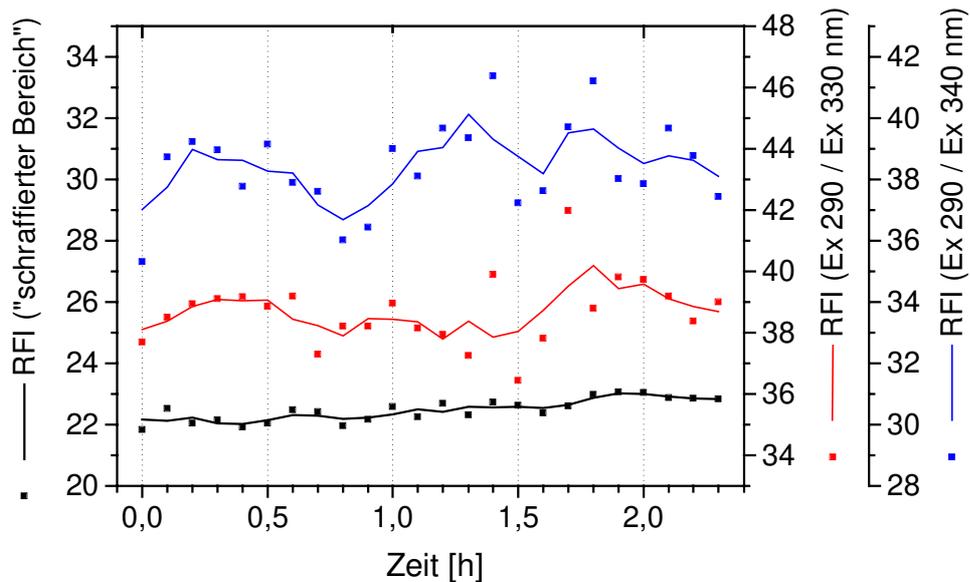


Abb. 3-9: Verlauf der RFI gemittelt über den "schraffierten Bereich", bei Ex 290 / Em 330 nm und bei Ex 290 / Em 340 nm im Verlauf des stationären Zustands einer kontinuierlichen *E. coli*-Kultivierung

Tabelle 3.2: Mittelwert, Streuung und Streuung in % vom Mittelwert der Verläufe aus Abb. 3-9

n = 24	Mittelwert	$\sigma$	Streuung in % vom Mittelwert
"schraffierter Bereich"	22,5	0,37	1,7
Ex 290 / Em 330 nm	38,7	1,11	2,9
Ex 290 / Em 340 nm	38,4	1,45	3,8

Die zeitliche Mittelung über fünf Werte kann bei einem Meßintervall von 15 min zu einer Mittelung über 1,25 h führen. Die geringere Streuung der Meßwerte geht deutlich auf Kosten der zeitlichen Auflösung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie. Eine exakte Bestimmung von Zeitpunkten durch direkte Informationen aus der Zelle kann durch die zeitliche Mittelung der RFI stark eingeschränkt werden, während durch die Bereichsmittelung die zeitliche Auflösung nicht beeinträchtigt wird. In Kombination mit der zeitlichen Mittelung kann die Streuung gegebenenfalls noch weiter minimiert werden.

Eine weitere Technik zur Auswertung von RFI-Verläufen ist die Bildung des Verhältnisses (Quotienten) von zwei RFI-Verläufen, worauf in Kap. 4 näher eingegangen wird.

### 3.4 Bestimmung von Wachstumsparametern

#### Wachstumsrate

In der exponentiellen Wachstumsphase einer Batch-Kultur ist die Wachstumsgeschwindigkeit als Änderung der Biomasse ( $X$ ) mit der Zeit ( $t$ ) definiert:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Die Konstante  $\mu$  wird als spezifische Wachstumsrate bezeichnet.

Im stationären Zustand bei kontinuierlichen Kultivierungen wird der Zellverlust beim Abfluß durch die Wachstumsrate ausgeglichen. Als Verdünnungsrate  $D$  wird der Zufluß, bezogen auf das Reaktorvolumen, verstanden. Unter der Voraussetzung  $D < \mu_{\max}$  gilt im Fließgleichgewicht  $D = \mu$ . Wird  $D > \mu_{\max}$ , so wird mehr Biomasse entfernt als nachwachsen kann. Die Mikroorganismen werden ausgewaschen.

#### Respiratorischer Quotient (RQ)

Das Verhältnis von Kohlendioxidbildungs- (CPR) und Sauerstoffaufnahme (OUR) wird als respiratorischer Quotient (RQ) bezeichnet.

$$\text{OUR} = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{\text{O}_2}^E - \frac{1 - x_{\text{O}_2}^E - x_{\text{CO}_2}^E}{1 - x_{\text{O}_2}^A - x_{\text{CO}_2}^A} \cdot x_{\text{O}_2}^A \right\}, \text{CPR} = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{\text{CO}_2}^A \cdot \frac{1 - x_{\text{O}_2}^E - x_{\text{CO}_2}^E}{1 - x_{\text{O}_2}^A - x_{\text{CO}_2}^A} - x_{\text{CO}_2}^E \right\}$$

$$\text{RQ} = \frac{\text{CPR}}{\text{OUR}}$$

Bezeichnet wurden mit

$f_E$ : Volumenstrom des eintretenden Gases [L/h]

$V_M$ : Molvolumen des idealen Gases 22,41 L/mol

$V_R$ : Arbeitsvolumen [L]

$x_{\text{O}_2}^E$ : Molenbruch des Sauerstoffs im Gaseintritt

$x_{\text{O}_2}^A$ : Molenbruch des Sauerstoffs im Gasaustritt

$x_{\text{CO}_2}^E$ : Molenbruch des Kohlendioxids im Gaseintritt

$x_{\text{CO}_2}^A$ : Molenbruch des Kohlendioxids im Gasaustritt.

Bezogen auf die Biomasse  $X$  werden die spezifische Kohlendioxidbildungsrate ( $q_{\text{CO}_2}$ ) und die spezifische Sauerstoffaufnahme ( $q_{\text{O}_2}$ ) erhalten.

$$q_{\text{CO}_2} = \frac{\text{CPR}}{X}, \quad q_{\text{O}_2} = \frac{\text{OUR}}{X}$$

## 4 Untersuchungen von Stoffwechselflüssen bei unterschiedlicher Sauerstoffversorgung in Batch- und Chemostat-Kultivierungen von *Escherichia coli*

### 4.1 Theorie des *metabolic engineering*

Während in der Biotechnologie der technische Nutzen der Organismen im Vordergrund steht, ist der Stoffwechsel mit seinem verzweigten Netzwerk von ungefähr 1000 enzymkatalysierten Reaktionen [BAILEY, 1991] primär auf die Bedürfnisse des Organismus ausgelegt. Um mit Hilfe von Mikroorganismen Produkte wie Antibiotika, Vitamine oder Enzyme herzustellen, ist es häufig notwendig, Stoffwechselflüsse von der Biomassegewinnung in Richtung auf das gewünschte Produkt umzuleiten. Dieses Ziel verfolgt das *metabolic engineering* ("Stoffwechselgestaltung"). Oft ermöglicht erst eine genaue Kenntnis der relevanten Stoffwechselwege eine effiziente technische Produktion.

Mit der Analyse von Stoffwechselflüssen (*metabolic flux analysis*), die auf einem stöchiometrischen Modell basiert, werden die Stoffflüsse in einer lebenden Zelle durch die Stoffwechselwege quantitativ beschrieben [VARMA und PALSSON, 1995]. Damit können Engpässe im Stoffwechsel sichtbar gemacht und optimale Prozeßbedingungen oder Fütterungsstrategien für einen Produktionsprozeß vorausgesagt werden [VARMA und PALSSON, 1994 a und b].

Besonders empfindlich reagiert der Metabolismus auf Veränderungen in der Sauerstoffversorgung. Anhand von Batch-Kultivierungen im kontinuierlichen Betrieb (Chemostat) mit unterschiedlichen Sauerstoffanteilen in der Begasung sollen die Möglichkeiten, die die 2D-Fluoreszenzspektroskopie im Rahmen des *metabolic engineering* bietet, untersucht werden.

### 4.2 Verwendete Mikroorganismen

Die Kultivierungen werden mit zwei verschiedenen Stämmen durchgeführt, die Derivate des apathogenen K-12-Stammes von *Escherichia coli* W3110 sind. *E. coli* ist ein gerades, stäbchenförmiges, fakultativ-anaerobes und gram-negatives Bakterium, das auch in der menschlichen Darmflora vorkommt [PRAEVE, 1994]. Es hat einen Durchmesser von ca. 1 µm, eine Länge von ca. 2-4 µm und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*.

Die Stammbezeichnung des verwendeten plasmidfreien Wildtypstamms *E. coli* LJ110 lautet: F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> In[*rrnD-rrnE*]1 rph prototroph Fnr<sup>+</sup> RpoS<sup>+</sup>. Er stammt vom Arbeitskreis von PROF. LENGELER der Universität Osnabrück.

Bei dem Stamm *E. coli* IMW107 ist die Ausbildung des Regulatorproteins ArcA inaktiviert worden. Das Gensymbol *arc* steht für aerobic respiration control [HESSE, 1998]. Dieses ArcA-Protein gehört zu einem 2-Komponentenregulationssystem (ArcA/ArcB-System), welches regulativ für die Expression einer Reihe von Enzymen des aeroben Stoffwechsels verantwortlich ist. Dieser Stamm wurde von PROF. UNDEN von der Johannes Gutenberg-Univer-

sität Mainz zur Verfügung gestellt. Er trägt die Stammbezeichnung LJ110 mit *arcA1 zjj::Tn10* (Tet<sup>r</sup>). Diese Mutante besitzt eine Tetracyclinresistenz.

### 4.3 Kultivierungsbedingungen und durchgeführte Analytik

Die Kultivierungen wurden durchgeführt von HESSE (Arbeitskreis KRETZMER) im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover [HESSE, 1998].

Tabelle 4.1: Kultivierungsbedingungen

◆ <b>Betriebsweise</b>	Batch
◆ <b>Organismus</b>	<i>E. coli</i>
◆ <b>Kultivierungsanlage</b>	2-L-Reaktor (Typ Biostat M, B. Braun Biotech International, Melsungen)
◆ <b>Arbeitsvolumen</b>	1,6 L
◆ <b>Meßdatenerfassung</b>	Labtech Notebook (Version 7.11, Laboratory Technologies Corp., USA) Meßdatenerfassung von 2 Hz
◆ <b>Medium</b>	Minimalmedium (Kap. 14)
◆ <b>Temperatur</b>	37°C
◆ <b>pH</b>	6,7
◆ <b>Begasungsrate</b>	1 vvm (1,6 L/min)
◆ <b>Rührerdrehzahl</b>	900 UpM

Die Regelung des pH-Wertes erfolgte über die Regeleinheit des Biostaten. Zur Korrektur wurden 5 N Natronlauge und 5 N Phosphorsäure verwendet.

Die Online-Messungen der OD<sub>578</sub> und Kulturfluoreszenz mit dem Fluorosensor (Kap. 3) und dem F-4500 (Kap. 3) wurden im Bypass (Totvolumen von 120 mL) durchgeführt. Eine vorgeschaltete Blasenfalle ermöglichte eine weitestgehend blasenfreie Durchführung dieser optischen Messungen. Anschließend gelangte ein Teilstrom zum Durchflußphotometer (Novaspec, Pharmacia, Schweden). Um den Einfluß der Sauerstofflimitierung im Bypass zu minimieren und um ein Wachstum der Zellen an den Schlauchwandungen zu verhindern, wurde das Kulturmedium mit einem Volumenstrom von 650 mL/min mit einer Schlauchquetschpumpe (Watson-Marlow) durch den Bypass gepumpt. Das Kulturmedium in der Blasenfalle und in den Durchflußzellen für die Fluorosensoren wurde zusätzlich mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt, um potentiell Wachstum an den Wandungen zu unterbinden und eine homogene Probe zu gewährleisten.

Die Einstellungen des Fluoreszenzspektrophotometers F-4500 sind in Tabelle 2. angegeben.

Tabelle 4.2: Spektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	270-500 nm
• Emissionswellenlängenbereich	290-600 nm
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
• Exzitations- Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	30000 nm/s
• Aufnahme-Intervall	5 min

Durch das Mischen von Sauerstoff, Druckluft und Stickstoff wurden unterschiedliche Sauerstoffanteile in der Begasung eingestellt (Tabelle 4.3). Die Kultivierung mit 0 % Sauerstoffan-

teil in der Begasung wurde mit *E. coli* LJ110 durchgeführt, in den übrigen Kultivierungen wurde *E. coli* IMW 107 verwendet.

Tabelle 4.3: Unterschiedliche Sauerstoffanteile in der Begasung

Begasungsrate	Sauerstoffanteil in der Begasung
1 vvm	36,7 %
	20,9 %
	14,4 %
	9,7 %
	0,0 %

Zur Durchführung der kontinuierlichen Betriebsweise wurde frisches Vorratsmedium mit einer durch eine Waage überwachten Zuflußrate in den Reaktor gepumpt. Das zellhaltige Kulturmedium wurde kontinuierlich aus dem Reaktor in das Erntegefäß abgeführt. Jeweils 20 L Zufütterungsmedium wurden 95 min bei 121°C autoklaviert. Über Schnellkupplungen wurden steril Glucose, Magnesiumsulfat und deionisiertes Wasser (zum Ausgleichen des Wasserverlustes beim Autoklavieren des Mediums) hinzugefügt, die separat 25 min bei 121°C autoklaviert wurden. Das Antischaummittel (Antispumin SP1, Goldschmidt) wurde dem Vorratsmedium vor dem Autoklavieren zugegeben. Die Kultivierungsbedingungen entsprechen sonst denen der Batch-Kultivierungen. Ein stationärer Zustand wurde meist nach 6 Verweilzeiten erreicht.

## 4.4 Begasungs-Shift-Experiment

Der Einfluß unterschiedlicher Sauerstoffversorgung auf den Metabolismus von *E. coli* soll mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Dafür wurde im Anschluß an eine kontinuierliche *E. coli*-Kultivierung mit dem Wildtyp *E. coli* LJ110 ein Begasungs-Shift-Experiment durchgeführt.

Bei einer Verdünnungsrate von 0,303 h<sup>-1</sup> wurde die Begasung mit 36,7 % Sauerstoffanteil für eine Stunde auf 20,9 % Sauerstoffanteil erniedrigt, anschließend wurde eine halbe Stunde mit Stickstoff begast, bevor wieder die Ausgangsbegasung (Sauerstoffgehalt 36,7 %) eingestellt wurde.

### 4.4.1 Wechsel der Begasung von aeroben zu anaeroben Bedingungen

Die 2D-Fluoreszenzspektren bei 36,7 % (vor dem Begasungs-Shift-Experiment) und 0 % Sauerstoffanteil in der Begasung (Abb. 4-1 a und b) unterscheiden sich nur wenig. Sie weisen Maxima bei Ex 290 / Em 340 nm, Ex 350 / Em 440 nm, Ex 400 / Em 480 nm und Ex 440 / Em 520 nm auf. Erst im Differenzspektrum (Abb. 4-1 c) werden die Unterschiede in den RFI durch den Wechsel der Begasung von aeroben zu anaeroben Bedingungen deutlich. In vorwiegend drei Bereichen führen Veränderungen in den Fluoreszenzspektren beim Wechsel zu anaeroben Bedingungen zu Peaks im Differenzspektrum. Die RFI ("Bereich 1") und die RFI ("Bereich 3") nehmen ab, die RFI ("Bereich 2") zu. Im Streulichtbereich nimmt die Intensität beim Übergang zu anaeroben Bedingungen größtenteils ab.

Im Vergleich mit Literaturdaten und Abb. 2-1 lassen sich die Bereiche bestimmten biogenen Fluorophoren zuweisen (Tabelle 4.4).

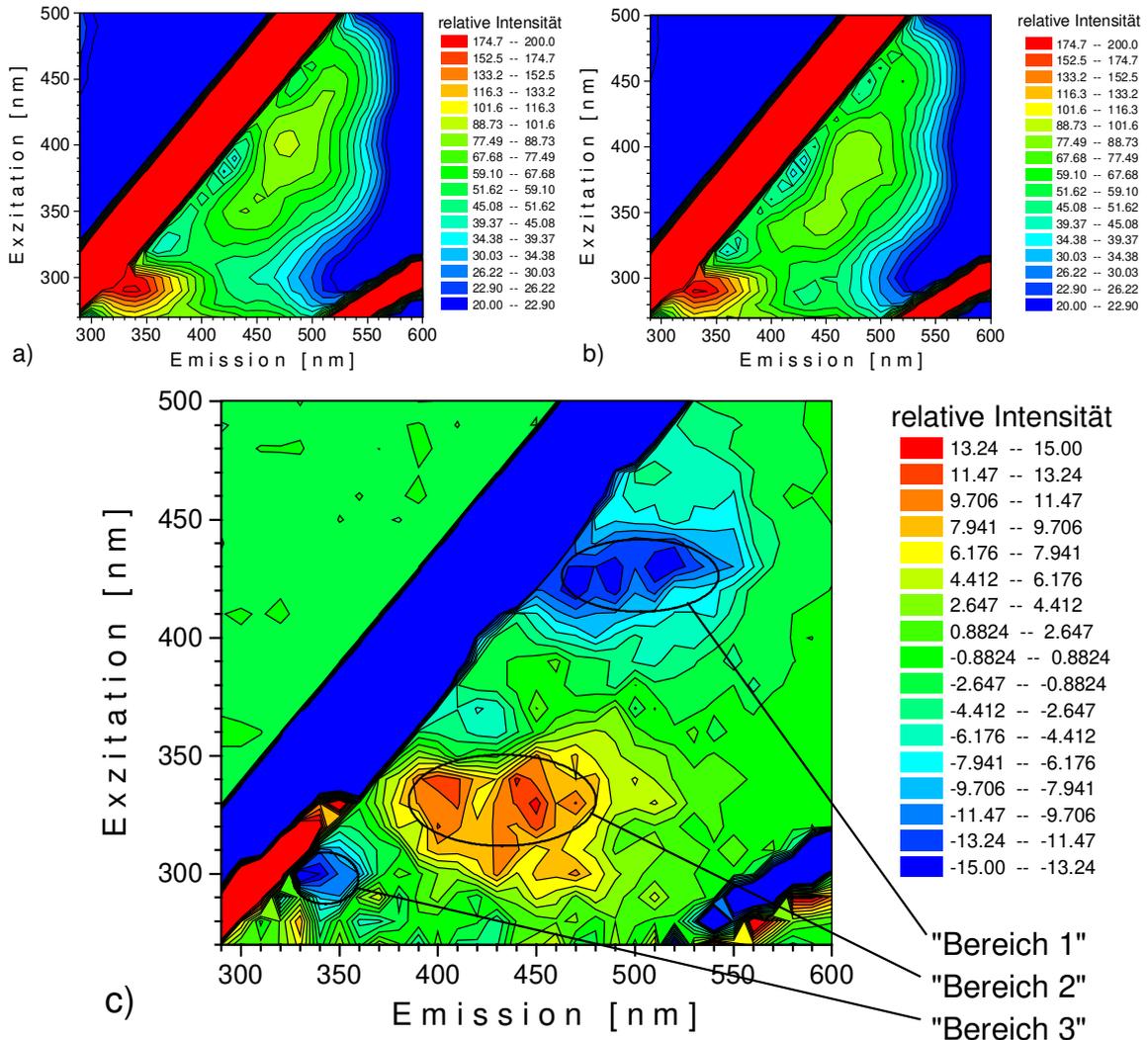


Abb. 4-1: 2D-Fluoreszenzspektren a) bei 36,7 % Sauerstoffanteil in der Begasung (aerob), b) 0 % (anaerob) und c) Begasungs-Shift Differenz-Spektrum (2D-Fluoreszenzspektrum b minus a)

Tabelle 4.4: Auswahl von Wellenlängenpaaren in den Fluoreszenzbereichen von Abb. 4-1 c

Bereich	"Bereich 1"	"Bereich 2"	"Bereich 3"
RFI-Peak Ex / Em [nm]	430/520	340/440	290/330
Art des Peaks	Abnahme	Zunahme	Abnahme
zugeordnete biogene Fluorophore	Riboflavin, FMN und FAD	NAD(P)H	Tryptophan (Tyrosin)
Literaturwerte Ex / Em [nm]	450/530	340/460	290/350 (275/300)
Literaturzitat	WOLFBEIS, 1985		
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich Ex / Em [nm]	430/490-560 440/510-520	330/430 330/450 340/440-460 350/440-450	280-290/330 280-300/340 280-310/350
Bereichsbezeichnung	"ox"	"red"	"Protein"

Als Literaturwerte sind jeweils die Fluoreszenzmaxima der reinen Substanzen angegeben. Im Differenzspektrum wurden in den drei Fluoreszenzbereichen relevante Wellenlängenpaare ausgewählt, deren RFI-Verläufe in Kap. 4.4.2 dargestellt werden. Als Bezeichnung für den Bereich der oxidierten Coenzyme FMN und FAD wird im Folgenden "ox" verwendet, der Bereich der NAD(P)H-Kulturfluoreszenz wird als "red" bezeichnet, der Kulturfluoreszenzbereich von Tryptophan und Tyrosin mit "Protein".

#### 4.4.2 Metabolische Veränderungen nach dem Begasungswechsel

Die durch das nach 2,9 h beendete Begasungs-Shift-Experiment ausgelösten metabolischen Veränderungen wurden für einen Zeitraum von 3 h fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. RFI-Verläufe in den Peakmaxima der Bereiche "ox" und "red" aus Tabelle 4.4 weisen sehr große Schwankungen auf (farbige Quadrate in Abb. 4-2). Auch nach zeitlicher Mittelung von jeweils fünf Werten ist der gegenläufige Verlauf nur zu erahnen (Kurvenverlauf in Abb. 4-2). Wesentlich weniger stark gestreut und aussagekräftiger ist der RFI-Verlauf in Abb. 4-3. Von den aus Abb. 4-1 c ausgewählten Wellenlängenpaaren (Tabelle 4.4) wurden Mittelwerte in den einzelnen Bereichen gebildet, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu maximieren. Die kleinen Quadrate geben die mittleren Meßwerte wieder, die geglätteten Kurven entstanden wiederum durch Mittelung von jeweils fünf Werten. Die Fluoreszenzdaten sollen verglichen werden mit dem Verlauf relevanter Prozeßgrößen. Gelöstsauerstoff ( $pO_2$ ) und  $CO_2$  im Abgas schwanken sehr stark (von 35 bis 75 % bzw. 1,00 bis 1,43 %) und verlaufen gegenläufig. Auch die RFI in den einzelnen Bereichen verlaufen gegenläufig. In Übereinstimmung mit dem Differenzspektrum (Abb. 4-1 c) liegt wiederum im Maximum von Bereich "ox" das Minimum des Bereich "red" und umgekehrt. Während der Verlauf der RFI im von den oxidierten Coenzymen FMN und FAD geprägten Fluoreszenzbereich "ox" deutliche Parallelen zum  $pO_2$ -Verlauf aufweist, ähnelt die RFI im vom reduzierten NAD(P)H beeinflussten Bereich "red" dem Verlauf des  $CO_2$ -Verlaufes im Abgas. Im dritten Diagramm der Abb. 4-3 wurde der Verlauf des Verhältnisses der relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) im Bereich "ox" und im Bereich "red" aufgetragen. Die einzelnen Werte weisen nur noch sehr geringe Streuung von der geglätteten Kurve auf. Der Verlauf zeigt deutliche Übereinstimmung mit dem des  $pO_2$ -Gehaltes. Die RFI im Kulturfluoreszenzbereich der Proteine fällt bis zu dem  $pO_2$ -Minimum bei 5,1 h ab und steigt danach wieder an.

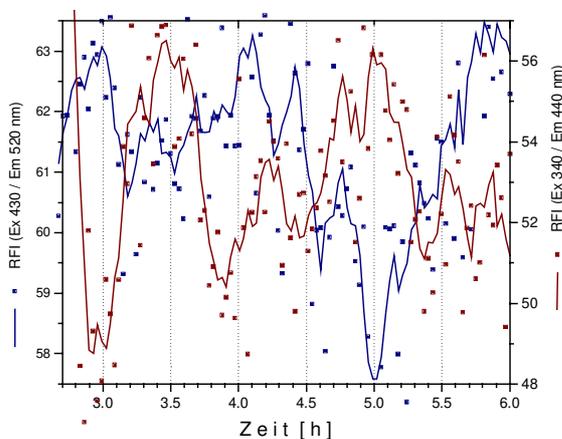


Abb. 4-2: Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) bei Ex 430 / Em 520 nm und Ex 340 / Em 440 nm im Begasungs-Shift-Experiment

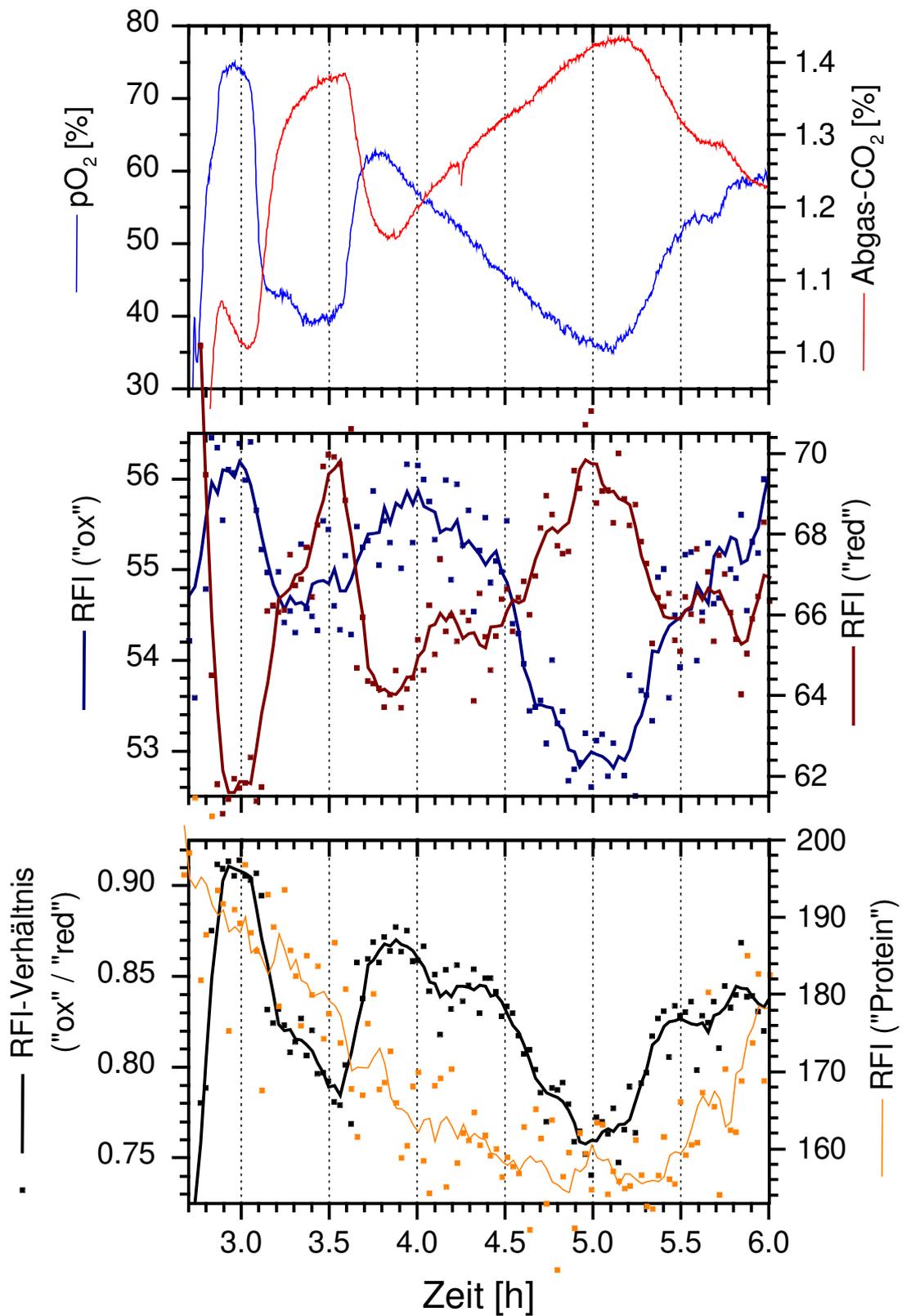


Abb. 4-3: Verlauf des  $pO_2$ , des Abgas- $CO_2$ , der RFI in den Bereichen "ox", "red" und "Protein" aus Tabelle 4.4 sowie der Verlauf des RFI-Verhältnisses ("ox" / "red") im Begasungs-Shift-Experiment

## 4.5 Experiment zur Entkopplung der Atmungskette

Um die Empfindlichkeit der verwendeten Meßmethode auf veränderte Stoffwechselflüsse zu testen, sollen anhand von Entkopplungsexperimenten die Auswirkungen eines Eingriffs in die oxidative Phosphorylation auf die 2D-Fluoreszenzspektren untersucht werden. Für diese Experimente wurde der Wildtyp *E. coli* LJ110 verwendet.

2,4-Dinitrophenol (DNP) unterbricht die enge Koppelung von dem Elektronentransport mit der Phosphorylation. Protonen können von der lipidlöslichen Substanz durch die innere Mitochondrienmembran geschleust werden. Der Elektronentransport vom NADH zum Sauerstoff verläuft normal, aber ATP wird wegen des fehlenden Protonengradienten nicht gebildet. Der Verlust der Atmungskontrolle führt zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf und zur Oxidation von NADH zu dem nicht fluoreszierenden  $\text{NAD}^+$  [STRYER, 1991].

Abb. 4-4 zeigt den Einfluß einer DNP-Zugabe zu stationären *E. coli*-Zellen auf die RFI der NADH-Kulturfluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ ). Eine Zugabe von Glucose (5 mmol/L) zu den *E. coli*-Zellen führt zu einem RFI-Anstieg in der Region von NADH, weil dieses im Verlauf der Glycolyse gebildet wird. Dieser Anstieg wird abrupt gestoppt durch die Zugabe von DNP (0,01 mmol/L), das einen Abfall des Fluoreszenzsignals bewirkt, gemäß der Theorie der entkoppelten oxidativen Phosphorylation. Mehr und mehr NADH wird oxidiert, aber ATP kann ohne einen Protonengradienten nicht gebildet werden. Die Dynamik dieses Prozesses, der innerhalb von Sekunden stattfindet, kann durch einen Zeit-Scan sichtbar gemacht werden. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie wird reduziert auf ein Wellenlängenpaar (Ex / Em), um die zeitliche Auflösung zu verbessern.

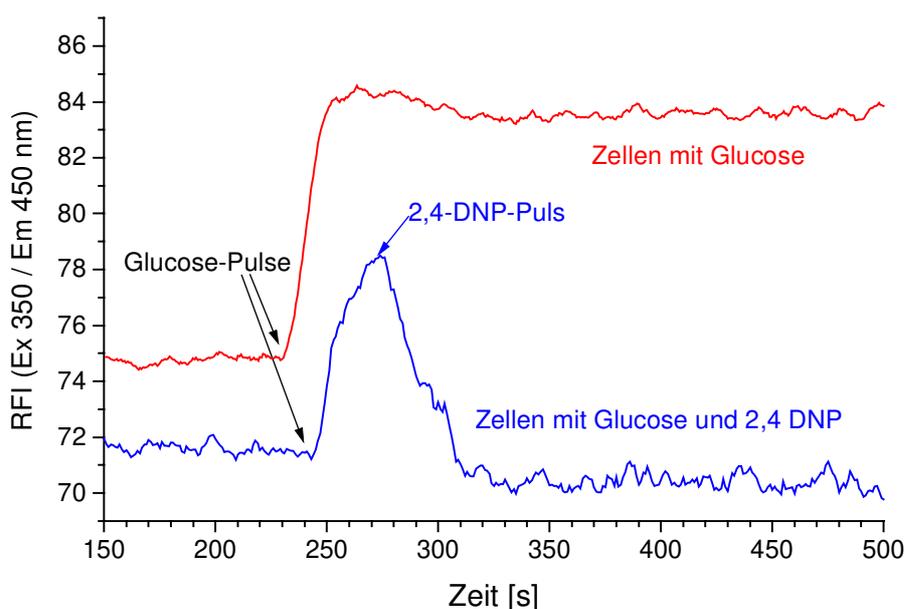


Abb. 4-4: Einfluß einer DNP-Zugabe zu stationären *E. coli*-Zellen auf die RFI (Ex 350 nm / Em 450 nm).

## 4.6 *E. coli*-Batch-Kultivierungen

### 4.6.1 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren über den gesamten Kultivierungsverlauf

Bei vier Batch-Kultivierungen von *E. coli* IMW 107 bei 0; 9,7; 14,4 und 36,7 % Sauerstoffanteil in der Begasung wurden 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Veränderungen über den gesamten Kultivierungsverlauf zeigen die Differenzspektren in Abb. 4-5, in denen jeweils vom über drei Spektren gemittelten Endspektrum ein ebenso gemitteltetes Anfangsspektrum abgezogen wurde.

Ohne Aminosäurezusatz war unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum möglich [HESSE, 1998]. Die RFI (Ex 280 / Em 360 nm) nimmt ab (Abb. 4-4 a), was vermutlich den Verbrauch der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan anzeigt. Bei sauerstoffreicheren Kultivierungen wird eine Zunahme im Gebiet um Ex 290 / Em 330 nm sichtbar (Abb. 4-4 b). Das hauptsächlich für die Proteinfluoreszenz verantwortliche Tryptophan fluoresziert eingebaut im Protein bei geringeren Emissionswellenlängen ( $\lambda_{Em} = 322-345$  nm) als die reine Aminosäure ( $\lambda_{Em} = 348$  nm) [WOLFBEIS, 1985]. Die RFI-Abnahme bei 9,7 % Sauerstoffanteil läßt vermutlich auf eine Störung schließen. Bei 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung wurden Bereiche gekennzeichnet, die in Tabelle 4.5 biogenen Fluorophoren zugeordnet werden und deren Intensitätsverläufe näher betrachtet werden sollen. Gestrichelt sind die Bereiche gekennzeichnet, in denen sich eine Veränderung der Begasung im Shift-Experiment besonders ausgewirkt hatte (Abb. 4-1). Das 2D-Differenzspektrum bei 36,7 % Sauerstoffanteil in der Begasung unterscheidet sich von den übrigen Spektren durch das Fluoreszenzmaximum bei Ex 390 / Em 480 nm, das offensichtlich auf ein für den aeroben Stoffwechsel wichtiges Fluorophor oder eine Substanz, die im oxidierten Zustand fluoresziert, zurückzuführen ist und das gesamte Spektrum prägt.

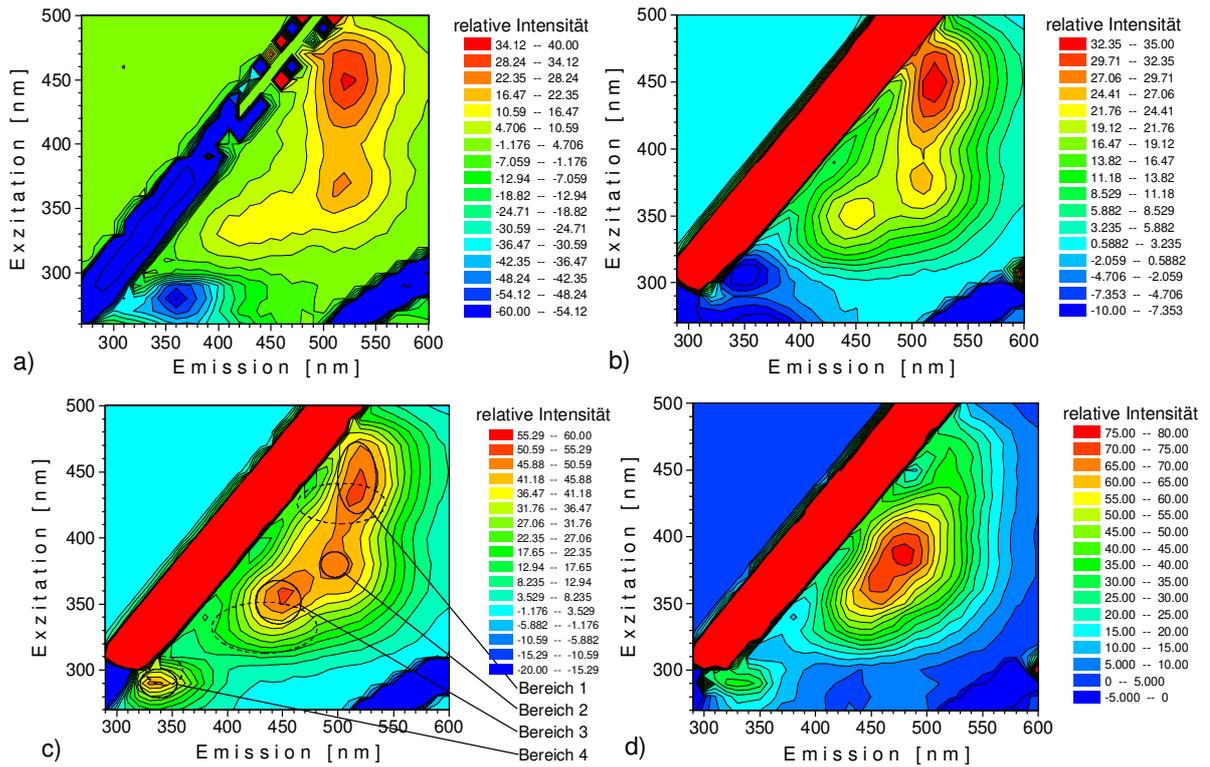


Abb. 4-5: 2D-Fluoreszenz-Differenzspektrum über den gesamten Kultivierungsverlauf der Kultivierung von *E. coli* IMW 107 mit a) 0, b) 9,7, c) 14,4 und d) 36,7 % Sauerstoffanteil in der Begasung

Tabelle 4.5: Zuweisung biogener Fluorophore zu den Fluoreszenzbereichen in Abb. 4-5 bei 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung

Bereich	1	2	3	4
RFI-Peak Ex / Em [nm]	440/520	380/500	360/450	290/330
Art des Peaks	Zunahme			
zugeordnete biogene Fluorophore	Riboflavin, FMN, FAD	Pyridoxal- phosphat (Riboflavin)	NAD(P)H	Tryptophan (Tyrosin)
Literaturwerte Ex / Em [nm]	450/530	390/500 (370/520)	340/460	290/350 (275/300)
Literaturzitat	WOLFBEIS, 1985			
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich Ex / Em [nm]	430/500 430-470/510 430-470/520 440-470/530	370/490-500 380/480-510 390/490-500	340-360/440 330-370/450 340-370/460	280-290/330 280-300/340 280-310/350
Bereichsbezeichnung	"Flavine"	"Pyridoxal- phosphat"	"NAD(P)H"	"Proteine"

#### 4.6.2 Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im Proteinbereich

Die Kulturfluoreszenz im Proteinbereich verläuft bei den Kultivierungen mit verschiedenen Sauerstoffanteilen in der Begasung sehr unterschiedlich (Abb. 4-6). Bei der Kultivierung von *E. coli* LJ110 mit 0 % Sauerstoffanteil in der Begasung mußten Aminosäuren (10 mL einer 10 %igen Casein-Hydrolysat-Lösung auf 1 L Minimalmedium) zugesetzt werden, da unter strikt anaeroben Bedingungen kein Wachstum beobachtet werden konnte [HESSE, 1998]. Die Verwertung der fluoreszierenden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin korreliert ab etwa 3 h (Abb. 4-6 a) relativ gut mit der RFI im Proteinbereich ("Bereich 4" aus Abb. 4-5).

Die außer über die Bereichsmittelung (Kap. 3) nicht weiter geglätteten Werte weisen in den ersten Stunden der Kultivierungen mit 9,7 % und 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung starke Streuungen auf (Abb. 4-6 b, c). Diese sind wahrscheinlich auf das verwendete Antischaummittel zurückzuführen, das sich an der Quarzglasscheibe vor dem Lichtleiterkopf anlagert.

Eine gute Korrelation der RFI im Proteinbereich mit der  $OD_{578}$ , die online gemessen wurde ( $OD_{578}$  online), konnte nicht gefunden werden. Bei 14,4 % und 36,8 % Sauerstoffanteil steigt die RFI im Proteinbereich viel früher an als die OD. Auffällig ist jedoch, daß bei 9,7 % Sauerstoffanteil die Fluoreszenz im Proteinbereich vom Beginn des exponentiellen Wachstums bis zum Kultivierungsende nur um etwa 10 relative Einheiten ansteigt (Abb. 4-6 b), während dieser Anstieg bei den Kultivierungen mit höheren Sauerstoffanteilen etwa doppelt so groß ausfällt (Abb. 4-6 c, d). OD und vor allem auch die Biotrockenmasse waren ebenfalls bei der Kultivierung mit 9,7 % Sauerstoffanteil geringer [HESSE, 1998]. Am Ende der Kultivierungen bei abgeschlossenem Wachstum steigt auch die Proteinfluoreszenz nicht mehr an.

Stellvertretend für andere Säuren wird in Abb. 4-6 b), c) und d) der Acetatgehalt gezeigt. Zum Zeitpunkt des Anstiegs des Acetatgehaltes (nach 9 h bei 9,7 % $O_2$  und 14,4 % $O_2$ , nach 2 h bei 36,8 % $O_2$ ) steigt auch die Kulturfluoreszenz im Proteinbereich deutlich an. Der RFI-Anstieg steht offensichtlich in einem Zusammenhang mit den metabolischen Veränderungen, die mit dem Anstieg der Acetatkonzentration einhergehen.

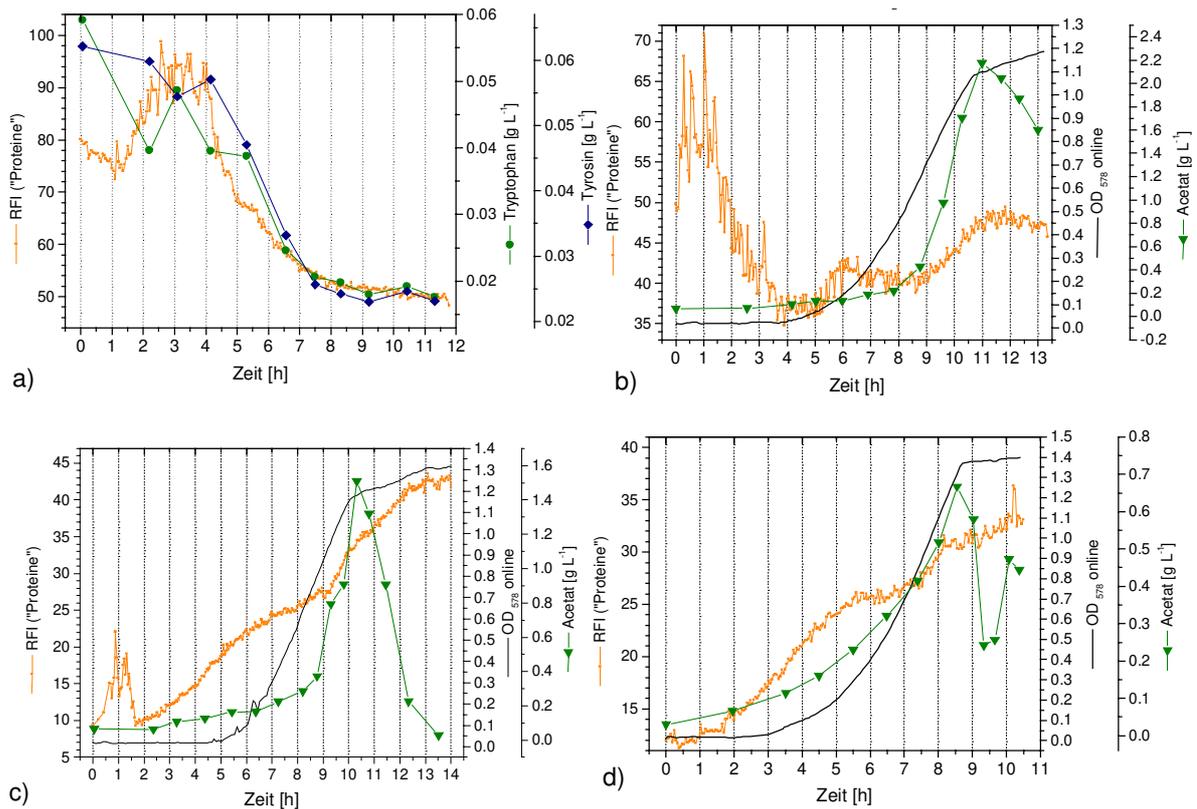


Abb. 4-6: Verlauf der RFI im Proteinbereich (Bereich 4 aus Abb. 4-5) bei Batch-Kultivierungen von *E. coli* mit verschiedenen Sauerstoffanteilen in der Begasung (a) 0 %, b) 9,7 %, c) 14,4 %, d) 36,8 %)

#### 4.6.3 Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im Pyridoxalphosphatbereich

Der Verlauf der RFI im Pyridoxalphosphatbereich ("Bereich 2" aus Abb. 4-5 c) kann vor allem in der exponentiellen Phase gut mit der OD<sub>578</sub> online korreliert werden, wie Abb. 4-7 verdeutlicht. Die Abweichungen in den ersten 3 h bei 0 % und 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung sind wahrscheinlich, wie im Proteinbereich bereits diskutiert wurde, auf Einflüsse des Antischaummittels zurückzuführen.

Mit steigendem Sauerstoffanteil in der Begasung wird die Steigung der RFI im Pyridoxalphosphatbereich beim Übergang in die stationäre Phase immer größer. Bei 0 % steigt die RFI ("Pyridoxalphosphat") in der stationären Phase nicht weiter an, bei 9,7 % etwas mehr als die OD, bei 14,4 % ist der Anstieg noch steiler, bis bei 36,8 % Sauerstoffanteil in der Begasung schließlich das Ende des Zellwachstums nach 8,5 h im Fluoreszenzverlauf wegen des konstant steilen Anstiegs der Intensitäten nicht mehr zu erkennen ist.

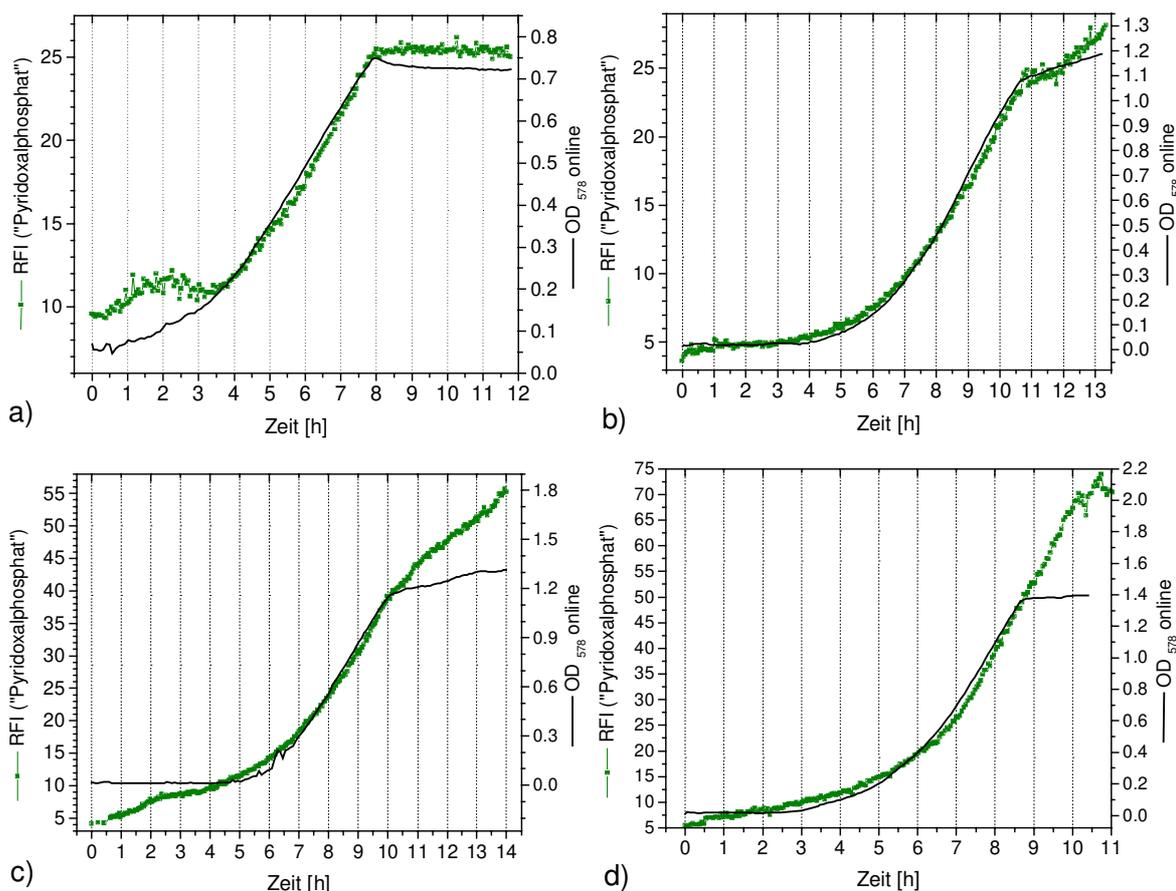


Abb. 4-7: Verlauf der RFI im Pyridoxalphosphatbereich ("Bereich 2" aus Abb. 4-5) bei Batch-Kultivierungen von *E. coli* mit verschiedenen Sauerstoffanteilen in der Begasung (a) 0 %, b) 9,7 %, c) 14,4 %, d) 36,8 %)

#### 4.6.4 Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im FMN/FAD- und NAD(P)H-Bereich

"Bereich 1" aus Abb. 4-5 c wurde in Tabelle 4.5 dem biogenen Fluorophor Riboflavin und seinen Derivaten, den oxidierten Coenzymen FMN und FAD zugeordnet. Der Verlauf in den einzelnen Kultivierungen ist in Abb. 4-8 zusammen mit der OD<sub>578</sub> online, dem RFI-Verlauf des Fluorosensors und dem RFI-Verlauf im NAD(P)H zugeordneten "Bereich 3" aus Abb. 4-5 c aufgetragen.

Die letzten beiden Kurven verlaufen weitestgehend parallel. Mit unterschiedlichen Geräten wurde die Fluoreszenz im gleichen Bereich gemessen. Der Fluorosensor (Ingold) mißt die Fluoreszenz bei Ex 360 / Em 440-460 nm mit einer Filtereinstellung von 10 Hz. Obwohl der Fluorosensor mit einer wesentlich höheren Meßfrequenz mißt, ist das Rauschen zum Teil deutlich höher als beim F-4500, dessen Fluoreszenzwerte nur über den Bereich "NAD(P)H", nicht über die Zeit, gemittelt wurden. Dies fällt besonders in der Abb. 4-8 a auf, da unter Stickstoffbegasung das Zellwachstum und auch die RFI im Vergleich zu den übrigen Kultivierungen deutlich geringer ausfallen.

Das Antischaummittel stört die optischen Messungen wiederum in den ersten 3 h der Kultivierungen mit 0 % und 14,4 % Sauerstoffanteil an der Begasung. Ansonsten sind die Übereinstimmungen der Fluoreszenzverläufe mit der OD<sub>578</sub> online in den ersten Kultivierungsstunden hoch. Am Ende der exponentiellen Phase steigt die RFI ("Flavine") wesentlich steiler

als die  $OD_{578}$  online an. Dagegen flacht der Verlauf der RFI ("NAD(P)H") und des Fluorosensors nach etwa 8 h in den Kultivierungen mit 9,7 % und 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung deutlich ab.

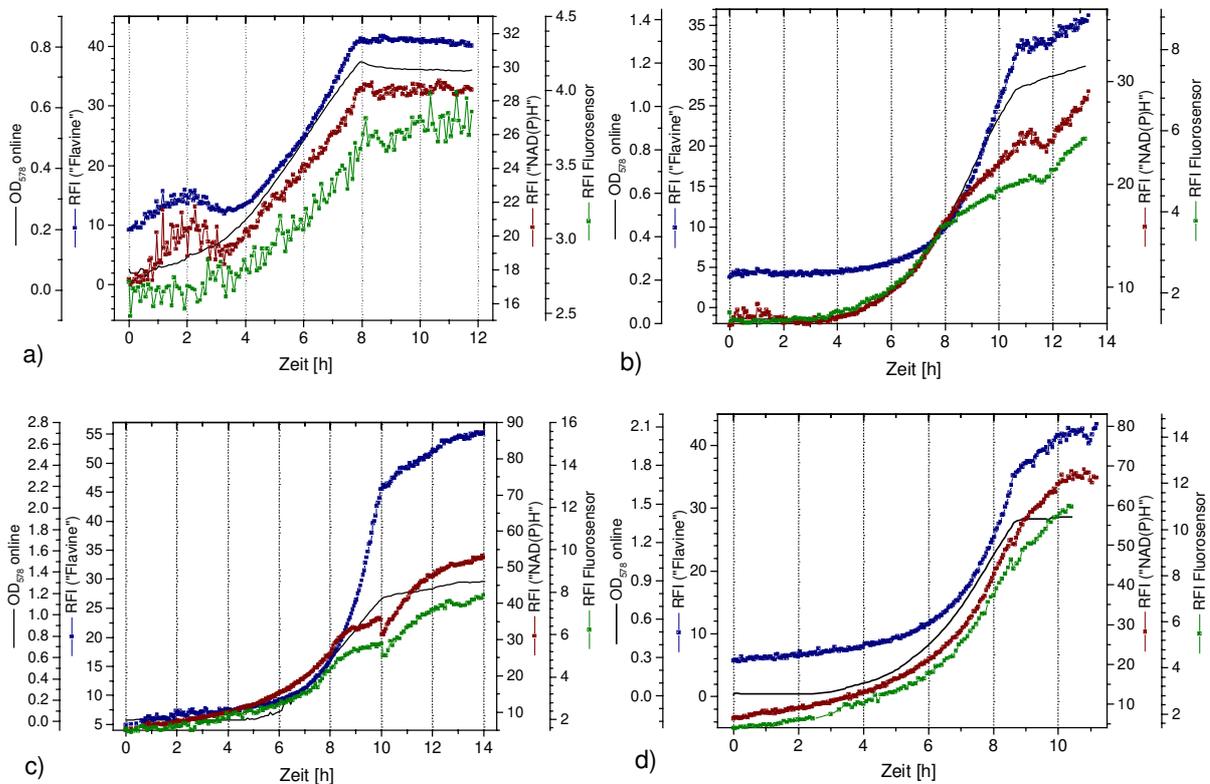


Abb. 4-8: Verlauf der RFI im FMN, FAD und NAD(P)H-Bereich ("Bereich 1" und "Bereich 3" aus Abb. 4-5) bei Batch-Kultivierungen von *E. coli* mit verschiedenen Sauerstoffanteilen in der Begasung (a) 0 %, b) 9,7 %, c) 14,4 %, d) 36,8 %)

Um aus dem Bereich der oxidationsempfindlichen Coenzyme mehr Informationen über den Metabolismus zu erhalten, wurden die Fluoreszenzbereiche "ox" (oxidiertes FMN, FAD) und "red" (reduziertes NAD(P)H) aus Abb. 4-1 c) zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dadurch entstand eine relative Größe, die in Abb. 4-9 und Abb. 4-10 mit verschiedenen relevanten Prozessgrößen verglichen wurde.

Etwas ausführlicher soll die Batch-Kultivierung von *E. coli* IMW107 mit 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung beschrieben werden (Abb. 4-9). Sauerstoffaufnahme (OUR) und die Kohlendioxidproduktionsrate verlaufen annähernd identisch und liefern keine zusätzliche Information zum Gelöstsauerstoff ( $pO_2$ ), der dazu spiegelbildlich verläuft. Der Respirationsquotient (RQ) schwankt, stark verrauscht, um 1. Die spezifische Kohlendioxidproduktionsrate ( $q_{CO_2}$ ) und die spezifische Sauerstoffaufnahme ( $q_{O_2}$ ) fallen nach anfänglichem Anstieg nach etwa 8 h bei einem Gelöstsauerstoffgehalt von 18 % ab. Zu diesem Zeitpunkt steigen auch der Formiatgehalt, der vorher zu vernachlässigen war, und das RFI-Verhältnis "ox" / "red" steil an. Letzteres durchläuft bei 10 h ein spitzes Maximum, das mit dem Verbrauch der Glucose übereinstimmt. Zu diesem Zeitpunkt durchläuft der Gelöstsauerstoffgehalt ebenfalls ein Maximum.

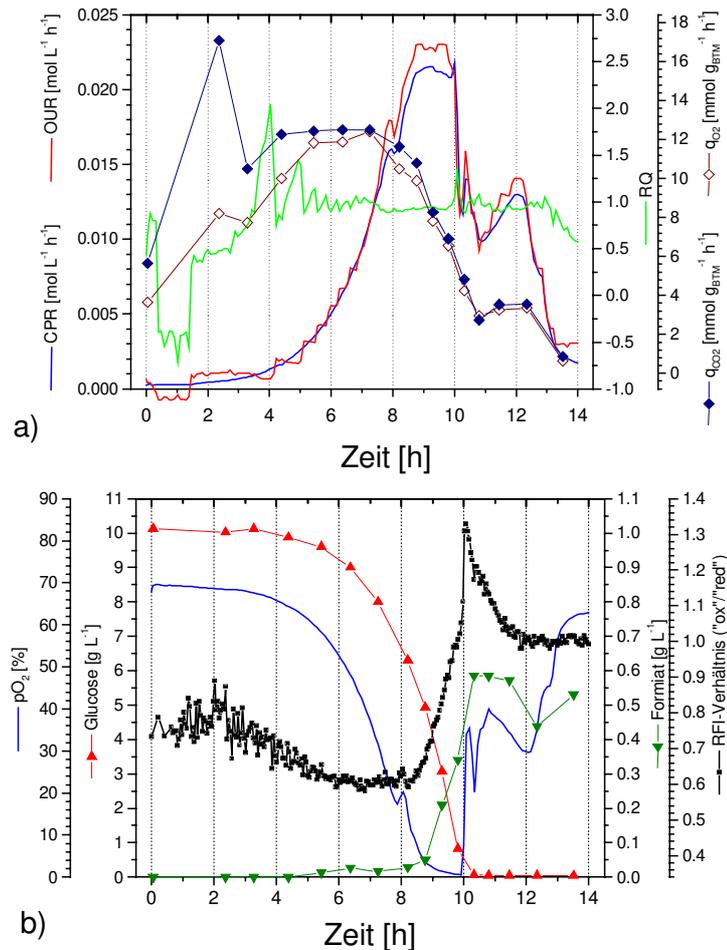


Abb. 4-9: Verlauf des RFI-Verhältnisses ("ox" / "red") (Bereiche aus Abb. 4-1 c) und weiterer Prozessgrößen bei der Batch-Kultivierung von *E. coli* IMW107 mit 14,4 % Sauerstoffanteil in der Begasung

Abb. 4-10 zeigt den Verlauf des Verhältnisses der RFI im "ox"- und "red"-Bereich, der immer gleich skaliert ist, im Vergleich zu weiteren relevanten Prozessgrößen bei den übrigen *E. coli*-Batch-Kultivierungen. Unter Stickstoffbegasung wurde statt des hier bedeutungslosen Gelöstsauerstoffgehaltes die OD<sub>578</sub> online dargestellt. Diese zeigt einen deutlich übereinstimmenden Verlauf mit dem Acetatgehalt (Formiat wurde bei dieser Kultivierung nicht bestimmt) und mit dem RFI-Verhältnis "ox" / "red". Dieses hat bei 8,2 h, dem Zeitpunkt des Glucoseverbrauches, ein kleines Minimum. Ähnliche Minima markieren auch bei den Kultivierungen mit 9,7 % und 36,8 % Sauerstoffanteil in der Begasung (nach 11 h bzw. 9 h) den Moment, an dem die C-Quelle verstoffwechselt ist. Bei der Kultivierung mit 9,7 % Sauerstoff in der Begasung erfolgt nach 7,8 h ein Anstieg des RFI-Verhältnisses "ox" / "red", der, wie bereits in Abb. 4-9, mit dem des Formiats übereinstimmt und bei einem Gelöstsauerstoffgehalt unterhalb von 15 % erfolgt. Während in den übrigen Kultivierungen das RFI-Verhältnis "ox" / "red" von anfangs 0,5 bis 0,7 zum Ende einen Wert von 1 überschreitet, bleibt es in der Kultivierung mit dem höchsten Sauerstoffanteil in der Begasung bei Werten zwischen 0,55 und 0,7. Bei dieser Kultivierung bleibt der Gelöstsauerstoffgehalt oberhalb von 25 %, und die Formiatbildung kann vernachlässigt werden. Während der Gelöstsauerstoffgehalt sein spitzes Minimum durchläuft, steigt das RFI-Verhältnis etwas an.

Das Erkennen von Sauerstofflimitierungen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie wird in Kap. 4.8.2 eingehender diskutiert.

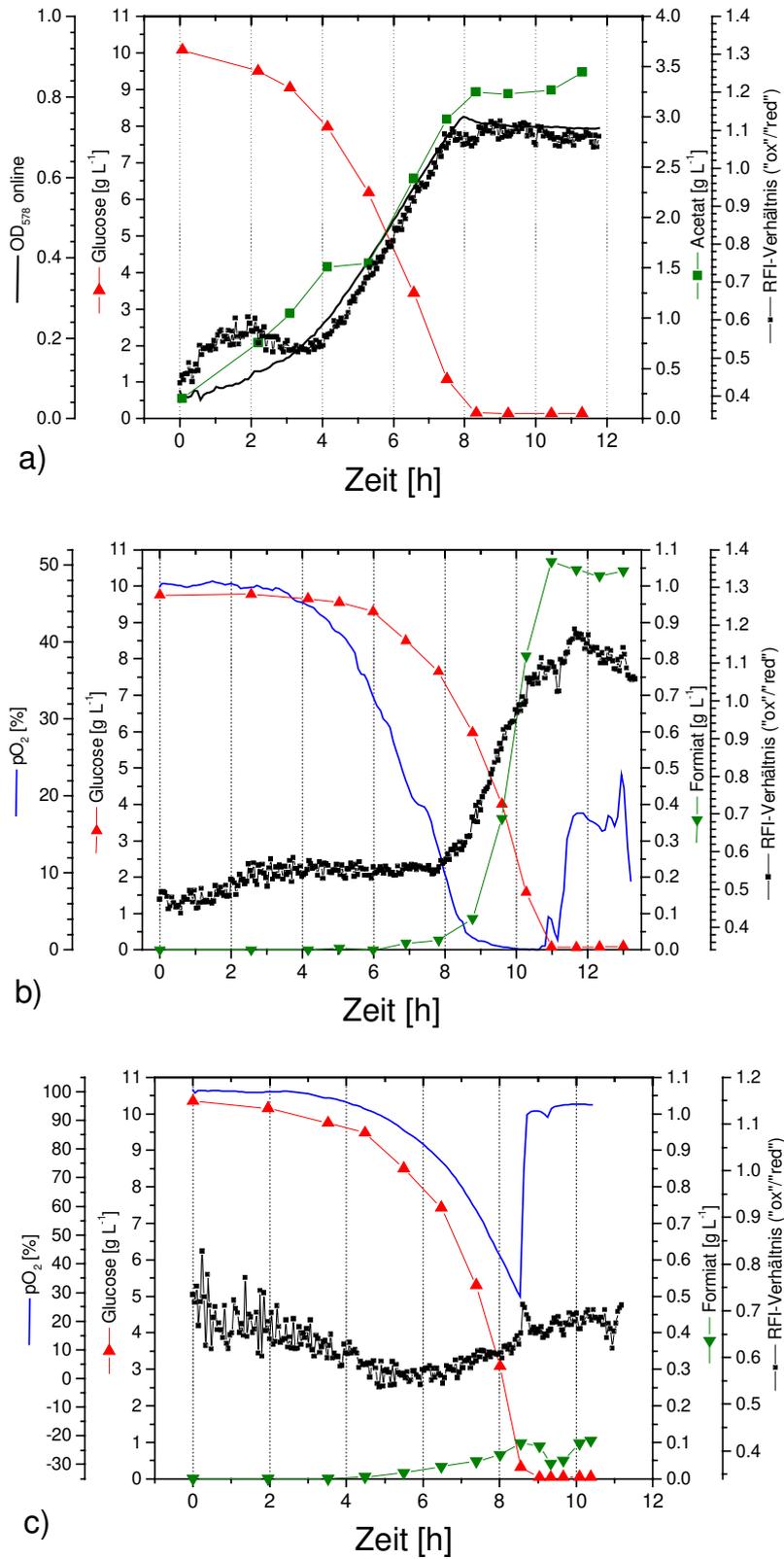


Abb. 4-10: Verlauf des RFI-Verhältnisses ("ox" / "red") (Bereiche aus Abb. 4-1 c) und weiterer relevanter Prozessgrößen bei Batch-Kultivierungen von *E. coli* mit verschiedenen Sauerstoffanteilen in der Begasung (a) 0 %, b) 9,7 %, c) 36,8 %)

## 4.7 Kontinuierliche *E. coli*-Kultivierungen

Bei den Kultivierungen im kontinuierlichen Betrieb (Chemostat) lassen sich Stoffwechsel-flüsse im dynamischen Gleichgewicht bei für die Zellen konstanten äußeren Umweltbedin-gungen untersuchen. Um den Einfluß unterschiedlicher Verdünnungsraten bei verschiede-nen Sauerstoffanteilen in der Begasung auf die 2D-Fluoreszenzspektren herauszufinden, wurden vier stationäre Zustände von kontinuierlichen Kultivierungen von *E. coli* IMW 107 untersucht (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Untersuchte stationäre Zustände

Nr.	Verdünnungsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]	Sauerstoffanteil in der Begasung [%]
1	0,25	14
2	0,25	9
3	0,32	9
4	0,34	9

### 4.7.1 2D-Fluoreszenzspektrum in einem stationären Zustand

Im aus drei Spektren gemittelten 2D-Fluoreszenzspektrum vom 2. stationären Zustand (Abb. 4-11) sind vier Bereiche gekennzeichnet, die große Ähnlichkeit mit den Bereichen aus Abb. 4-5 aufweisen, die gestrichelt dargestellt sind. Die Zuweisung biogener Fluorophore zu den Fluoreszenzbereichen in Abb. 4-5 erfolgt in Tabelle 4.7.

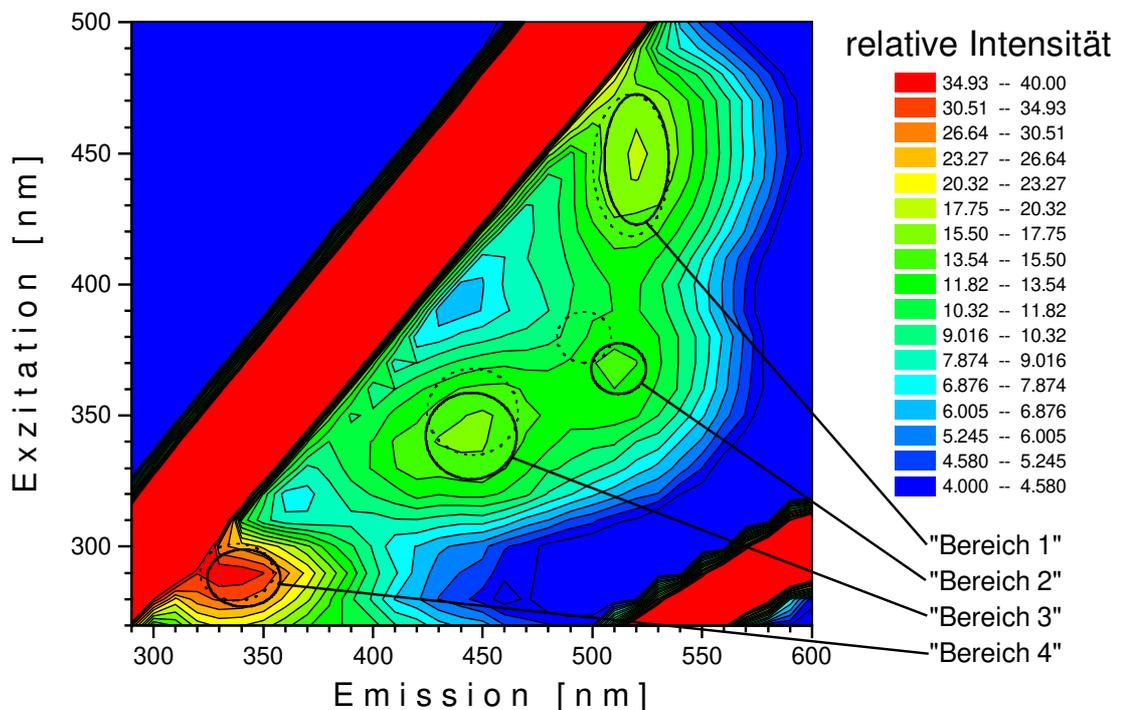


Abb. 4-11: 2D-Fluoreszenzspektrum im stationären Zustand einer kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* IMW 107 (Verdünnungsrate  $0,25 \text{ h}^{-1}$ , 9 % Sauerstoffanteil in der Begasung)

Tabelle 4.7: Zuweisung biogener Fluorophore zu den Fluoreszenzbereichen in Abb. 4-11

Bereich	"Bereich 1"	"Bereich 2"	"Bereich 3"	"Bereich 4"
RFI-Peak Ex / Em [nm]	450/520	370/510	340/440	290/330
Art des Peaks	Zunahme			
zugeordnete biogene Fluorophore	Riboflavin, FMN, FAD	Riboflavin	NAD(P)H	Tryptophan (Tyrosin)
Literaturwerte Ex / Em [nm]	450/530	370/520	340/460	290/350 (275/300)
Literaturzitat	WOLFBEIS, 1985			
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich Ex / Em [nm]	430-460/510	370/500	350/450	300/340
	430-470/520	360-380/510	340/430-450	290/330-360
	440-460/530	370/520		280/330-350
Bereichsbezeichnung	"Riboflavin 1"	"Riboflavin 2"	"NAD(P)H"	"Proteine"

#### 4.7.2 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen stationären Zuständen

Abb. 4-12 zeigt die RFI-Veränderungen in den vier Bereichen aus Abb. 4.11 für die vier stationären Zustände. Die RFI bei 14 % Sauerstoffanteil in der Begasung liegen wesentlich höher als bei 9 %. Offensichtlich macht sich die höhere Biomasse bei höherem Sauerstoffanteil bemerkbar. Durch die Veränderung der Verdünnungsrate bei einem Sauerstoffanteil von 9 % in der Begasung ist keine einheitliche Tendenz in den RFI-Verläufen der einzelnen Bereiche festzustellen.

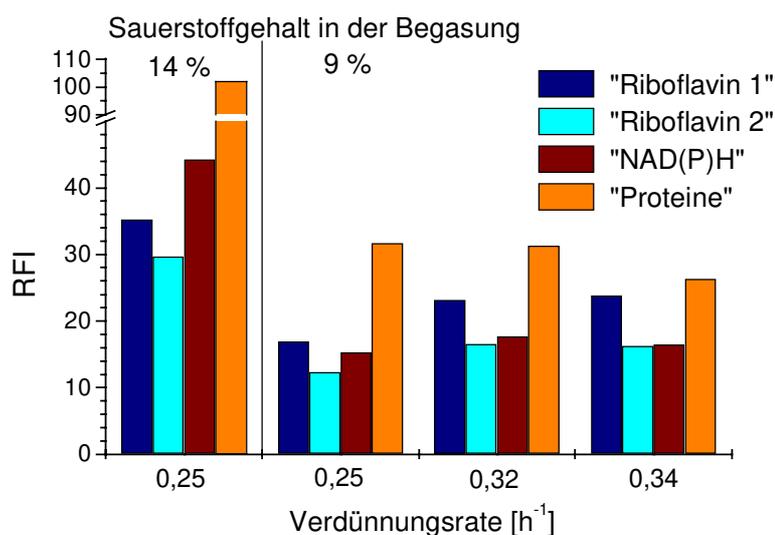


Abb. 4-12: Vergleichende Darstellung der RFI der vier Bereiche aus Abb. 4-11 in stationären Zuständen kontinuierlicher Kultivierungen von *E. coli* IMW 107

## 4.8 Einfluß einer Sauerstofflimitierung im Stoffwechsel von *E. coli* auf die 2D-Fluoreszenzspektren

### 4.8.1 Einfluß kurzfristiger Sauerstofflimitierung auf die 2D-Fluoreszenzspektren

Beim kurzfristigen Wechsel der Begasung von Druckluft auf Stickstoff verändern sich vor allem die RFI dreier Bereiche markant (Abb. 4-1 c). Die RFI ("ox") sinkt, während die RFI ("red") ansteigt. Diese Bereiche, die auf eine Veränderung der Sauerstoffversorgung empfindlich reagieren, wurden in diesem Kapitel ausgewählt, um den Einfluß von Sauerstofflimitierung im Stoffwechsel von *E. coli* auf die 2D-Fluoreszenzspektren zu untersuchen.

Im Verlauf der RFI von Wellenlängenpaaren aus diesen beiden Bereichen nach dem kurzfristigen Begasungswechsel wurden deutliche Parallelen zum Verlauf des Gelöstsauerstoffgehaltes und des CO<sub>2</sub> im Abgas aufgezeigt (Abb. 4-3). Bei einem geringen pO<sub>2</sub>-Gehalt weist auch der Verlauf der RFI ("ox") ein Minimum auf, die RFI ("red") erreicht dann, wie auch der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Abgas, ein Maximum.

Liegt weniger Sauerstoff, der letztendlich als Oxidationsmittel fungiert, vor, so liegt es nahe, daß es zu einer Anreicherung von reduzierten Redoxäquivalenten (wie NADH und NADPH im "red"-Bereich) und zu einem Verbrauch von oxidierten Redoxäquivalenten (wie FMN und FAD im "ox"-Bereich) kommt. NAD(P)H kann durch den fermentativen Stoffwechsel (anaerob) nicht so schnell oxidiert werden wie in der oxidativen Phosphorylierung (aerob) und reichert sich daher ohne Sauerstoff an. Ebenso verschieben sich die Gleichgewichte der Coenzyme FMN(H<sub>2</sub>) und FAD(H<sub>2</sub>) zu den reduzierten Formen, so daß die Konzentrationen der oxidierten Coenzyme FMN und FAD abnehmen.

Da der aerobe Stoffwechsel wesentlich mehr Energie je Glucosemolekül liefert, wird Glucose bei einer Umstellung auf anaerobe Bedingungen schneller verstoffwechselt. Diese höhere Stoffwechselaktivität drückt sich im NAD(P)H-Anstieg aus. Die Interpretation der 2D-Fluoreszenzspektren in Abb. 4-1 bekräftigt, daß sich der Redoxzustand der Elektronenüberträger NAD(P), FAD und FMN von *E. coli* bei kurzfristiger Sauerstofflimitierung zu den reduzierten Formen verschiebt. Bei kurzfristiger Umstellung der Begasung fehlt dem Organismus die Zeit, den Stoffwechsel vollständig auf anaerobe Bedingungen umzustellen, da Enzyme benötigt werden, die erst durch die Proteinbiosynthese nach Transkription der DNA und Translation der RNA zur Verfügung stehen.

Der Anstieg der RFI im Bereich der NAD(P)H-Kulturfluoreszenz beim Übergang zu anaeroben Bedingungen ist schon mehrfach publiziert worden [SCHEPER, 1985; MAROSE, 1995; HILMER, 1996; LINDEMANN, 1998; MAROSE *et al.*, 1998]. Die Abnahme der RFI ("ox") bei gleichzeitiger Zunahme der RFI ("red") führt zu einer Verringerung des RFI-Verhältnisses ("ox" / "red") (Abb. 4-13).

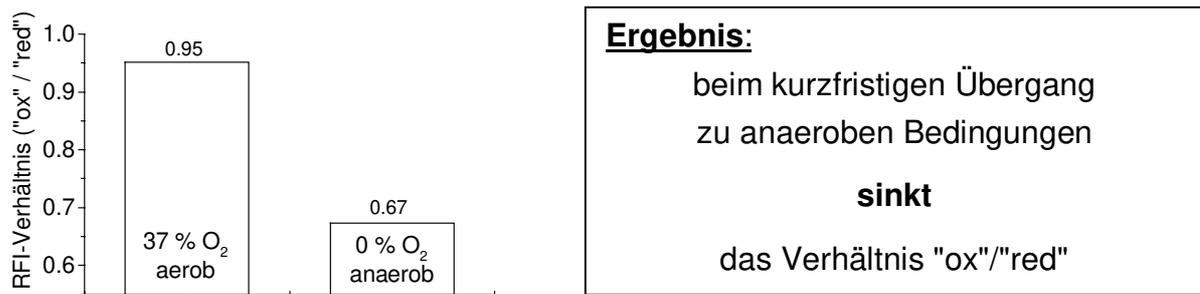


Abb. 4-13: Veränderung des Verhältnisses "ox"/"red" im Säulendiagramm bei 37 % und 0 % Sauerstoffanteil an der Begasungsluft (Verdünnungsrate  $0,30 \text{ h}^{-1}$ , Daten berechnet aus Abb. 4-1 a und b)

#### 4.8.2 Erkennen von Sauerstofflimitierungen im Verlauf von Batch-Kultivierungen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Die Bestimmung von Limitierungen in der Umwandlung des Substrates zum Produkt ist bei der Analyse von Stoffwechselflüssen von großer Bedeutung. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang häufig der Einfluß der Sauerstoffversorgung auf den Metabolismus. Hierbei ist vor allem der Zeitpunkt der einsetzenden Sauerstofflimitierung wichtig für eine kontrollierte Steuerung und Regelung des Prozesses.

Zum Erkennen einer Sauerstofflimitierung im Verlauf einer Kultivierung dienen im allgemeinen:

- Unterschreitung des Gelöstsauerstoffgehaltes unter einen Grenzwert
- Anstieg des Respirationsquotienten über 1
- niedrige Sauerstoffaufnahme (OUR)
- niedrige spezifische Sauerstoffaufnahme ( $q_{O_2}$ )
- Auftreten von Stoffwechselnebenprodukten (erhöhte Säureproduktion, Ethanolproduktion bei Hefen)

Bei geringem Arbeitsvolumen und dadurch bedingten geringen Begasungsraten sind die Abgaswerte zur weitergehenden Berechnung wenig aussagekräftig, wie die starken Schwankungen von RQ, OUR und  $q_{O_2}$  in Abb. 4-9 vor allem zu Beginn der Kultivierung zeigen. Der Gelöstsauerstoffgehalt ist lediglich eine relative Größe, die zu Beginn der Kultivierung bei Sättigung des Mediums mit Sauerstoff auf 100 % gesetzt wird. Der Grenzwert des Gelöstsauerstoffgehaltes, unterhalb dessen sich eine Limitierung zeigt, muß demnach unter den gewählten Bedingungen erst einmal ermittelt werden, bevor diese Größe zur Steuerung des Prozesses eingesetzt werden kann.

In Abb. 4-9 wird erstmals eine neue Methode (über das RFI-Verhältnis "ox" / "red") zur Identifizierung des genauen Zeitpunktes der einsetzenden Sauerstofflimitierung vorgestellt. Während die etablierten Methoden nur von Ursachen (wie dem Gelöstsauerstoffgehalt) oder Folgeerscheinungen der Limitierung (wie Abgaswerten oder Säurekonzentrationen) ausgehen, ermöglicht die 2D-Fluoreszenzspektroskopie die direkte Messung der an der Limitierung be-

teiligten Analyte. Somit können Informationen unmittelbar aus der lebenden Zelle gewonnen werden, die eine Steuerung des Prozesses ermöglichen sollten.

Messungen der RFI in den Bereichen der Kulturfluoreszenzen der elektronenübertragenden Coenzyme NAD(P)H, FMN und FAD liefern wenig Informationen über den Zellmetabolismus im Verlauf von *E. coli*-Batch-Kultivierungen (Abb. 4-8). Mit steigender Biomasse steigen auch die Konzentrationen dieser Coenzyme. Das RFI-Verhältnis "ox" / "red" ist von der Biomasse unabhängig. Als Nebeneffekt werden durch das Verhältnisverfahren noch optische Störeinflüsse (z. B. durch Gasblasen oder Feststoffe) und eventuell in beiden Bereichen vorhandene Hintergrundfluoreszenz eliminiert. FMN und FAD fluoreszieren nur in der oxidierten Form, NAD(P)H nur in der reduzierten. Das Verhältnis liefert Informationen über den Redoxstatus der Zellen, der sich beim Übergang vom oxidativen zum fermentativen Metabolismus verändert. Die beginnende Sauerstofflimitierung, erkennbar durch Säurebildung (z. B. eine ansteigende Formiatproduktion) und einen unterhalb von 10-20 % abfallenden Gelöstsauerstoffgehalt, wird von dem RFI-Verhältnis "ox" / "red" sehr gut wiedergegeben (Abb. 4-9 und Abb. 4-10). Bei der Kultivierung mit 36,8 % Sauerstoffanteil in der Begasung bleibt das Verhältnis in der Größenordnung der Anfangswerte der übrigen Kultivierungen. Es kommt zu keiner wesentlichen Sauerstofflimitierung, weshalb auch das RFI-Verhältnis nicht ansteigt. Ein kleines Maximum bei 8,8 h könnte ein Anzeichen für eine kurzzeitige Sauerstoffunterversorgung einiger Zellen sein (Abb. 4-10 c).

Die Bildung und den Verbrauch von elektronenübertragenden Coenzymen bei der Verstoffwechslung eines Moleküls Glucose zeigt Tabelle 4.8. In der Glycolyse, die sowohl aerob als auch anaerob durchlaufen wird, entsteht bei der stufenweisen Umwandlung von Glucose zu Pyruvat NADH. Pyruvat wird im oxidativen Metabolismus hauptsächlich unter Bildung von NADH zu Acetyl-CoA oxidiert. Dieses wird unter aeroben Bedingungen in den Citratzyklus eingeschleust, in dem FAD verbraucht wird und NAD(P)H entsteht. Die Isocitrat-Dehydrogenase im Citratzyklus von *E. coli* ist im Gegensatz zu anderen Organismen spezifisch für NADP<sup>+</sup> [GOTTSCHALK, 1986]. NADH und FADH<sub>2</sub> werden in der oxidativen Phosphorylierung oxidiert.

Unter anaeroben Bedingungen entfällt diese Oxidation zur Energiegewinnung. Der Bedarf an NADH und FADH<sub>2</sub> ist daher geringer. Der Citratzyklus wird reprimiert. Dadurch wird weniger FAD verbraucht und weniger NADH gebildet. Das in der Glykolyse produzierte NADH muß wieder zum NAD<sup>+</sup> oxidiert werden, damit die Glykolyse weiterhin durchlaufen werden kann. Dies geschieht bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat, bei der NADH verbraucht wird. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex ist unter anaeroben Bedingungen reprimiert. Pyruvat wird vermehrt unter Bildung von Formiat über die Pyruvat:Formiat-Lyase oxidiert, dabei wird im Unterschied zur Oxidation unter aeroben Bedingungen kein NADH frei [CLARK, 1989]. Beim Übergang vom oxidativen zum fermentativen Metabolismus sollte demnach der FAD-Gehalt zunehmen und der NAD(P)H-Gehalt abnehmen.

Bei der rein anaeroben Kultivierung liefert das Verhältnis den Verlauf der OD. Im anaeroben Stoffwechsel kommt es aufgrund der fermentativen Prozesse im gesamten Kultivierungsverlauf zur Säurebildung. Mit dieser ist teilweise ein NADH-Verbrauch gekoppelt (z. B. bei der Lactatbildung). Der sonst erst beim Übergang vom oxidativen zum fermentativen Stoffwechsel einsetzende Anstieg erfolgt bereits am Kultivierungsbeginn, ist anfangs jedoch noch überlagert von der auch bei anderen Fluoreszenzwellenlängen beobachteten Störung, die vermutlich durch das Antischaummittel verursacht wurde. Das RFI-Verhältnis verläuft im anaeroben Stoffwechsel parallel zur Biomassebildung (Abb. 4-10 a).

Tabelle 4.8: Bildung und Verbrauch von elektronenübertragenden Coenzymen bei der Verstoffwechslung eines Moleküls Glucose [zusammengestellt aus CLARK, 1989 und LEHNINGER, 1998]

Vorgang	benötigtes Coenzym für ein verstoffwechseltes Glucosemolekül	gebildetes Coenzym
Glycolyse	2 NAD <sup>+</sup>	2 NADH
Pyruvat-Oxidation zu Acetyl-CoA (über Pyruvat-Dehydrogenase)	2 NAD <sup>+</sup>	2 NADH
Pyruvat-Oxidation zu Acetyl-CoA (über Pyruvat:Formiat-Lyase)	-	-
Pyruvat-Reduktion zu Lactat	2 NADH	2 NAD <sup>+</sup>
Citratzyklus	4 NAD <sup>+</sup> 2 NADP <sup>+</sup> 2 FAD	4 NADH 2 NADPH 2 FADH <sub>2</sub>

Da beim Übergang vom oxidativen zum fermentativen Metabolismus der FAD-Gehalt zunimmt und der NAD(P)H-Gehalt abnimmt (Erklärung siehe oben), steigt auch das RFI-Verhältnisses "ox" / "red" an (Abb. 4-14). Der Redoxzustand der Elektronenüberträger NAD(P) und FAD verschiebt sich bei zunehmender Sauerstofflimitierung in *E. coli*-Batch-Kultivierungen zu den reduzierten Formen. Dieses Ergebnis steht in einem scheinbaren Widerspruch zu dem im Begasungs-Shift-Experiment gewonnenen (Abb. 4-13).

Ein Spektrenvergleich bekräftigt, daß beim Begasungs-Shift-Experiment die Stoffflüsse nicht vollständig auf anaerobe Bedingungen umgestellt wurden. Das 2D-Fluoreszenzspektrum mit 0 % Sauerstoffbegasungsanteil nach kurzfristiger Begasungsumstellung auf Stickstoff (Abb. 4-1 b) unterscheidet sich deutlich von dem 2D-Fluoreszenzspektrum unter anaeroben Bedingungen am Ende der anaeroben Batch-Kultivierung (Abb. 4-5 a). Der unter stark aeroben Bedingungen auftretende Fluoreszenzpeak bei Ex 390 / Em 480 nm (Abb. 4-5 d) ist nach kurzfristiger Begasungsumstellung noch sichtbar.

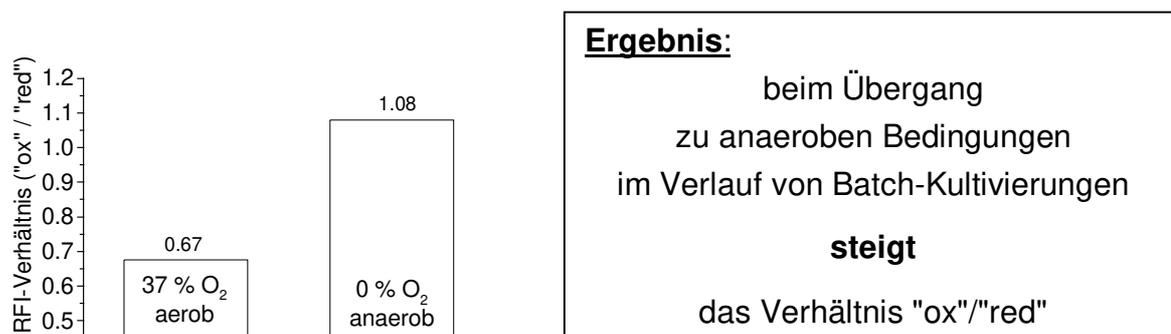


Abb. 4-14: Veränderung des Verhältnisses "ox"/"red" (Bereiche aus Abb. 4-1 c) im Säulendiagramm bei 37 % und 0 % Sauerstoffanteil an der Begasungsluft in der stationären Phase der Batch-Kultivierungen (Mittelwerte der letzten 10 Daten aus Abb. 4-10 a und c)

### 4.8.3 Quantifizierung von Sauerstofflimitierungen mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Bei den Kultivierungen im kontinuierlichen Betrieb lassen sich mit Vorgabe der Verdünnungsrate bestimmte Wachstumsraten einstellen. Beim Erreichen eines stationären Zustandes befindet sich der Stoffwechsel von *E. coli* im Fließgleichgewicht. Dann haben die Stoffflüsse zwischen den Intermediaten des Metabolismus konstante Geschwindigkeiten. Bei geringerer Sauerstoffversorgung kann *E. coli* über den oxidativen Metabolismus nicht mehr ausreichend Energie gewinnen, so daß zusätzlich Energie aus fermentativen Stoffwechselwegen gewonnen wird. Dann finden aerobe und anaerobe Prozesse zu je nach Sauerstoffversorgung unterschiedlichen Anteilen parallel zueinander statt. Durch den Vergleich unterschiedlicher stationärer Zustände sollen diese Anteile, die ein Maß für Sauerstofflimitierungen sind, quantifiziert werden.

Die RFI-Veränderungen in den Bereichen biogener Fluorophore zeigen in den vier untersuchten stationären Zuständen keine einheitlichen Tendenzen (Abb. 4-12). Die RFI ist eine relative Größe, die für Vergleiche ungeeignet ist. Das RFI-Verhältnis "ox" / "red" ist dagegen für quantitative Aussagen geeignet, wie Abb. 4-15 zeigt. Wie bereits in Kap. 4.8.2 erwähnt, steigt dieses Verhältnis bei zunehmender Sauerstofflimitierung an. Die Erniedrigung des Sauerstoffanteils in der Begasung von 14 % auf 9 % bei gleichbleibender Verdünnungsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  bewirkt einen deutlichen Anstieg um 0,27. Bei gleichem Sauerstoffgehalt in der Begasung wurde in den nächsten beiden stationären Zuständen die Verdünnungsrate und damit auch die Wachstumsrate erhöht, was einen gesteigerten Sauerstoffbedarf und damit eine zunehmende Sauerstofflimitierung zur Folge hat. Auch das RFI-Verhältnis "ox" / "red" steigt an. Der Effekt auf die Erhöhung der Verdünnungsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,32 \text{ h}^{-1}$  ist dabei größer als beim Anstieg von  $0,32 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,34 \text{ h}^{-1}$ .

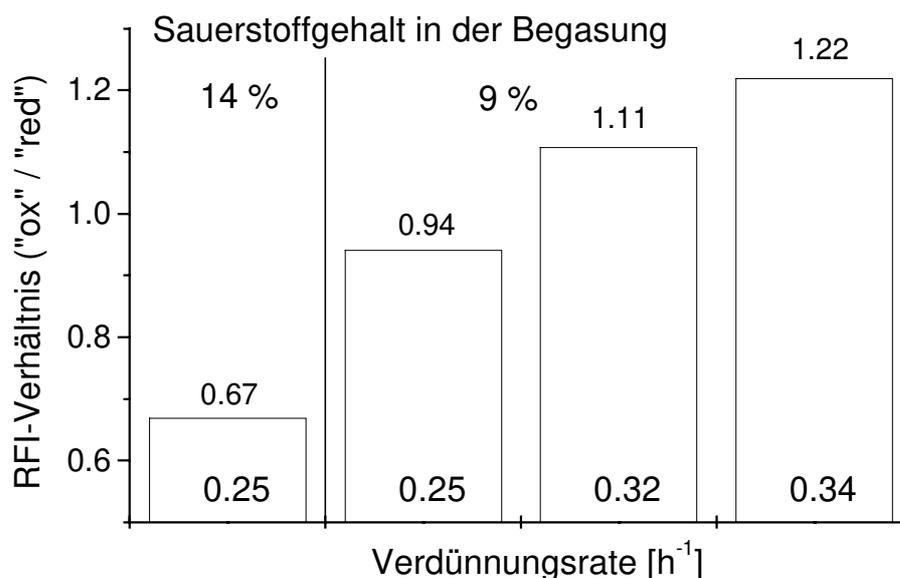


Abb. 4-15: Quantitative Aussagen des RFI-Verhältnisses "ox" / "red" (Bereiche aus Abb. 4-1 c) der vier stationären Zustände aus Kap.4.7

Zu den stationären Zuständen 1 und 2 (Tabelle 4.6) sind Stoffflüsse berechnet worden [HESSE, 1998], die in Abb. 4-16 dargestellt sind. Die Zahlen in den Kästchen neben den Reaktionsraten ( $r$ ) geben die molaren Flüsse durch die Glykolyse zum Citratzyklus (TCA), von Metaboliten in die Biomasse (BM) und die spezifischen Produktionsraten der ausgeschiedenen organischen Säuren in  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  an. Die aus dem Anstieg des RFI-Verhältnisses "ox" / "red" gefolgerte zunehmende Sauerstofflimitierung wird durch die Berechnungen bestätigt. Der Stofffluß durch die Glykolyse ( $r_1$ ,  $r_2$  und  $r_3$ ) verdoppelt sich beim geringeren Sauerstoffanteil. Dagegen steigt der Stofffluß zu den Säuren Acetat, Formiat und Lactat ( $r_{20}$ ,  $r_{21}$ ,  $r_{24}$ ) etwa um den Faktor 20 an, während der Stofffluß im Citratzyklus ( $r_5$  und  $r_6$ ) deutlich geringer ausfällt. Es wäre sinnvoll, mit den vorliegenden Daten [HESSE, 1998] noch die Verhältnisse von FAD zu NAD(P)H in den unterschiedlichen stationären Zuständen zu berechnen.

Der große Vorteil der 2D-Fluoreszenzmessungen im Rahmen des *metabolic engineering* ist, daß Intermediate der Stoffwechselflüsse nicht invasiv direkt in der Zelle gemessen werden können. Bei der Untersuchung von Stoffwechselfläßen mit Hilfe von Offline-Analytik muß gewährleistet werden, daß die Analyte unverändert und in identischen Konzentrationen wie im Medium bzw. in der Zelle vorliegen. Dies bereitet häufig Probleme. Ein schnelles Abstoppen intrazellulärer Prozesse ist oftmals notwendig.

Mit Hilfe von 2D-Fluoreszenzspektroskopie sollte es nach den präsentierten Ergebnissen möglich sein, eine Kultivierung so zu regeln, daß eine nicht gewünschte Sauerstofflimitierung vermieden werden kann. Bei einem starken Anstieg des RFI-Verhältnisses "ox" / "red" oder des Überschreitens des Grenzwertes (von etwa 0,7) müßte durch Erhöhung der Rührerdrehzahl, der Begasungsrate oder des Sauerstoffgehalts in der Begasung einer drohenden Limi-

tierung entgegengewirkt werden. Somit könnte die Produktion von Säuren, die häufig im Produktionsprozeß stören, unterbunden werden.

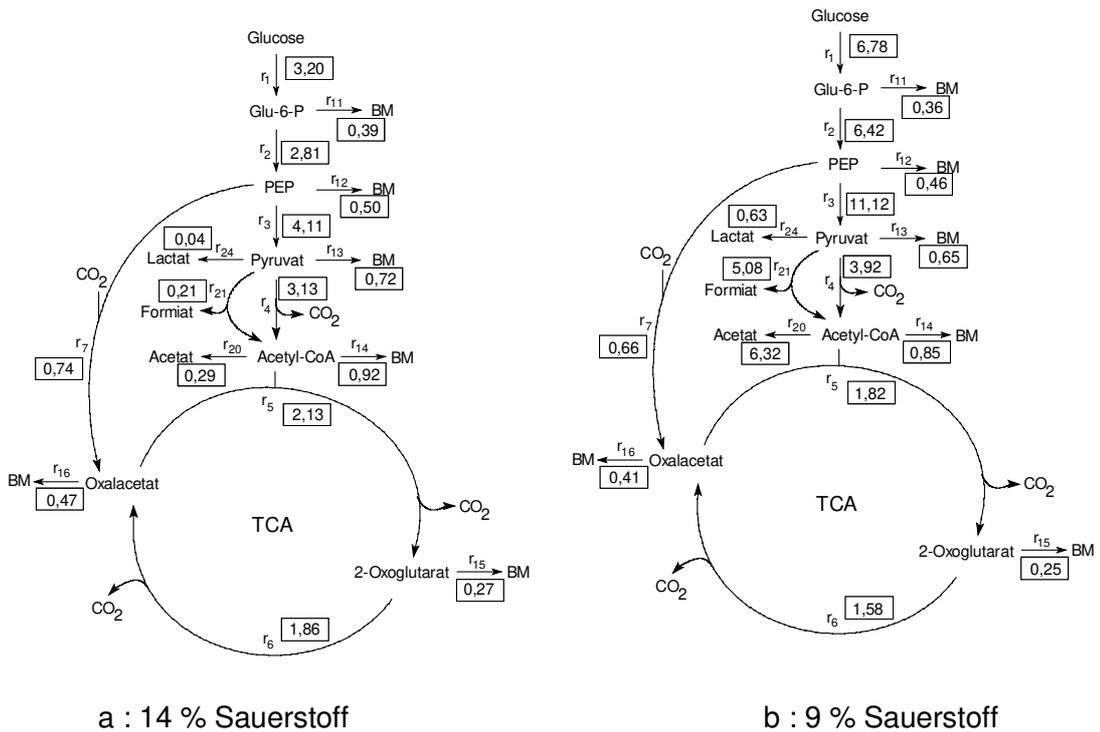


Abb. 4-16: Stoffflüsse bei verschiedenen Sauerstoffgehalten in der Begasung bei einer Verdünnungsrate von jeweils  $0,25 \text{ h}^{-1}$  bei *E. coli* IMW107 [aus HESSE, 1998]

## 5 GFP-Produktion durch *Aspergillus niger* in Fed-Batch-Kultur

### 5.1 Theorie

Grün-fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein, GFP) wurde erstmals 1962 in der Qualle *Aequorea victoria* gefunden. Angeregt mit ultraviolettem oder blauem Licht emittiert GFP grüne Fluoreszenz. Dies wurde ausgenutzt, um GFP als Sonde für die Proteinanalytik in verschiedenen Organismen einzusetzen. Genexpression und auch die Lokalisierung einzelner Proteine in lebenden Zellen wurde auf diese Weise mit GFP als fluoreszierendes Markerprotein, das für die Zellen nicht toxisch ist, durchgeführt [CHALFIE *et al.*, 1994]. Die Produktion von Proteinen spielt in der Biotechnologie eine entscheidende Rolle. Der Einsatz von GFP ermöglicht eine nicht invasive Online-Detektion. So erfordern beispielsweise Scale-Up-Prozesse eine schnelle Produktanalytik, die mit Hilfe von GFP ermöglicht werden soll. GFP-Expression wurde bereits in unterschiedlichsten Organismen (Bakterien, Hefen, filamentöse Pilze, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Tierzellen) untersucht [SIEDENBERG *et al.*, 1999]. Selbst die Produktion von Viren läßt sich mit Hilfe von GFP beobachten [COTE *et al.*, 1998]. Nicht nur zur Bioprozeßbeobachtung [RANDERS-EICHHORN *et al.*, 1997], sondern auch im Verlauf von Aufreinigungsprozessen hat sich der Einsatz von GFP bewährt [POPPENBORG *et al.*, 1997]. Auch für die Zellbiologie und Biomedizin eröffnet GFP vielfältige Möglichkeiten durch den Einsatz von intakten, lebenden Zellen und Organismen als experimentelle Systeme für biologische Screens [MISTELI und SPECTOR, 1997].

GFP ist ein relativ kleines Protein (27 kDa), das aus 238 Aminosäuren besteht. Die chromophore Gruppe, die für die Fluoreszenz verantwortlich ist, wird aus drei benachbarten Aminosäuren (Ser 65 - Tyr 66 - Gly 67) durch Zyklisierung und Oxidation mit atmosphärischem Sauerstoff gebildet. Ein Mechanismus für die Bildung des Chromophors wurde von CUBITT *et al.* vorgeschlagen [CUBITT *et al.*, 1995]. Eine Abhängigkeit der Chromophorbildung von Cofaktoren ist nicht bekannt. Durch N- oder C-terminale Fusion mit dem markierten Protein werden die Fluoreszenzeigenschaften nicht verändert [LOTTSCHEICH und ZORBAS, 1998]. Verschiedene Mutationsvarianten von GFP mit unterschiedlicher Fluoreszenz sind hergestellt worden, die prinzipiell eine Markierung verschiedener Proteine in einem Organismus ermöglichen.

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob sich die GFP-Produktion online mit der Methode der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgen läßt. Die Untersuchungen sollen die Basis legen für eine Online-Quantifizierung von GFP. Diese könnte insbesondere für eine Prozeßregelung bei der Produktion von mit GFP markierten Fusionsproteinen Anwendung finden. Aufbauend auf diese Ergebnisse soll die Regulation des starken und induzierbaren Glucoamylase-Expressionssystems (*glaA*) [DUNN-COLEMAN *et al.*, 1991] unter technisch relevanten Kultivierungsbedingungen durch die Verwendung einer GFP-Mutante als Reporterprotein detaillierter untersucht werden [GANZLIN, 1999].

## 5.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *Aspergillus niger* zur Produktion von GFP wurde von GANZLIN in der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt [GANZLIN, 1999].

Die Transformante *A. niger* AB6.4 $\Delta$ pepE [pAN52-10S65TGFPn/n] Arc2 [SIEDENBERG *et al.*, 1999] enthält den Expressionsvektor mit einer GFP-Mutante (S65T-GFP), deren Expression vom *glaA*-Promotor kontrolliert wird. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von Maltose, einem bekannten Induktor des *glaA*-Promotors. Gegenüber dem nativen GFP sind Verbesserungen durch Mutation des Serin 65 der chromophoren Gruppe zum Threonin (Ser 65  $\rightarrow$  Thr 65) erreicht worden, die zum Mutantenprotein S65T-GFP führte. Dieses zeichnet sich durch verstärkte Fluoreszenzintensität (etwa sechsfach im Vergleich zum Wildtyp) und schnellere auto-oxidative Fluorophorbildung aus [HEIM *et al.*, 1995].

Die Fed-Batch-Kultivierungen wurden in einem 50-L-Stahlreaktor mit einem anfänglichen Arbeitsvolumen von 25 L durchgeführt. Temperatur (25°C), Rührerdrehzahl (400 UpM) und Begasungsrate (13 L/min) wurden konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mit 5,0 mol/L Natronlauge auf 5,5 eingestellt. In dem modifizierten Vogel-Minimalmedium (Kap. 14) dient Xylose als nicht induzierende Kohlenstoffquelle sowie Ammonium und Uridin als Stickstoffquelle. Die Zugabe von Uridin ist notwendig, da der Stamm auxotroph bezüglich Uridin ist.

Tabelle 5.1: Kultivierungsbedingungen

◆ <b>Betriebsweise</b>	Fed-Batch
◆ <b>Organismus</b>	<i>Aspergillus niger</i>
◆ <b>Kultivierungsanlage</b>	50-L-Reaktor (Typ U50K; B. Braun Diessel Biotech GmbH, Melsungen)
◆ <b>anfängliches Arbeitsvolumen</b>	25 L
◆ <b>Prozeßleitsystem</b>	Typ $\mu$ XL; Yokogawa Deutschland GmbH, Ratingen
◆ <b>Medium</b>	modifiziertes Vogel-Minimalmedium (Kap. 14)
◆ <b>Temperatur</b>	25°C
◆ <b>pH</b>	5,5
◆ <b>Begasungsrate</b>	13 L/min
◆ <b>Rührerdrehzahl</b>	400 UpM

Die Induktion der Produktion des Reporterproteins beginnt durch Zugabe von 700 g Zufütterungslösung (Kap. 14) nach dem Verbrauch der Xylose. Der Startwert der folgenden Zufütterung beträgt 1,88 g Maltose/min. Die Zufütterungsrate steigt linear an (0,091 g Maltose $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$ ).

Die Messungen erfolgten online direkt am Edelstahlreaktor (in situ) mit dem F-4500 (Kap. 3). Die Spektometereinstellungen sind in Tabelle 5.2 angegeben.

Tabelle 5.2: Spektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	250-550 nm
• Emissionswellenlängenbereich	260-600 nm
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	30000 nm/s
• Aufnahme-Intervall	10 min

### 5.3 Fluoreszenzeigenschaften des untersuchten GFPs

Vor der Durchführung von Kultivierungen wurde das von dem untersuchten *A. niger*-Stamm produzierte GFP fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Messungen wurden bei 24,6°C im 10-mL-Meßreaktor (Kap. 3) durchgeführt. Die Einstellungen des F-4500 (Kap. 3) entsprachen denen, die auch bei der Prozeßbeobachtung verwendet wurden (Tabelle 5.2). Lediglich die Scangeschwindigkeit wurde auf 12000 nm/min reduziert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern.

Abb. 5-1 zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum einer 10 mg/L GFP-Lösung in KPP-Puffer (pH 5,65; 63,3 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 3,3 mmol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Das GFP-Fluoreszenzmaximum läßt sich bei Ex 490 / Em 510 nm genau lokalisieren, auch wenn es in das Streulicht übergeht. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Literaturangaben über das Fluoreszenzmaximum dieser GFP-Mutante bei Ex 488 / Em 511 nm, die im Vergleich zum nativen GFP (Ex 395 / Em 508 nm) eine Rotverschiebung der Anregungswellenlänge aufweist [CUBITT *et al.*, 1995]. Bei den verwendeten Spektrometereinstellungen sind im dargestellten Fluoreszenzbereich bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm deutliche "Fluoreszenzausstrahlungen" zu erkennen. Bei Ex 290 / Em 510 nm befindet sich ein kleines Nebenmaximum. Der Peak bei Ex 290 / Em 340 nm ist auf den Tryptophan-Anteil des Proteins zurückzuführen. Das Fluoreszenzmaximum von Tryptophan in Proteinen liegt bei Ex 290 / Em 350 nm [WOLFBEIS, 1985]. Das Streulicht hat ein Maximum bei Ex 500 / Em 500 nm. Es fällt vor allem unterhalb von 340 nm deutlich ab. Die Fluoreszenz bei Ex 250 / Em 390 nm ist auf die Eigenfluoreszenz des Lichtleiters zurückzuführen. In dem verwendeten Puffer wurde unter den verwendeten Bedingungen keine Fluoreszenz festgestellt (Spektrum nicht gezeigt).

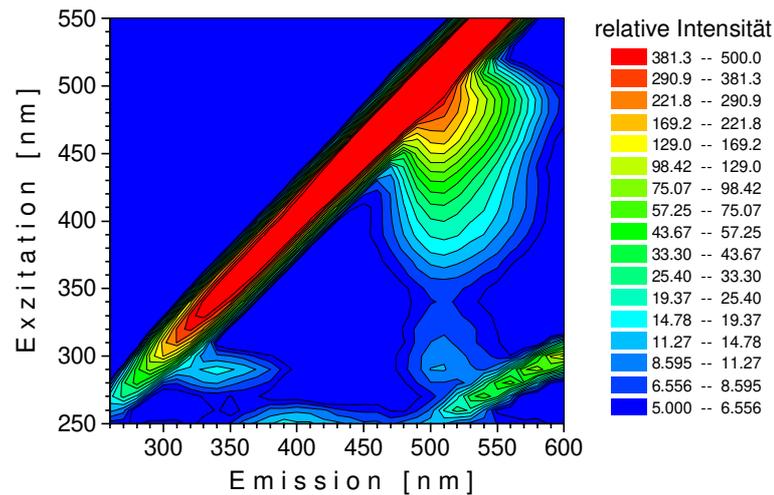


Abb. 5-1: 2D-Fluoreszenzspektrum von reinem GFP (10 mg/L) in KPP-Puffer (pH 5,65)

## 5.4 Fed-Batch-Kultivierung

Um die Fluoreszenzintensitäten mit den Kultivierungsdaten vergleichen zu können, müssen in den 2D-Fluoreszenzspektren die relevanten Bereiche bestimmt werden. Zu diesem Zweck sind in Abb. 5-2 die 2D-Fluoreszenzspektren nach 0 h, 65 h und 137 h Kultivierungsdauer zu sehen. Die ausgewählten Wellenlängenpaare aus den gekennzeichneten Bereichen werden in Tabelle 5.3 und Tabelle 5.4 aufgelistet. Am Anfang der Kultivierung (0 h) ist ein Peak bei Ex 350 / Em 430 nm zu erkennen (Abb. 5-2 a). Um Überlagerungen mit "Bereich 3", der nach 65 h sichtbar ist (Abb. 5-2 b), zu vermeiden, wurde zur Auswertung nur der nicht überlagerte "Bereich 1" des Peaks bei Ex 350 / Em 430 nm verwendet. Auch die obere Hälfte von "Bereich 2" (Abb. 5-2 b) wurde im Laufe der Kultivierung vom "GFP-Maximum" überlagert und daher nicht weiter berücksichtigt. In einem breiten Gürtel um den GFP-Peak herum wurde die "GFP-Umgebung" ausgewertet (Abb. 5-2 c). Im Streulicht wurden vier Bereiche unterschieden (Abb. 5-2 c).

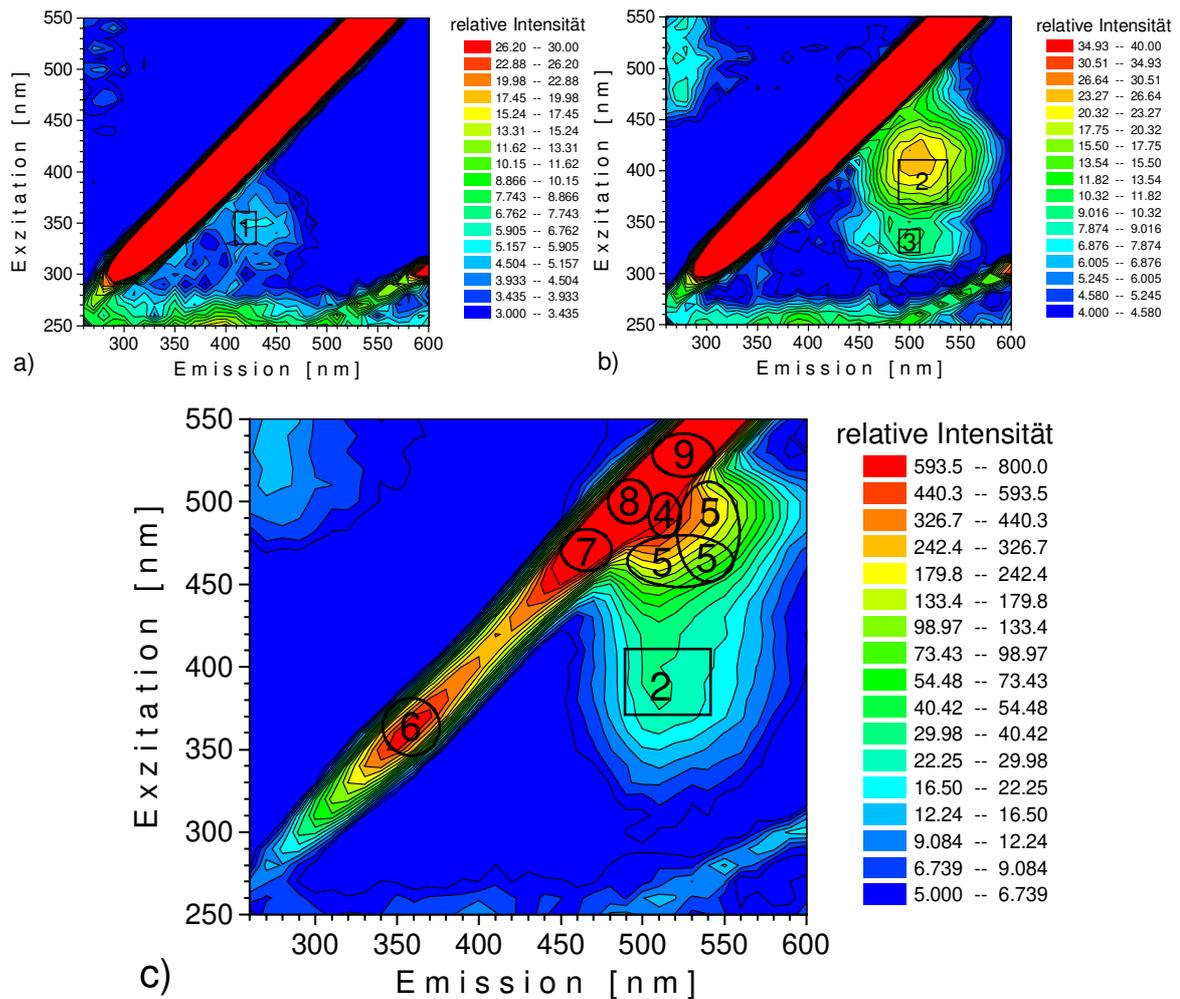
Abb. 5-2: 2D-Fluoreszenzspektren nach 0 h, 65 h und 137 h während der *A. niger*-Kultivierung

Tabelle 5.3: Fluoreszenzbereiche aus Abb. 5-2

Fluoreszenzbereich	1	2	3	4	5
RFI-Maximum Ex / Em [nm]	350/430	410/510	330/500	490/510	
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich Ex / Em [nm]	330/410-430 340/410-430 350/410-430 360/410-430	370/490-540 380/490-540 390/490-540 400/490-540 410/490-540	350/340-360 360/350-370 370/360-380 380/370-390	480/500 490/510 500/520 510/530	450/500-520 460/490-530 470/500-550 480/510-560 490/520-560 500/530-560 510/540-550
Bereichsbezeichnung	"Bereich 1"	"Bereich 2"	"Bereich 3"	"GFP-Maximum"	"GFP-Umgebung"

Tabelle 5.4: Streulichtbereiche aus Abb. 5-2

Streulichtbereich	6	7	8	9
RI-Maximum Ex / Em [nm]	360/360	480/480	500/500	540/540
ausgewählte Wellenlängenpaare im Streulichtbereich Ex / Em [nm]	350/340-360 360/350-370 370/360-380 380/370-390	460/450-470 470/460-480 480/470-490	490/480-500 500/490-510 510/500-520	520/510-530 530/520-540 540/530-550
Bereichsbezeichnung	"Streulicht 360 nm"	"Streulicht 470 nm"	"Streulicht 500 nm"	"Streulicht 530 nm"

Wie aus den von GANZLIN ermittelten Kultivierungsdaten (Abb. 5-3 a und b) hervorgeht, beginnt das Zellwachstum erst nach ca. 50 h. Vorher sind sämtliche dargestellte Daten konstant. Diese lange Adaptionsphase ist damit zu erklären, daß zum Animpfen Sporen des Organismus verwendet werden, die erst nach etwa zwei Tagen entsporulieren. Dieser Entsporulierungszeitpunkt wurde auch unter dem Mikroskop erkannt und fiel zusammen mit dem steilen Anstieg der Trübung nach 53 h. Ab diesem Zeitpunkt wurde Xylose verstoffwechselt, CO<sub>2</sub> produziert und Biotrockenmasse gebildet (Abb. 5-3 a). Bei 79 h erreicht der CO<sub>2</sub>-Gehalt ein Maximum. Da nach diesem Zeitpunkt auch die Biotrockenmasse den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase anzeigt, ist eine Stoffwechselumstellung zu diesem Zeitpunkt sehr wahrscheinlich. Auch die Verstoffwechslung der Xylose ist von dieser Umstellung betroffen. Die mit Hilfe von HPLC-Messungen bestimmten Xylosekonzentrationen müssen wegen einer Querempfindlichkeit zum Malat noch nach unten korrigiert werden. Im Verlauf der Batch-Phase zwischen 53 h und 83 h spiegeln Biomasse und Trübung das Zellwachstum wider. Die volumetrische und die auf die Biotrockenmasse bezogene spezifische GFP-Konzentration steigt in dieser Zeit bis auf 10 mg/L bzw. 2 mg GFP pro g BTM leicht an. Zur Induktion der GFP-Produktion wurden 700 g Zufütterungslösung der Kultivierung nach 83 h zugefügt. Etwa 5 h später, nach 88 h steigt die GFP-Konzentration steil an, bis sie nach 109 h den etwa 14fachen Wert, ihr Maximum bei etwa 110 mg/L, erreicht. Die spezifische GFP-Konzentration steigt sofort mit der Induktion steil an und erreicht ihr im Vergleich vor der Induktion 5faches Maximum (10 mg GFP pro g BTM) bereits nach 102 h. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Abgas verläuft nach 83 h, 85 h und 88 h durch ein Minimum. Nach 83 h und 88 h fällt die Trübung ab. Die Biotrockenmasse bleibt zwischen 83 h und 93 h weitgehend konstant. Nach der Zufütterung der Maltose zur Induktion nach 83 h wurde die Zufütterungslösung bis zum Ende der Kultivierung mit linear ansteigender Rate kontinuierlich zugegeben. In dieser Zeit steigen Biotrockenmasse und Trübung an. Der Verlauf der Trübung sinkt steil ab zu den Zeitpunkten der Antischaummittelzugabe nach 109 und 124 h [GANZLIN, 1999].

Abb. 5-3 c zeigt die RFI ("GFP-Maximum") und die RFI ("GFP-Umgebung"), außerdem die RI in den angrenzenden "Streulichtbereich 500 nm" und "Streulichtbereich 470 nm". Die in kleinen Quadraten dargestellten Werte sind lediglich im jeweiligen Bereich gemittelt, nicht über die Zeit. Sie weisen im Streulichtbereich eine relativ große Streuung auf.

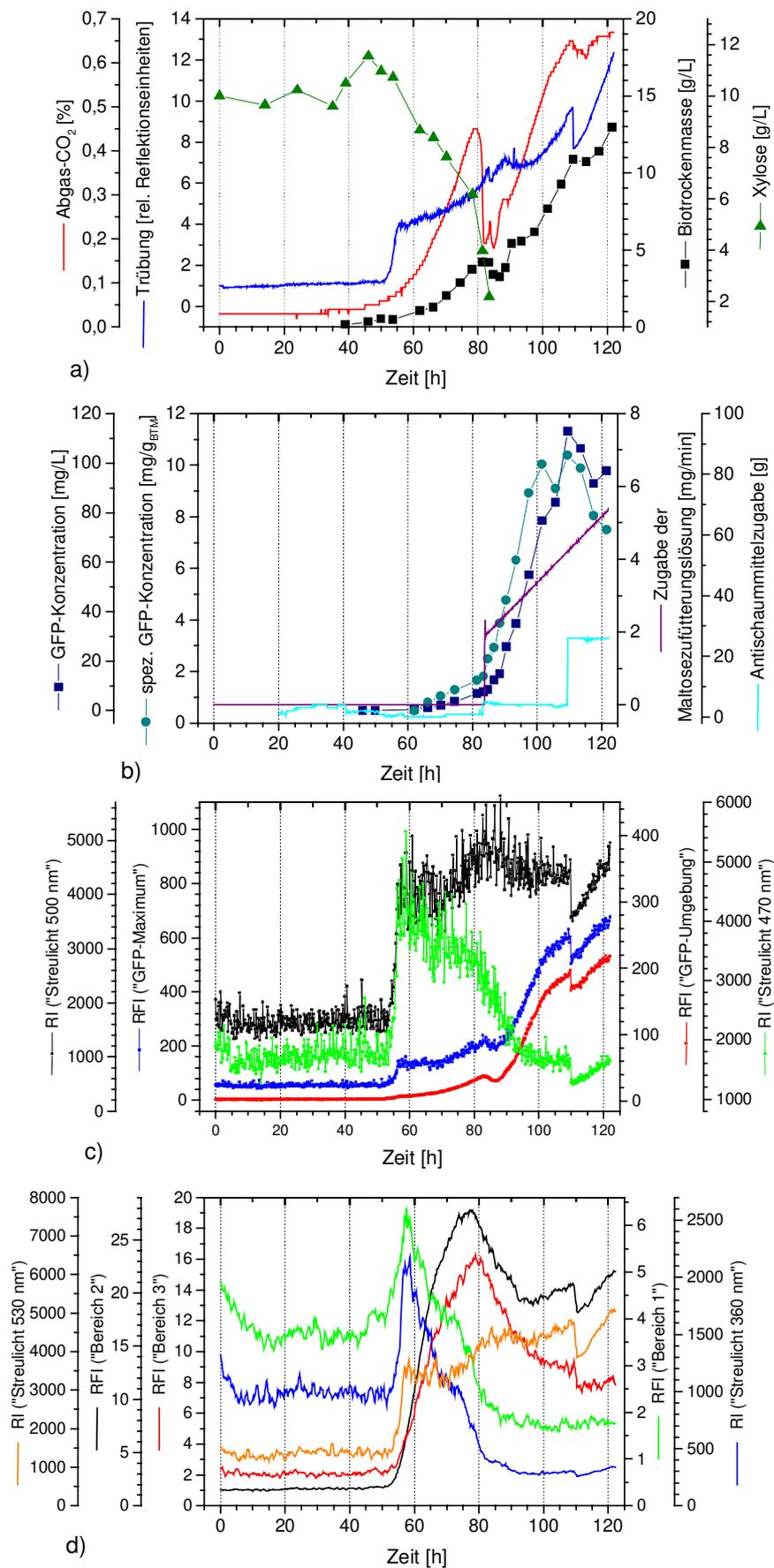


Abb. 5-3: Verlauf ausgewählter Kultivierungsdaten (a,b) und RFI-Verläufe der in Abb. 5-2 bestimmten Bereiche (c,d) der Fed-Batch-Kultivierung von *A. niger*

Der Zeitpunkt der Entsporulierung nach 53 h führt durch die vermehrte Reflektion der gebildeten Myzelien zu einem starken Intensitätsanstieg. Dieser wird auch deutlich sichtbar in der RFI ("GFP-Maximum"), die sich ziemlich dicht am Streulicht befindet (Abb. 5-1). Dies dürfte auch die Erklärung dafür sein, daß die Intensitäten in der GFP-Umgebung wesentlich weniger verrauscht sind als im Maximum. Auch wirkt sich die Entsporulierung nicht auf den Intensitätsverlauf in der GFP-Umgebung aus. Aus diesen Gründen wird für die folgende Korrelation mit den Offline-GFP-Daten der Verlauf der GFP-Umgebung verwendet.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Intensitätsverläufe in Abb. 5-3 d nicht nur über den jeweiligen Bereich, sondern außerdem noch fünf Punkte zeitlich gemittelt.

In den ersten 50 h, der Adaptionzeit der Sporen, zeigen neben den Kultivierungsdaten auch die in Abb. 5-3 c und d gezeigten Intensitäten keine Veränderungen. Lediglich in den ersten 15 h kommt es zur Intensitätsabnahme im "Bereich 1" und auch im weitgehend parallel verlaufenden "Streulicht 360 nm", dessen Wellenlängen sich mit den Anregungswellenlängen im "Bereich 1" überschneiden, nimmt in den ersten 5 h die Intensität ab. Die Entsporulierung nach 53 h führt zu einem Anstieg sämtlicher in Abb. 5-3 c und d gezeigten Intensitätsverläufe bis auf den Bereich der "GFP-Umgebung". Während alle diese Kurven nach etwa 4 h ihr Maximum erreicht haben, steigen die RFI ("Bereich 2") und RFI ("Bereich 3") bis zur durch das CO<sub>2</sub>-Maximum angezeigten Stoffwechsellage nach 79 h weiter an. Während der Verstoffwechsellage der Xylose von 53 h bis 83 h fallen die Intensitäten in den Bereichen "Bereich 1" und "Streulicht 360 nm" ab. Nach der Zugabe von 700 g der Zufütterungslösung kommt es zur Abnahme sämtlicher dargestellter Streulicht- und Fluoreszenzintensitäten. Dies könnte auf den Verdünnungseffekt und Quencheffekte zurückzuführen sein, sowohl die gelb gefärbte Spurenelementlösung als auch das bei Ex 260 / Em 318 nm fluoreszierende Uridin [LONGWORTH *et al.*, 1960] verändern die optischen Eigenschaften des Mediums. Zeitgleich mit dem GFP-Produktionsbeginn nach 88 h steigen die RFI ("GFP-Maximum") und die RFI ("GFP-Umgebung") steil an. Dieser Anstieg wird flacher, als nach 102 h das Maximum des auf die Biotrockenmasse bezogenen spezifischen GFPs erreicht ist. Die Zugabe von etwa 20 g Antischaummittel nach 109 h führt zu einer deutlichen Abnahme von den RFI ("GFP-Maximum", "GFP-Umgebung", "Bereich 2") und von den RI ("Streulicht 470 nm", "Streulicht 500 nm", "Streulicht 530 nm").

Tabelle 5.5 stellt zu ausgewählten Kultivierungszeiten die Veränderungen von Kultivierungsdaten den Ergebnissen der 2D-Fluoreszenzmessungen gegenüber.

Tabelle 5.5: Veränderungen von Kultivierungsdaten und Fluoreszenz- und Streulichtintensitäten im Verlauf der Kultivierung von *A. niger* zur Produktion von GFP

Kultivierungszeit	Veränderungen in den Kultivierungsdaten	Veränderungen in den Fluoreszenz- bzw. Streulichtbereichen
53 h Entsporulierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ steiler Anstieg der Trübung</li> <li>◆ Beginn der Xyloseverstoffwechslung, CO<sub>2</sub>-Produktion, BTM-Anstieg</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ steile Zunahme in allen Streulicht- und Fluoreszenzbereichen (Ausnahme: RFI ("GFP-Umgebung"))</li> </ul>
79 h Stoffwechselumstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ CO<sub>2</sub>-Maximum</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Maximum RFI ("Bereich 2") und RFI ("Bereich 3")</li> </ul>
83 h Induktion durch Zugabe von Zufütterungslösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Abbruch des BTM-Anstiegs</li> <li>◆ steiler Anstieg der spez. GFP-Konzentration</li> <li>◆ erneuter CO<sub>2</sub>-Anstieg</li> <li>◆ Trübungsabfall</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Ende der Abnahme RI ("Streulicht 530 nm")</li> <li>◆ Maximum RFI ("GFP-Umgebung") und RFI ("GFP-Maximum")</li> </ul>
88 h GFP-Produktionsbeginn	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ steiler Anstieg der GFP-Konzentration</li> <li>◆ Minimum im CO<sub>2</sub></li> <li>◆ Maximum in der Trübung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ steile Zunahme RFI ("GFP-Umgebung") und RFI ("GFP-Maximum")</li> </ul>
102 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Maximum spez. GFP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Zunahme RFI ("GFP-Umgebung") und RFI ("GFP-Maximum") flacht ab</li> </ul>
109 h Zugabe von Antischaummittel	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Abfall von Trübung und CO<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ deutliche Abnahme RI ("Streulicht 470 nm"), RI ("Streulicht 500 nm"), RI ("Streulicht 530 nm"), RFI ("Bereich 2"), RFI ("GFP-Umgebung") und RFI ("GFP-Maximum")</li> </ul>

Die Korrelation der RFI ("GFP-Umgebung") mit der offline ermittelten GFP-Konzentration ist vor allem im Bereich der GFP-Produktion von 88 h bis 105 h deutlich linear (Abb. 5-4). Vorher wirken sich Überlagerungen mit RFI ("Bereich 2") und der in diesem Bereich fluoreszierenden Flavinderivate, die parallel zum Zellwachstum von 53 h bis 83 h ansteigen, und der Verdünnungseffekt durch die Induktion aus. Nach 105 h ist die optische Online-Fluoreszenzmessung stark von der Zugabe des Antischaummittels beeinflusst worden.

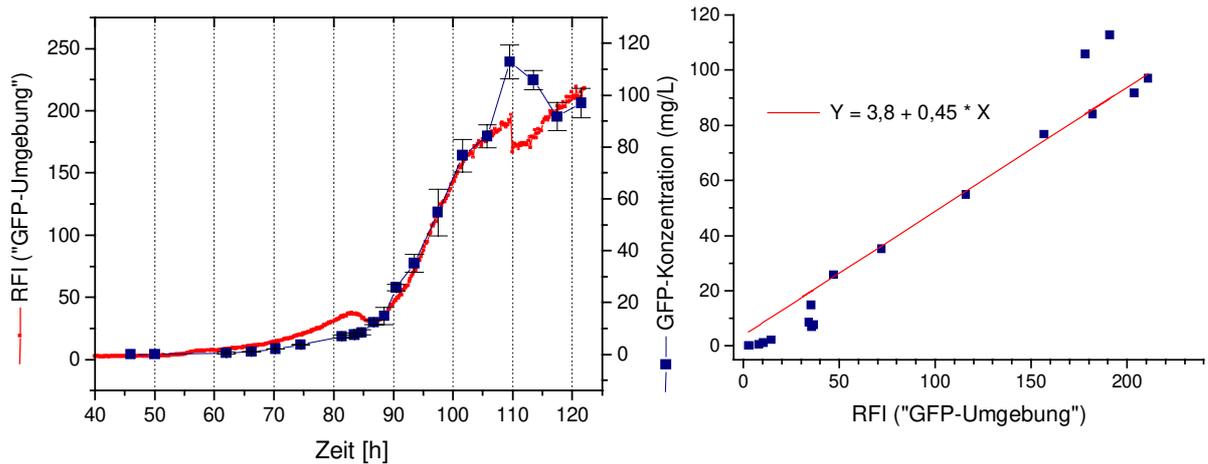


Abb. 5-4: Korrelation der GFP-Konzentration mit der RFI ("GFP-Umgebung") (siehe Abb. 5-2 c), angegeben sind die Fehlerbalken der jeweiligen Dreifachbestimmung

Die Trübung und die RI ("Streulicht 530 nm") weisen Übereinstimmungen mit der Biotrockenmasse und damit mit dem Zellwachstum auf (Abb. 5-5).

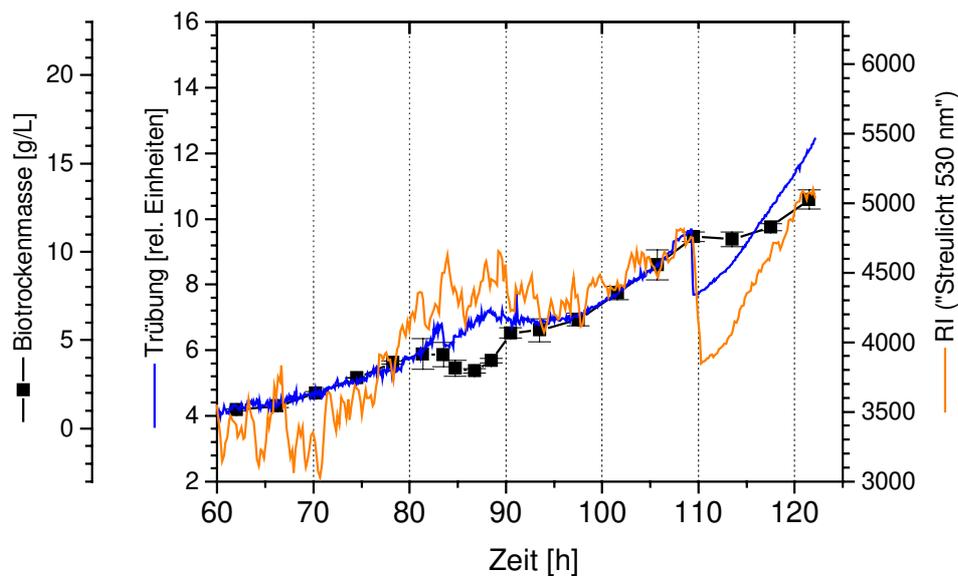


Abb. 5-5: Verlauf von Biotrockenmasse, Trübung und RI ("Streulicht 530 nm"), angegeben sind die Fehlerbalken der jeweiligen Dreifachbestimmung (Daten aus Abb. 5-3)

## 5.5 Diskussion

In Tabelle 5.5 wird die Qualität von Fluoreszenzmessungen zur Beobachtung des Metabolismus deutlich erkennbar. So wird die durch das CO<sub>2</sub>-Maximum angezeigte Stoffwechsellumstellung auch von RFI ("Bereich 2") und RFI ("Bereich 3") wiedergegeben. Eine Veränderung in den optischen Eigenschaften durch die Entsporulierung, Zugabe der Zufütterungslösung oder von Antischaummittel wirkt sich besonders auf die Streulichtintensitäten aus.

Zum Zellwachstum der filamentösen Pilze, das vor allem nach der Induktion stark ansteigt, weist lediglich die RI ("Streulicht 530 nm") teilweise Übereinstimmungen auf (Abb. 5-5). Der bei anderen Kultivierungen mit dem Zellwachstum korrelierende Proteinfluoreszenzbereich um Ex 280 / Em 350 nm ist auf dem 2D-Fluoreszenzspektrum vermutlich wegen Fluoreszenzlöschung durch den starken Fluorophor GFP nicht zu erkennen (Abb. 5-2).

Die Offline-Bestimmungen des GFPs sind zeit- und arbeitsaufwendig. Die Einsatzmöglichkeiten der GFP-Fluoreszenz werden erst durch die Möglichkeit der Online-Messung voll entfaltet. Bevor Expressionssysteme genauer online untersucht werden können, müssen gute Korrelationen der Online-Daten mit den offline ermittelten GFP-Gehalten gefunden werden. Der Bereich um das GFP-Maximum herum (Bereich "GFP-Umgebung") ist bei den verwendeten Spektrometereinstellungen für die Auswertung geeigneter als das eigentliche, stark vom Streulicht beeinflusste GFP-Maximum (Bereich "GFP-Maximum"). Besonders in der Zeit der GFP-Produktion konnte das Online-Signal der RFI ("GFP-Umgebung") gut mit dem offline bestimmten GFP-Gehalt korreliert werden (Abb. 5-4). Wegen zunehmender Absorption fällt in diesem Zeitraum die RI ("Streulicht 470 nm"), etwas schwächer auch im Bereich "Streulicht 500 nm". GFP wird cytoplasmatisch expremiert und bleibt in der Zelle. Der GFP-Gehalt der zellfreien Überstände wächst im Kultivierungsverlauf auf Grund von Zell-Lyse kontinuierlich an, bleibt jedoch unterhalb von 10 mg/L (GANZLIN, 1999) und sollte sich daher in den Online-Messungen wenig auswirken.

Da die Korrelation der RFI ("GFP-Umgebung") auch am Ende der Kultivierung gut ist, kann davon ausgegangen werden, daß der Sättigungsbereich der Fluoreszenz noch nicht überschritten ist.

Photobleaching und durch Bestrahlung ausgelöste Dimerisation des GFPs, die teilweise beim Mikroskopieren beobachtet werden, können ausgeschlossen werden, da nur die kleine Fläche vor dem Sensorkopf alle 10 min kurzfristig bestrahlt wird.

Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie sollte es möglich sein, die Produktion mehrerer verschiedener Proteine parallel auf einem 2D-Spektrum zu verfolgen, sofern diese mit unterschiedlich mutierten GFPs markiert sind, die sich in ihren Fluoreszenzspektren deutlich unterscheiden.

## 6 Batch-Kultivierungen von *Claviceps purpurea* zur Ergotalkaloidproduktion

### 6.1 Theorie

Der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* gehört zur Klasse der *Ascomyceten* (Schlauchpilze). Er verursacht die Bildung des dunkelpurpurfarbenen Mutterkorns (Sklerotium) beim Roggen. Von biotechnologischer Bedeutung ist die Produktion von Ergotalkaloiden (Lysergsäurederivate wie Ergobasine, Ergotoxine und Ergotamine) im Sekundärmetabolismus, die neben der künstlichen Beimpfung von Roggen auch durch Kultivierung von *C. purpurea* im Bioreaktor gewonnen werden können [SCHLEGEL, 1992]. Der bei den hier dargestellten Kultivierungen verwendete Stamm trägt die Stammmnummer 1029N5 und wurde von KELLER, Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, TU Berlin, zur Verfügung gestellt.

Neben anderen Alkaloiden produziert dieser Stamm vorwiegend das in Abb. 6.1 dargestellte Ergotamin [LOHMEYER *et al.*, 1990]. Wie auch die anderen Vertreter der Ergotalkaloide weist es als Indolderivat eine starke Fluoreszenz auf [WOLFBELIS, 1985].

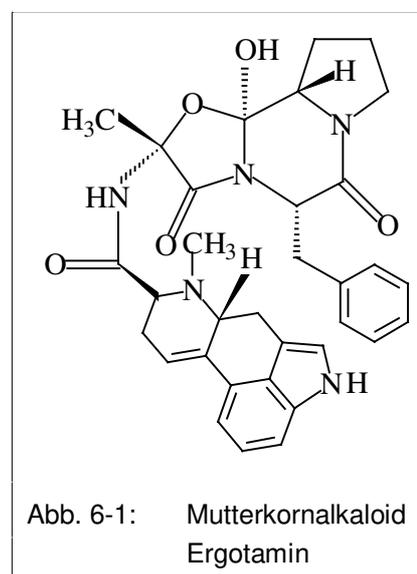
Alkaloide sind für die pharmazeutische Industrie von hohem Interesse. Die Weltjahresproduktion an Ergotalkaloiden beträgt mehr als 15 t pro Jahr. Ergotalkaloide finden unter anderem bei Migräne, Parkinsonismus und der Stillung postnataler Blutungen Verwendung. Zur Biosynthese der Ergotalkaloide wird (+)-Lysergsäure benötigt, die durch Verknüpfung von je einem Molekül Tryptophan und Mevalonsäure und anschließende Cyclisierung zu einem komplexen Ringsystem entsteht. Das Lysergsäure-diethylamid (LSD) kann synthetisch aus der durch Hydrolyse der Ergotalkaloide gewonnenen Lysergsäure hergestellt werden [KOBEL und SANGLIER, 1986].

Untersucht werden soll in diesem Kapitel, inwieweit die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Quantifizierung des Alkaloidgehalts im Kultivierungsverlauf dienen kann und ob sie sich zur Korrelation mit Biotrockenmasse und Proteingehalt eignet. Dabei soll auch die Übertragung der gefundenen Zusammenhänge von einer Kultivierung auf eine andere geprüft werden.

### 6.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierungen wurden von MENGE im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover [MENGE, 1999] durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen werden in Tabelle 6.1 aufgelistet.

Zur Schonung der scherstreßempfindlichen Organismen wurden anfangs geringe Rührerdrehzahlen und Begasungsraten gewählt. Um zunächst für das Zellwachstum, später für die



Ergotalkaloidproduktion genügend Sauerstoff zuzuführen, wurden sie im Verlauf der Kultivierungen erhöht.

Die Regelung des pH-Wertes erfolgte über die Regeleinheit des Biostaten. Zur Korrektur wurden 10 %ige Natronlauge und 4 %ige Salzsäure verwendet.

Tabelle 6.1: Kultivierungsbedingungen

♦ <b>Betriebsweise</b>	Batch
♦ <b>Organismus</b>	<i>C. purpurea</i> 1029 N5
♦ <b>Kultivierungsanlage</b>	Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen) Edelstahlrührkesselreaktor (Werkstatt TCI) mit drei Paddelrührern (Werkstatt TCI) statt der üblichen Scheibenrührer
♦ <b>Arbeitsvolumen</b>	2 L
♦ <b>Meßdatenerfassung</b>	RISP (Realtime Integrating Software Platform, TCI)
♦ <b>Medium</b>	T25N - Medium nach AMICI (Kap. 14)
♦ <b>Temperatur</b>	24°C
♦ <b>pH</b>	5,2
♦ <b>Begasungsrate</b>	variabel 0,5 - 3,5 vvm (1 - 7 L/min)
♦ <b>Rührerdrehzahl</b>	variabel 250-425 UpM

Die Online-Messungen der Kulturfluoreszenz mit dem F-4500 (Kap. 2) wurden direkt am Edelstahlreaktor (in situ) durchgeführt. Die Einstellungen des F-4500 sind in Tabelle 6.2 angegeben.

Tabelle 6.2: Spektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	270-500 nm
• Emissionswellenlängenbereich	290-600 nm
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions- Spaltbreite	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	30000 nm/s
• Aufnahme-Intervall	5 bzw. 15 min

Küvettenmessungen wurden in der Mikroküvette (10 · 5 mm), die quer zum Anregungslicht eingesetzt wurde, durchgeführt. Die Spektrometer-Einstellungen entsprechen im wesentlichen Tabelle 6.2. Um den Meßbereich nicht zu überschreiten, mußten jedoch die Exzitations-Spaltbreite auf 2,5 nm (bei Verdünnung 1:200 auf 5 nm) und die Emissions- Spaltbreite auf 5 nm (bei Verdünnung 1:200 auf 10 nm) verkleinert werden. Die verringerte Scangeschwindigkeit von 12000 nm/min führte zu einem größeren Signal-Rausch-Verhältnis.

Vorgestellt werden sollen zwei Kultivierungen, die beide unter den oben angegebenen Bedingungen durchgeführt wurden, sich jedoch dadurch unterscheiden, daß in der zuerst vorgestellten Kultivierung kein Antischaummittel verwendet wurde und in der anderen 0,1 VV% Desmophen zur Schaumzerstörung dem Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt wurde. Bei erneuter Schaumentwicklung wurde im Verlauf dieser Kultivierung mehrmals 2 mL Desmophen zugefügt [MENGE, 1999].

### 6.3 2D-Fluoreszenzspektren reiner Ergotalkaloide

Um im Verlauf der Kultivierungen die Ergotalkaloidfluoreszenz zu untersuchen, ist es notwendig, vorher 2D-Fluoreszenzspektren von reinen Substanzen aufzunehmen. Dafür wurde eine mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  1:100 verdünnte saure Methanollösung (pH=2-3) von Ergotaminhemitartrat (Endkonzentration 5,0 mg/L) und  $\alpha$ -Ergokryptin (Endkonzentration 5,8 mg/L) in der Mikroküvette vermessen (Abb. 6-2).

Unter den gewählten Bedingungen lassen sich die beiden Ergotalkaloide fluoreszenzspektroskopisch nicht unterscheiden. Das Intensitätsmaximum liegt bei Ex 320 / Em 440 nm (Abb. 6-2). In der Literatur wird für Ergotamin in wässriger Lösung ein Fluoreszenzmaximum von Ex 320 / Em 435 nm bei einer hohen Quantenausbeute von 0,8 angegeben [WOLFBEIS, 1985].

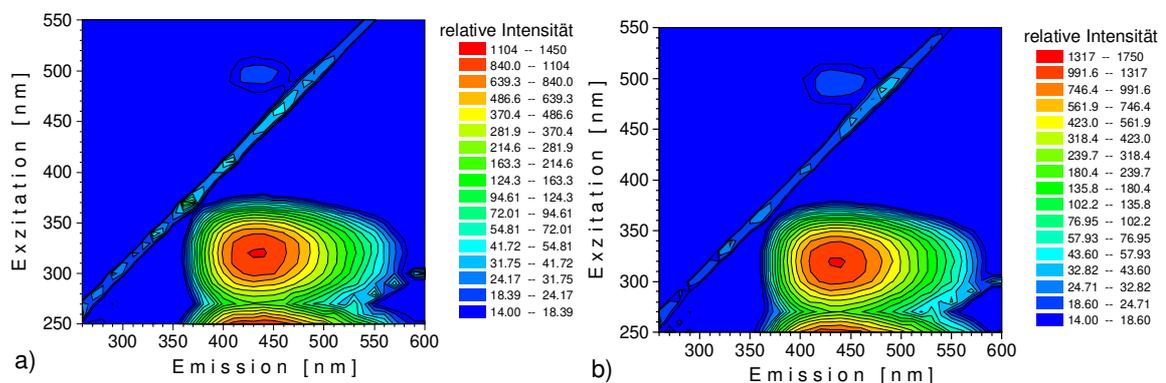


Abb. 6-2: 2D-Fluoreszenzspektren von a) Ergotaminhemitartrat und b)  $\alpha$ -Ergokryptin

### 6.4 Bioprozeßbeobachtung mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie

#### 6.4.1 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren über den gesamten Kultivierungsverlauf

Zur Ermittlung von relevanten Fluoreszenzbereichen, deren Intensitäten im Kultivierungsverlauf der Kultivierung ohne Antischaummittelzusatz verfolgt werden sollen, dient ein 2D-Fluoreszenz-Differenzspektrum (Abb. 6-3 c). Dieses entsteht aus Subtraktion des 2D-Fluoreszenzspektrums am Ende (Abb. 6-3 b) von dem am Anfang der Kultivierung (Abb. 6-3 a).

Am Anfang ist die geringe Eigenfluoreszenz des Mediums zu sehen mit einem Intensitätsmaximum bei Ex 370 / Em 450 nm. Im Streulicht wird in allen Spektren sichtbar, daß bei kleineren Wellenlängen im Anregungsbereich (vor allem unterhalb 300 nm) starkes Quenchen auftritt. Die geringe Fluoreszenz bei Ex 250 / Em 400 ist auf die Lichtleitereigenfluoreszenz zurückzuführen [HILMER, 1996].

Im 2D-Fluoreszenzspektrum vom Ende der Kultivierung, wie auch im Differenzspektrum, sind zwei Fluoreszenzbereiche zu erkennen (Abb. 6-3 b und c). In Tabelle 6.1 werden in diesen Bereichen und auch im Streulicht Wellenlängenpaare ausgewählt, über die im folgenden Kapitel die RFI gemittelt werden.

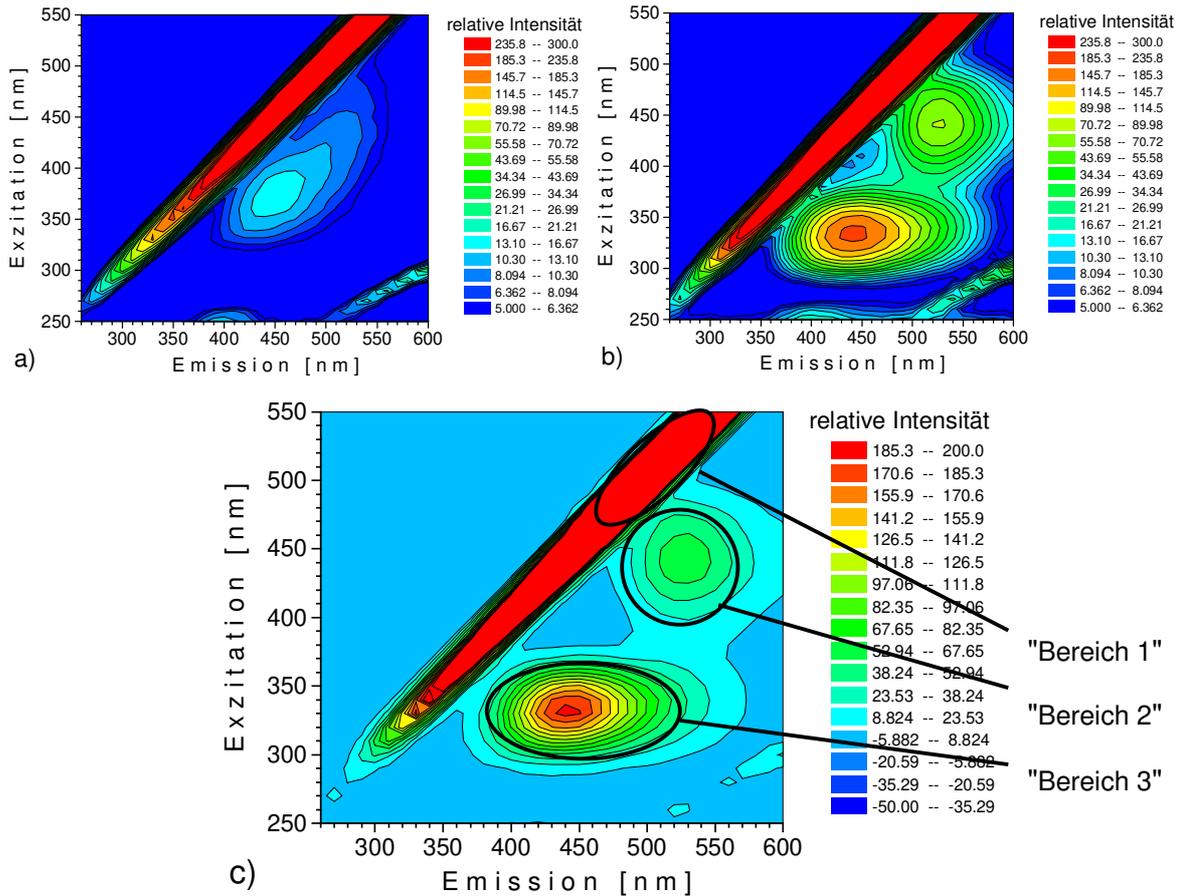


Abb. 6-3: 2D-Fluoreszenzspektren a) bei Kultivierungsbeginn b) am Ende der Kultivierung ohne Antischaummittel und c) Differenz-Spektrum (2D-Fluoreszenzspektrum b minus a)

Tabelle 6.3: Auswahl von Wellenlängenpaaren in den Fluoreszenzbereichen aus Abb. 6-3

Bereich	"Bereich 1"	"Bereich 2"	"Bereich 3"
RFI-Peak Ex / Em [nm]	550/550	440/530	330/440
Art des Peaks	Zunahme		
zugeordnete biogene Fluorophore	Streulicht	Riboflavin, FMN, FAD	Ergotamin
Literaturwerte Ex / Em [nm]	-	450/520	330/440
Literaturzitat		WOLFBEIS 1985	(Kapitel 6.3)
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich Ex / Em [nm]	480/470-490	430/500-540	310/400-480
	490/480-500	440/510-540	320/400-500
	500/490-520	450/510-540	330/390-510
	510/500-520	460/520-530	340/400-510
	520/510-530		350/400-500
	530/520-540		360/400-480
	540/530-550		
550/540-560			
Bereichsbezeichnung	"Streulicht"	"Flavine"	"Alkaloide"

### 6.4.2 Verlauf der Fluoreszenzintensitäten

In den ersten 210 h zeigen die in dem Bereich der Alkaloide gemittelten Fluoreszenzintensitäten eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Proteingehalt im Medium (Abb. 6-4).

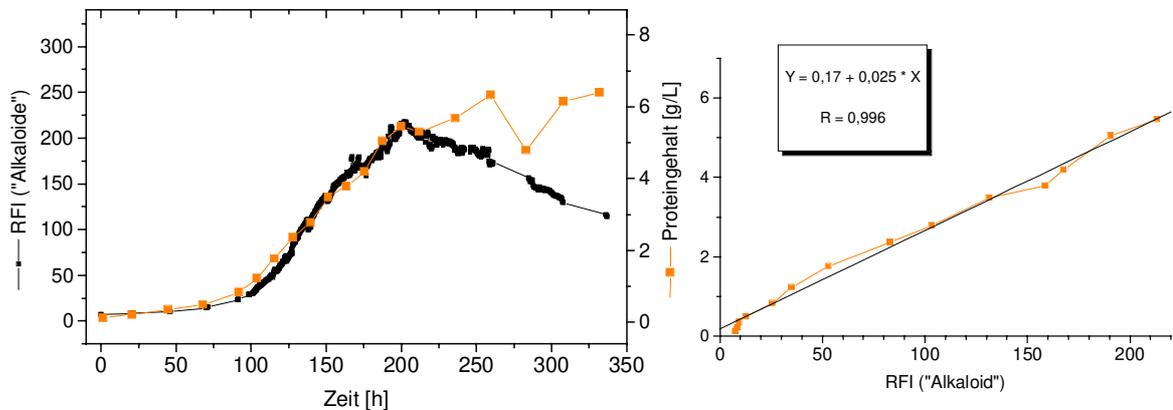


Abb. 6-4: Korrelation der Online-Fluoreszenz im Bereich der Alkaloide mit dem Proteingehalt

Eine lineare Korrelation zeigen auch die Intensitäten im Streulichtbereich mit der Biomasse in den ersten 130 Kultivierungsstunden (Abb. 6-5). Bereits nach 25 h erfolgt ein deutlicher Anstieg der Biotrockenmasse, während der Proteingehalt im Medium erst nach etwa 100 h ansteigt (Abb. 6-4).

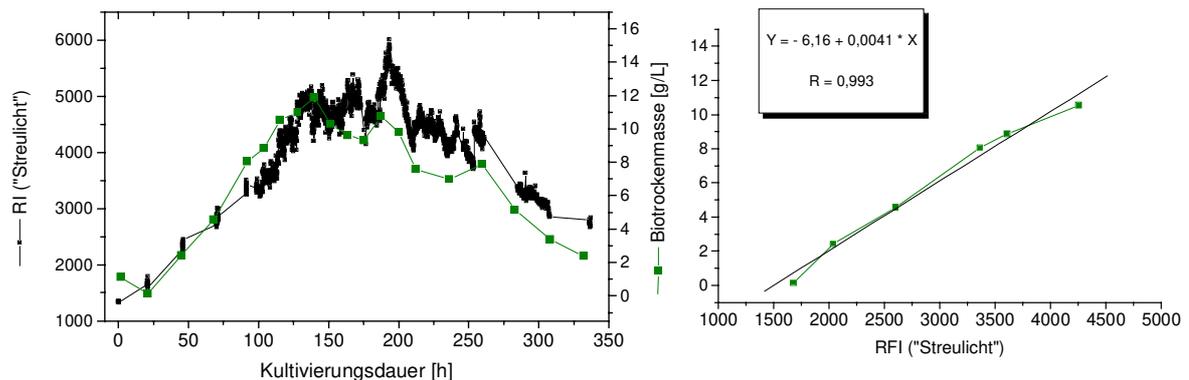


Abb. 6-5: Korrelation der Online-Intensitäten im Streulicht mit der Biotrockenmasse

Die Fluoreszenz im Bereich der Flavine steigt zwischen 120 h und 200 h linear mit dem Alkaloidgehalt an (Abb. 6-6). Eine gute Übereinstimmung ist über den gesamten Kultivierungsverlauf gegeben. Im Gegensatz zu den übrigen Bereichen steigt die Intensität bis zum Kultivierungsende an.

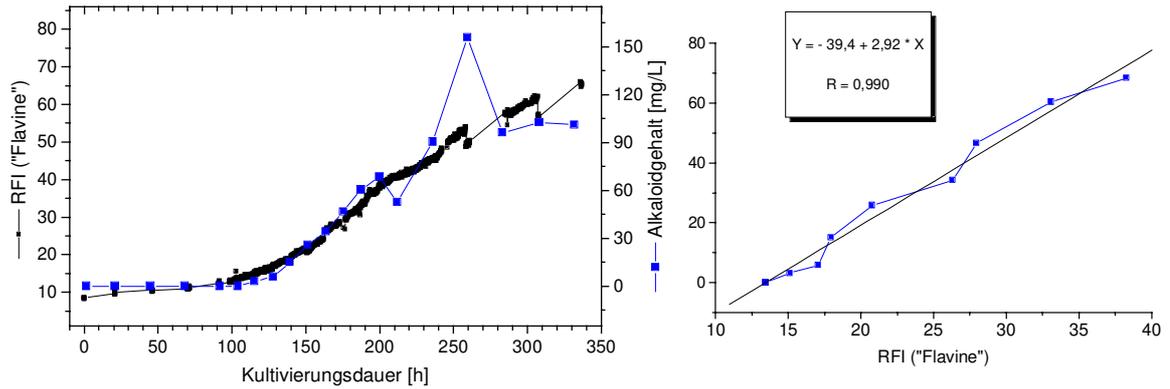


Abb. 6-6: Korrelation der Online-Fluoreszenz im Bereich der Flavine mit dem Gesamtalkaloidgehalt

In den ersten 200 h, bis zum Absinken der RFI, lässt sich der Gesamtalkaloidgehalt durch ein Polynom 2. Grades mit Hilfe der Fluoreszenz im Alkaloidbereich beschreiben (Abb. 6-7).

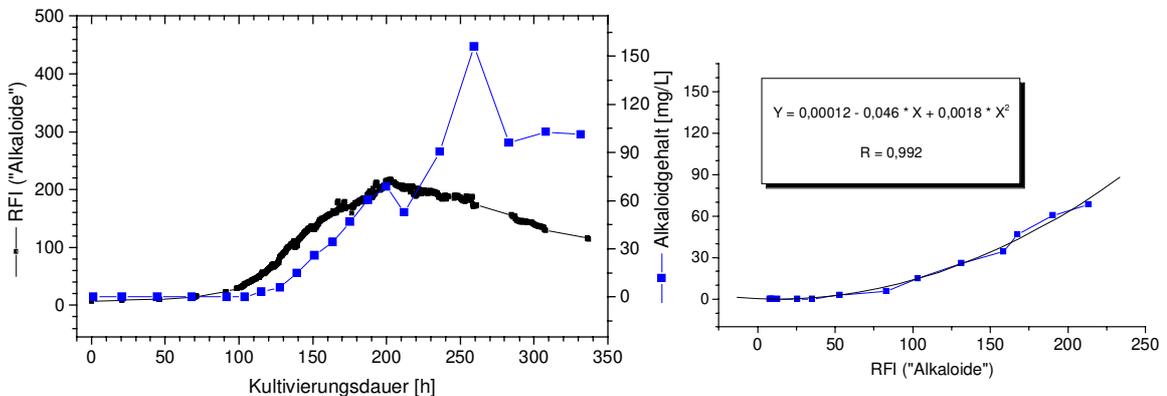


Abb. 6-7: Korrelation der Online-Fluoreszenz im Bereich der Alkaloide mit dem Gesamtalkaloidgehalt

Übereinstimmungen von der RFI ("Alkaloide") zum Proteingehalt, von der RFI ("Flavine") zum Alkaloidgehalt und der RI ("Streulicht") mit der Biotrockenmasse wurden auch in den ersten 8 bis 10 Tagen vergleichbarer anderer Kultivierungen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die in einer Kultivierung bestimmten Zusammenhänge der RFI von den Offline-Daten sollen auf eine andere Kultivierung übertragen werden. Abb. 6-8 a zeigt die RFI ("Alkaloide") und die RFI ("Flavine") im Vergleich zu Offline-Daten in einer vergleichbaren anderen *C. purpurea*-Kultivierung, in der Desmophen als Antischaummittel eingesetzt wurde. Ab etwa 70 h steigt der extrazelluläre Proteingehalt an, in Übereinstimmung mit den Fluoreszenzintensitäten im Alkaloidbereich. Die RFI ("Flavine") nimmt, wie auch die RFI ("Alkaloide"), erst nach 100 h zu. Bis etwa 160 h lassen sich die Fluoreszenzintensitäten mit den Offline-Daten korrelieren, danach wird ein Maximum durchlaufen, und die Kurven fallen ab. Der Alkaloidgehalt steigt im Vergleich mit der vorher dargestellten Kultivierung ohne Antischaummittel (Abb. 6-6) auf einen etwa um den Faktor fünf erhöhten Endwert an. Im Unterschied zur anderen Kultivierung (Abb. 6-5) steigt die Biotrockenmasse bis zum Kultivierungsende an (Abb. 6-8 b). Auch die Intensitäten im Streulicht fallen in der zweiten Kultivierungshälfte ab.

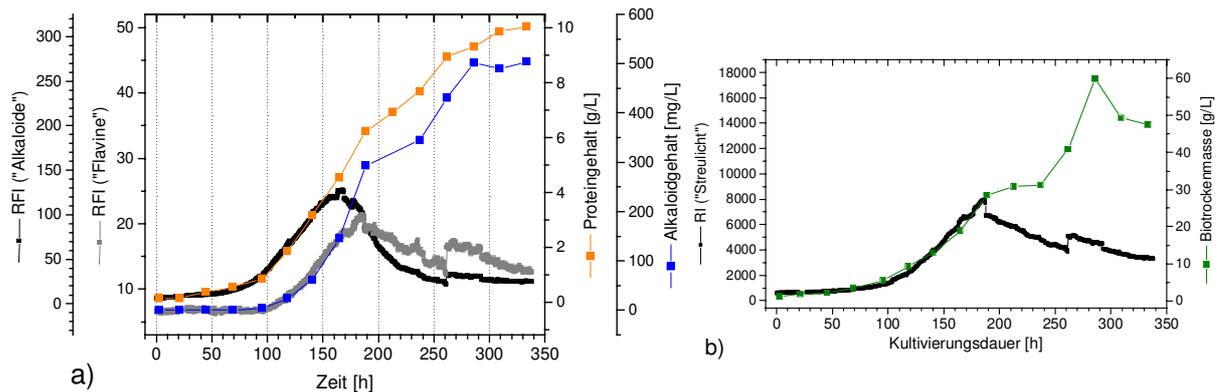


Abb. 6-8: a) Online-RFI-Verläufe in den Bereichen der Alkaloide und Flavine im Vergleich zum Proteingehalt im Medium und zum Gesamtalkaloidgehalt und b) Intensitätsverlauf im Streulicht im Vergleich zur Biotrockenmasse bei der *C. purpurea*-Kultivierung mit Antischaummittelzugabe

In Tabelle 6.4 werden RFI in den beiden untersuchten Kultivierungen Offline-Daten zugeordnet. Ausgewählt wurden die jeweils letzten Werte der Korrelationsdiagramme von Abb. 6-4 bis Abb. 6-7 (rechte Seite) bei der Kultivierung ohne Antischaummittel. In diesen Abbildungen befinden sich die Formeln, die zur Berechnung der Offline-Daten der Kultivierung mit Antischaummittel verwendet wurden. Hierbei wurden jeweils die letzten Werte mit sichtbarer Übereinstimmung aus Abb. 6-8 benutzt.

Tabelle 6.4: Zuordnung der Online-Fluoreszenzintensitäten zu Offline-Daten

Bereich	Kultivierung ohne Antischaummittel			Kultivierung mit Antischaummittel			
	RFI	Offline-Daten		RFI	Offline-Daten		
		gem.			gem.	ber.	
"Streulicht"	4250	10,5	Biotrockenmasse in g/L	8000	28,0	26,6	Biotrockenmasse in g/L
"Alkaloide"	210	5,3	Proteingehalt in g/L	120	4,0	3,2	Proteingehalt in g/L
"Flavine"	38	69	Alkaloidgehalt in mg/L	19	160	16	Alkaloidgehalt in mg/L
"Alkaloide"	213	69	Alkaloidgehalt in mg/L	80	160	8	Alkaloidgehalt in mg/L

(gem. = gemessen, ber. = berechnet)

Die berechneten Werte von Biotrockenmasse und Proteingehalt aus den Intensitäten im Streulicht und im Alkaloidbereich liegen in der Größenordnung der gemessenen Offline-Daten. Die aus den Fluoreszenzintensitäten berechneten Alkaloidgehalte sind viel niedriger als die gemessenen Offline-Daten (Tabelle 6.4).

## 6.5 Fluoreszenzspektroskopie an Kulturüberständen

Zum Vergleich mit den Online-Fluoreszenzmessungen wurden offline die Kulturüberstände vermessen, in denen das Myzel durch Filtration (Bedingungen siehe Kap. 14) abgetrennt worden war. Hierbei sollten auch die Auswirkungen von Verdünnungen der Proben untersucht werden. Die 2D-Fluoreszenzspektren der Kulturüberstände am Ende der Kultivierung von *C. purpurea* (unter Verwendung von Desmophen als Antischaummittel) sind in Abb. 6-9 in zwei verschiedenen Verdünnungen gezeigt. Bei der Verdünnung eines Volumenäquivalentes des Kulturüberstandes mit dem gleichen Volumenanteil  $H_2O_{bidest}$  (1:2) ähnelt das in

der Mikroküvette aufgenommene (Abb. 6-9 a) dem unter Online-Bedingungen erhaltenen 2D-Fluoreszenzspektrum in Abb. 6-3 b. Bei einer weiteren Verdünnung um den Faktor 100 (1:200) wird neben den beiden bekannten Peaks noch ein weiterer im Bereich von Ex 280 / Em 340 sichtbar (Abb. 6-9 b), der im Vergleich mit Literaturwerten den Proteinen zugeordnet wird (Tabelle 6.5). Das Streulicht wird auch bei geringen Anregungswellenlängen sichtbar. Sowohl in der Anregung als auch in der Emission ist das Alkaloidpeakmaximum zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Die Flavinfluoreszenz nimmt im Verhältnis zur Alkaloidfluoreszenz ab. Die relativen Intensitäten lassen sich jedoch nicht direkt miteinander vergleichen, da der Spalt bei den Messungen der 1:200 verdünnten Proben weiter geöffnet wurde (Ex=5 nm, Em=10 nm) als bei den Messungen der 1:2 verdünnten Proben (Ex=2,5 nm, Em=5 nm).

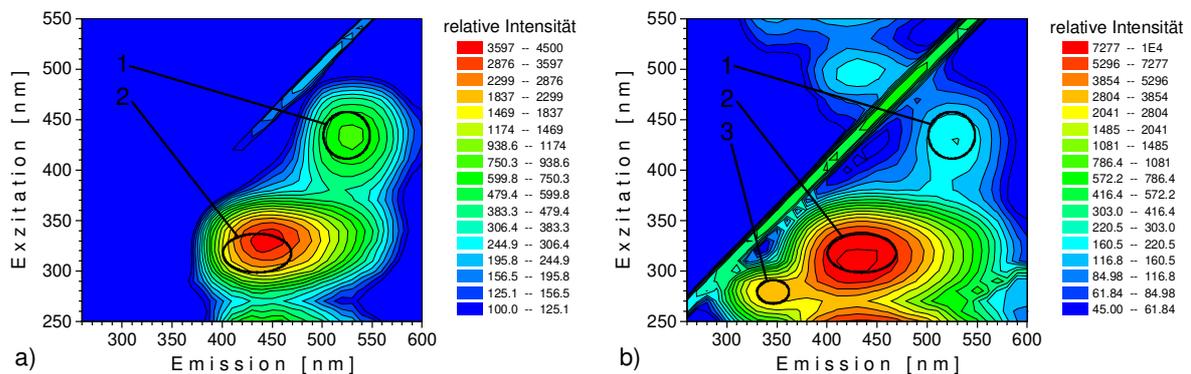


Abb. 6-9: 2D-Fluoreszenzspektren der Kulturüberstände am Ende der Kultivierung von *C. purpurea* mit Antischaummittel (Verdünnung a) 1:2 und b) 1:200)

Tabelle 6.5: Auswahl von Wellenlängenpaaren in den Fluoreszenzbereichen aus Abb. 6-9

Bereich	1	2	3
RFI-Peak Ex / Em [nm]	430/530	330/450 (310/430 bei b)	280/350
Art des Peaks	Zunahme		
zugeordnete biogene Fluorophore	Riboflavin, FMN, FAD	Ergotamin	Tryptophan im Protein
Literaturwerte Ex / Em [nm]	450/520	320/440	290/350
Literaturzitat	[WOLFBEIS, 1985]	(Kapitel 6.3)	[WOLFBEIS, 1985]
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich Ex / Em [nm]	410/510-540	300/410-460	270/340-350
	420/500-550	310/400-470	280/330-360
	430/500-550	320/400-470	290/340-360
	440/500-550	330/400-470	
	450/510-540	340/410-460	
Bereichsbezeichnung	"Flavine"	"Alkaloide"	"Protein"

Wie bereits in Abb. 6-8 a bei der Online-Fluoreszenzbestimmung fällt auch die Fluoreszenzintensität im Bereich der Alkaloide bei den Kulturüberständen mit einer Verdünnung von 1:2 nach etwa 170 h bis zum Kultivierungsende ab (Abb. 6-10). Dagegen steigt sie bei den Proben mit einer Verdünnung von 1:200 auch nach 170 h weiterhin an. Der Vergleich zu den

Offline-Daten Proteingehalt im Medium, Gesamtalkaloidgehalt und Biotrockenmasse zeigt jedoch nur im ersten Drittel der Kultivierung Übereinstimmungen (Abb. 6-10).

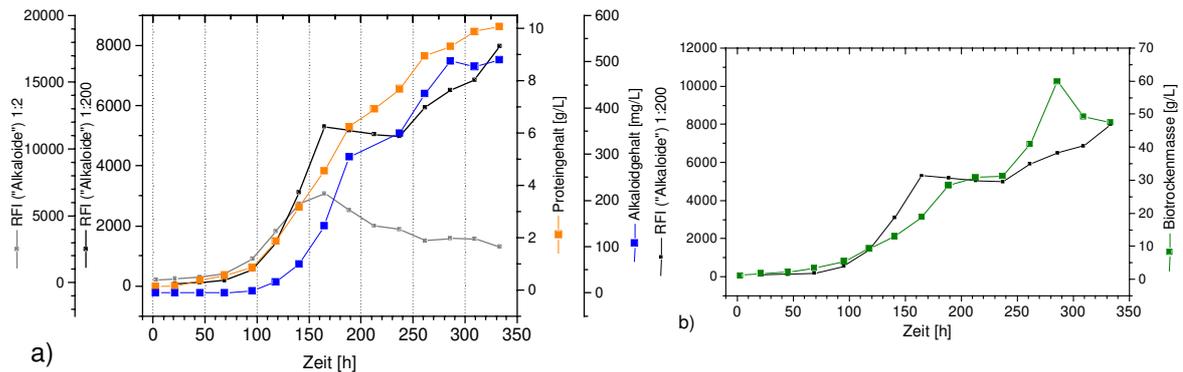


Abb. 6-10: Offline-RFI-Verläufe im Bereich der Alkaloide in unterschiedlichen Verdünnungen im Vergleich a) zum Proteingehalt im Medium und zum Gesamtalkaloidgehalt und b) zur Biotrockenmasse bei den Kulturüberständen einer *C. purpurea*-Kultivierung mit Antischaummittel

Über den gesamten Kultivierungsverlauf lassen sich die in den 1:200 verdünnten Kulturüberständen gemessenen RFI ("Flavine") mit einem Polynom 2. Grades dem Alkaloidbereich (Abb. 6-11) und im Bereich der Proteine linear dem Proteingehalt im Medium zuordnen (Abb. 6-12).

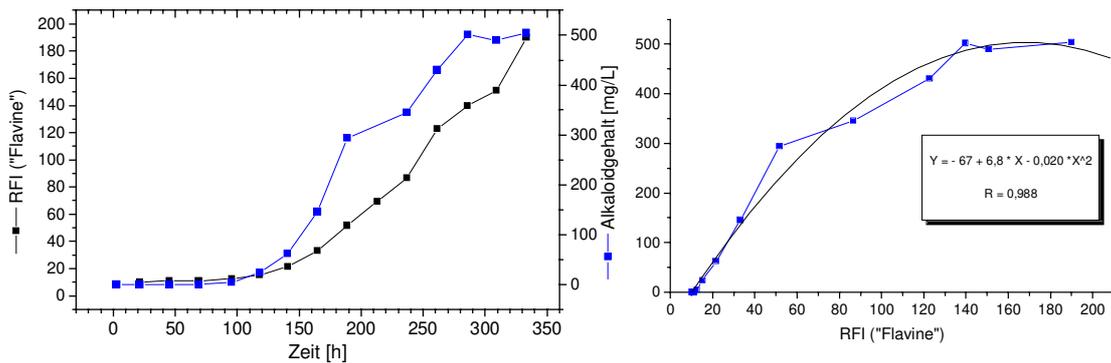


Abb. 6-11: Offline-RFI-Verlauf im Bereich der Flavine im Vergleich zum Gesamtalkaloidgehalt bei den 1:200 verdünnten Kulturüberständen einer *C. purpurea*-Kultivierung mit Antischaummittel

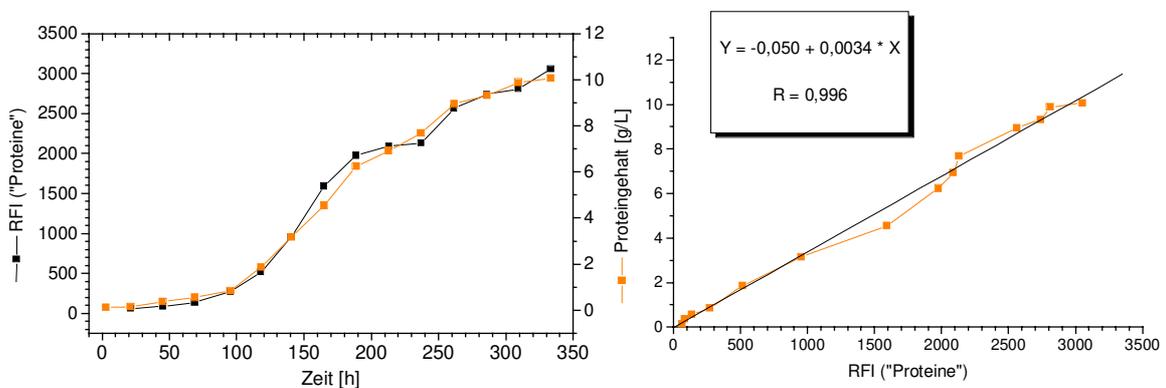


Abb. 6-12: Offline-RFI-Verlauf im Bereich der Proteine im Vergleich zum Proteingehalt bei den 1:200 verdünnten Kulturüberständen einer *C. purpurea*-Kultivierung mit Antischaummittel

## 6.6 Diskussion

Zur Alkaloidbildung und zum Zellwachstum benötigt *C. purpurea* Sauerstoff im Überschuß [KOBEL und SANGLIER, 1986]. Andererseits sind die Myzelien vor allem in der Adaptionsphase sehr empfindlich gegenüber Scherstreß und Begasung. Daher wurde die Rührerdrehzahl von anfangs 250 UpM allmählich auf 350 UpM (bzw. 425 UpM bei der Kultivierung mit Antischaummittel) und die Begasungsrate von 0,5 vvm auf 2,5 vvm (bzw. 3,5 vvm) gesteigert. Auf die Fluoreszenzmessungen hatten diese Veränderungen jedoch keinen erkennbaren Einfluß.

Die hohe Schaumentwicklung führte in der Kultivierung ohne Antischaummittel dazu, daß Zellmaterial aus dem Medium die Wände oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche und den Deckel des Reaktors bewuchs. Damit ist die Abnahme der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf nach 140 h zu erklären (Abb. 6-5). Dagegen steigt die Biotrockenmasse bei der Verwendung von Desmophen als Antischaummittel bis zum Ende der Kultivierung an. Die Schaumbildung kann beim Auftreten durch erneutes Hinzufügen von Desmophen eingeschränkt werden [MENGE, 1999]. Der Reaktordeckel und die Wände sind nur wenig von Myzel bewachsen. Im Vergleich zu der Kultivierung ohne Antischaummittel verfünffacht sich in etwa die Biomasse und der Alkaloidgehalt am Ende der Kultivierung.

In mehreren Kultivierungen des filamentösen Pilzes *Crinipellis stipitaria* konnte das Myzel-trockengewicht trotz einer während des Wachstumsprozesses veränderlichen Pelletmorphologie über Streulichtmessungen quantitativ erfaßt werden [DOCHNAHL, 1997]. Die Streulichtintensität war dabei in einem Bereich von 300 nm bis 700 nm unabhängig von der Wellenlänge des Lichts. Der untersuchte Streulichtbereich liegt mit 480 nm bis 550 nm (Tabelle 6.3) in einem Bereich, in dem Lichtabsorption gering sein sollte. Unterhalb von 400 nm sind deutliche Quench-Effekte im Streulicht sichtbar und bei 330 nm und 440 nm ist eine Absorption aufgrund der Fluoreszenzpeaks zu erwarten (Abb. 6-3). Bei der Kultivierung ohne Antischaummittel fällt die Streulichtintensität parallel zur Biotrockenmasse ab (Abb. 6-5), während sie bei der Kultivierung mit Antischaummittel im Gegensatz zur ansteigenden Biotrockenmasse ab 190 h abfällt (Abb. 6-8 b). Ab diesem Zeitraum fallen auch die gezeigten Fluoreszenzintensitäten ab (Abb. 6-8 a). Sowohl Zellwachstum als auch Alkaloidproduktion sind im Vergleich zur vorherigen Kultivierung um den Faktor fünf angestiegen. Die Folgen davon auf Eindringtiefe des Anregungslichtes und durch Wechselwirkungen bedingte Störungen könnten die Ursache für diese Intensitätsabnahme am Ende der Kultivierung sein. Die Zugaben von Antischaummittel (Desmophen) im Verlauf der Kultivierung haben sich nicht merklich auf die 2D-Fluoreszenzmessungen ausgewirkt.

Der Fluoreszenzbereich der Flavine läßt sich am Anfang der Kultivierung gut mit dem Gesamtalkaloidgehalt vergleichen (Abb. 6-6, Abb. 6-8 a). Während die RFI bei der Kultivierung ohne Antischaummittel bis zum Kultivierungsende ansteigt, fällt sie bei der Kultivierung mit Antischaummittel in der zweiten Kultivierungshälfte ab. Die Gründe hierfür sind oben bereits diskutiert worden. Außerdem ist der Alkaloidgehalt so hoch angestiegen, daß auch der Korrelationsbereich überschritten sein könnte. Eine erhöhte Konzentration an Quenchern und Fluorophoren führt dazu, daß sich innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer vermehrt Stoßkomplexe bilden, die zur Desaktivierung führen. In einem 1,5-L-Bioreaktor mit einem

anderen Medium wurde eine lineare Korrelation der Alkaloidfluoreszenz zum Ergotamingehalt lediglich bis zu 90 mg/L festgestellt [MAROSE, 1995]. In der Kultivierung mit Antischaummittel wurden 500 mg/L erreicht. Stark unterschiedliche Bedingungen im Verlauf der Kultivierungen und der Einfluß der vitalen Zellen erschweren eine externe Kalibration. Zusätzlich könnte auch die veränderte Morphologie der Zellen einen Einfluß haben. Mit einsetzender Alkaloidproduktion werden die Zellen immer kleiner, die Zellwanddicke nimmt zu, der Chitingehalt steigt, und es werden vermehrt Fette in die Zelle eingelagert [KOBEL und SANGLIER, 1986]. Äußerlich sichtbar ist die Produktion eines gelben Farbstoffes, der sicherlich die optischen Eigenschaften beeinflusst. Ein Bewuchs der Quarzglasscheibe vor dem Sensorkopf ist unwahrscheinlich, da auch das Sichtfenster unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche nicht bewachsen wurde.

Die Fluoreszenz im Alkaloidbereich weist ein mit den reinen Alkaloiden (Abb. 6-2) vergleichbares Peakmaximum (Abb. 6-3) auf. Ein linearer Zusammenhang der Fluoreszenzintensität im Alkaloidbereich zum Gesamtalkaloidgehalt wäre daher zu erwarten gewesen. Statt dessen beschreibt ein Polynom 2. Grades den Zusammenhang in der ersten Kultivierungshälfte (Abb. 6-7). Die Alkaloide werden im Sekundärmetabolismus gebildet, und daher erfolgt der Anstieg des Gesamtalkaloidgehalts später als der Beginn des Zellwachstums. Die Fluoreszenzintensität im Alkaloidbereich steigt zwar später als die Biotrockenmasse, allerdings auch deutlich früher als der Gesamtalkaloidgehalt im Medium an (Abb. 6-7, Abb. 6-5 und Abb. 6-8). Sie läßt sich in den ersten Kultivierungsstunden linear mit dem Proteingehalt im Medium korrelieren (Abb. 6-4). Durch die Fluoreszenzmessungen werden die Ergotalkaloide sowohl im Medium als auch in den Myzelien erfaßt. Dies könnte die Ursache für den frühen Anstieg der Fluoreszenzintensität sein. Zur genaueren Abklärung müßte nach Extraktion des Myzels der Alkaloidgehalt im Medium und in den Zellen bestimmt werden. Während der Gesamtalkaloidgehalt bis zum Kultivierungsende ansteigt, fällt die RFI ("Alkaloide") in der zweiten Kultivierungshälfte ab (Abb. 6-7, Abb. 6-8 a). Dieser Abfall ist bei der Kultivierung mit Antischaummittel besonders ausgeprägt. Die möglichen Gründe für dieses auch im Flavinderbereich beobachtete Phänomen sind oben bereits diskutiert worden.

Eine Übertragung der Zusammenhänge von Fluoreszenzintensitäten und Offline-Daten von der Kultivierung ohne Antischaummittel und der Kultivierung mit Antischaummittel ist lediglich für Biotrockenmasse und Proteingehalt mit einem Fehler von etwa 5 % für die Biotrockenmasse bzw. 20 % für den Proteingehalt möglich (Tabelle 6.4). Der Alkaloidgehalt läßt sich nicht durch die in der einen Kultivierung erhaltenen Modelle zur Berechnung aus den Fluoreszenzdaten im Flavin- bzw. Alkaloidbereich für die andere Kultivierung bestimmen (Tabelle 6.4).

*C. purpurea* 1029 N 5 schleust 60 - 80 % der Ergotalkaloide aktiv aus dem Myzel aus. Das in der Mikroküvette aufgenommene 2D-Fluoreszenzspektrum des Kulturüberstandes vom Ende der Kultivierung (Abb. 6-9) gleicht daher dem mit Lichtleiter online gemessenen (Abb. 6-3), wenn auch bedingt durch die Open-end-Meßanordnung das Streulicht verstärkt wird. Eine Verdünnung der Kulturüberstände um den Faktor 200 hebt Quencheffekte weitestgehend auf, so daß der Streulichtbereich bei niedrigeren Wellenlängen und auch der Proteinbereich sichtbar werden (Abb. 6-9). Bedingt durch die Verdünnung steigen die Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Flavine und Alkaloide bis zum Kultivierungsende an (Abb. 6-10, Abb.

6-11), im Unterschied zu den Online-Messungen (Abb. 6-8) und den Küvettenmessungen der Kulturüberstände verdünnt um den Faktor zwei (Abb. 6-10). Mit Hilfe eines Polynoms 2. Grades läßt sich aus der Fluoreszenzintensität im Flavinbereich der Gesamtalkaloidgehalt über den gesamten Kultivierungsverlauf berechnen (Abb. 6-11). Mit den Online-Fluoreszenzverläufen im Flavinbereich war dies weder in der ersten betrachteten Kultivierung (Abb. 6-6), noch in der Kultivierung mit Antischaummittel (Abb. 6-8) möglich. Die Erklärung dafür, warum die Online-Fluoreszenzintensitäten nicht über den gesamten Kultivierungsverlauf mit den Offline-Daten korreliert werden können, liefert Abb. 6-10. Durch eine weitere Verdünnung um den Faktor 100 fiel die Fluoreszenzintensität im Bereich der Alkaloide nicht in der zweiten Kultivierungshälfte ab, sondern stieg weiter an. Dies läßt auf ein Überschreiten des Fluoreszenzsättigungsbereiches schließen. Selbst bei den 1:200 verdünnten Proben flacht die Kurve von Alkaloidgehalt gegen Flavinfluoreszenz nach anfänglichem linearem Anstieg ab und läßt sich nur mit einem Polynom 2. Grades beschreiben (Abb. 6-11), was wahrscheinlich auch auf ein Überschreiten des Fluoreszenzsättigungsbereiches zurückzuführen ist.

Linear ist dagegen die Korrelation der Fluoreszenzintensitäten im Proteinbereich bei den 1:200 verdünnten Kulturüberständen zum Proteingehalt im Medium über den gesamten Kultivierungsverlauf (Abb. 6-12). Dies ist besonders deshalb von Interesse, da der Proteingehalt häufig parallel zum Gesamtalkaloidgehalt verläuft (Abb. 6-10), was auch in einer Kultivierung von *C. purpurea* mit Zusatzsauerstoffversorgung über  $H_2O_2$  und Braunstein beobachtet wurde [BOEHL, 1998].

Im Vergleich zu den Fluoreszenzmessungen bei einer anderen Kultivierung mit diesem Stamm in einem kleineren Reaktor (1,5 L), etwas verändertem Medium und Autoklavierbedingungen [MAROSE, 1995 und HILMER, 1996] fällt in den hier beschriebenen Kultivierungen das starke Quenchverhalten bei geringen Wellenlängen auf. So wurde bei MAROSE und HILMER der Proteinbereich auch online beobachtet. Außerdem war im 2D-Fluoreszenzspektrum ein hier nicht beschriebener Peak bei Ex 510 / Em 570 sichtbar. Die Kulturfluoreszenz im Flavinbereich konnte über den gesamten Kultivierungsverlauf online sehr gut mit der Biotrockenmasse korreliert werden. Es wurden jedoch nur sehr niedrige Ergotalkaloidkonzentrationen von 60 mg/L erreicht. Ungünstig auf die optischen Eigenschaften wirkte sich bei den hier beschriebenen Kultivierungen eine verlängerte Autoklavierzeit von 30 min statt 20 min aus, die zur Folge hatte, daß das Medium deutlich gelber wurde. Ideal für die Durchführung von Fluoreszenzmessungen wäre es, wenn auf das Autoklavieren ganz verzichtet würde und das farblose Medium zur Sterilisation lediglich filtriert würde.

## 7 Mikrobieller Phenanthren-Abbau durch *Sphingomonas yanoikuyae* unter Tensidzusatz

### 7.1 Theorie

Polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) entstehen bei nahezu allen Verbrennungsprozessen. Größere PAK-Mengen sind früher bei Kohleverschwelungsprozessen in Kokereien und Gaswerken angefallen. Sie belasten heute in zum Teil hohen Konzentrationen die Böden dieser Altstandorte [Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, 1997]. Dort verbleiben sie unter Umständen sehr lange, da sie hydrophob und schwer abbaubar sind. Viele dieser annelierten Systeme wirken carcinogen, andere können die Wirkung cancerogener Stoffe verstärken. Sie sollten daher aus der Umwelt entfernt werden [Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 1991].

Zum mikrobiellen Schadstoffabbau muß die Kontamination dem Mikroorganismus zugänglich sein, bevor eine Verstoffwechslung möglich ist. Diese Bioverfügbarkeit der Schadstoffe kann durch gezielte Zugabe von Tensiden erhöht werden. Unterschiedliche biologisch und auch chemisch produzierte Tenside sind bereits zur Verbesserung des mikrobiellen Schadstoffabbaus getestet worden. So erhöhte beispielsweise der Zusatz von nichtionischen Tensiden den biologischen Abbau von PAKs in Flüssigkultur und auch in Böden [GUERIN und JONES, 1988; ARONSTEIN *et al.*, 1991; LANTZ *et al.*, 1995; THIEM, 1994]. Andererseits kann die Gegenwart von Tensiden den mikrobiellen Abbau auch verlangsamen oder sogar gänzlich unterbinden [ARONSTEIN *et al.*, 1991; EFROYMSON und ALEXANDER, 1991; LAHA und LUTHY, 1991, 1992; THIEM, 1994; VOLKERING *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1995]. Oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (*critical micelle concentration*, cmc) bilden Tenside Aggregate von 20 bis 200 Tensidmolekülen, die Mizellen genannt werden [ROSEN, 1989]. Tenside erhöhen meist nur oberhalb der cmc die Mobilität und Löslichkeit von PAK [VIGON und RUBIN, 1989; LIU *et al.*, 1991; EDWARDS *et al.*, 1991]. Der genaue Mechanismus der Erhöhung der Bioverfügbarkeit durch den Einsatz von Tensiden ist jedoch in vielen Fällen noch unklar und soll im folgenden näher untersucht werden.

Hierfür bietet sich der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie an, da PAKs fluoreszieren. Anfangs soll der Einfluß der Zugabe von Tensiden auf die PAK-Fluoreszenz untersucht werden. Aufbauend auf diese Ergebnisse soll die 2D-Fluoreszenzspektroskopie in Kultivierungen zum mikrobiellen Schadstoffabbau, zunächst in Flüssigkultur, aber auch schon in ersten Versuchen mit Boden herangezogen werden.

### 7.2 Kultivierungsbedingungen

Das ubiquitäre, gram-negative Bodenbakterium *Sphingomonas yanoikuyae* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ), Nr. 6900 [DSMZ, 1993]) ist für die Verstoffwechslung einer Vielzahl von aromatischen Verbindungen bekannt. Die Kultivierungen mit diesem Bakterium zum Schadstoffabbau wurden von SCHIPPERS teilweise in Zusammenarbeit mit MÜLLER und GEBNER am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover durchgeführt [SCHIPPERS, 1999; MÜLLER, 1996; GEBNER, 1997].

Als Schadstoff wurde Phenanthren verwendet, ein trizyklischer, angular annellierter Kohlenwasserstoff, der nur mindergiftig und mikrobiell vergleichsweise leicht abbaubar ist. Er besitzt alle Eigenschaften seiner Substanzklasse und weist daher einen geeigneten Modellcharakter für grundlegende Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von PAK auf. Phenanthren gehört zu den 16 von der amerikanischen Umweltschutzbehörde (*Environmental Protection Agency*, EPA) exemplarisch ausgewählten PAK, die zur Beurteilung für kontaminierte Flächen untersucht werden [EPA, 1979]. Phenanthren wurde in den Kultivierungen in einer Anfangskonzentration von 100 mg/L (aus 300 mg/L Phenanthren-Stammlösung in Dichlormethan) eingesetzt.

Als Tensid wurde Sophoroselipid verwendet, ein nichtionisches Biotensid vom Glycolipidtyp. Es wurde mit der Hefe *Candida bombicola* produziert und ist in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch für *S. yanoikuyae* [SCHIPPERS, 1999]. Das verwendete Sophorose-Gemisch enthält unterschiedlich acetylierte Sophorose, verschieden lange Fettsäureketten und sowohl die Säure- als auch die Lactonform. Die kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) des Sophoroselipidgemisches im eingesetzten MM-Brunn-Medium bei 28°C liegt bei 4,0 mg/L. Für die Kultivierungen wurden Sophoroselipidgehalte von 2 mg/L, 25 mg/L, 100 mg/L und 500 mg/L eingesetzt.

Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 7.1 aufgelistet. Dem MM-Brunn-Medium wurde erst Phenanthren, dann ein paar Stunden später das Tensid zugefügt. Nach einigen Stunden Inkubation wurde angeimpft.

Tabelle 7.1: Kultivierungsbedingungen

◆ <b>Betriebsweise</b>	Batch
◆ <b>Organismus</b>	<i>S. yanoikuyae</i>
◆ <b>Kultivierungsanlage</b>	Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen)
◆ <b>Arbeitsvolumen</b>	2 L
◆ <b>Meßdatenerfassung</b>	RISP
◆ <b>Medium</b>	MM-Brunn (Kap. 14)
◆ <b>Temperatur</b>	28°C
◆ <b>Begasungsrate</b>	2 vvm (4 L/min)
◆ <b>Rührerdrehzahl</b>	500 UpM

In der Durchflußmeßzelle im Bypass wurden die 2D-Fluoreszenzmessungen mit dem F-4500 durchgeführt, dessen Einstellung in Tabelle 2. angegeben sind.

Tabelle 7.2: Fluoreszenzspektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	260-450 nm
• Emissionswellenlängenbereich	280-600 nm
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	30000 nm/s
• Aufnahme-Intervall	5 min

### 7.3 Phenanthrenfluoreszenz im festen und im gelösten Zustand

Die Löslichkeit von Phenanthren in Wasser ist vergleichsweise gering (7,2  $\mu\text{mol/L}$  [PEARLMAN *et al.*, 1984]). Um eine gesättigte Phenanthrenlösung herzustellen, wurde der kristalline Feststoffanteil einer 100 mg/L Phenanthrensuspension in Kaliumphosphat-Puffer (KPP-Puffer, pH=7,2, 10,71 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 5,24 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), dessen pH-Wert mit dem ebenso fluoreszenzfreien Medium vergleichbar ist, abfiltriert. Abb. 7-1 a zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum dieser gesättigten Phenanthrenlösung, gemessen über den Lichtleiter im 10 mL-Minireaktor, von dem das 2D-Fluoreszenzspektrum des reinen KPP-Puffers abgezogen wurde. Obwohl dieser nicht fluoresziert, tritt vor allem im nahen UV-Bereich Eigenfluoreszenz des Lichtwellenleiters auf, die durch die Subtraktion eliminiert wird. Zudem wird deutlich, daß durch Zugabe von gelöstem Phenanthren die Streulichtintensität abnimmt. Die Spektren von gelöstem Phenanthren zeigen ein Fluoreszenzmaximum bei Ex 260-280 / Em 360 nm, wenn der Lichtleiter verwendet wird. Bei Messungen der gleichen Lösung in der Makroküvette (Abb. 7-1 d) liegt das Fluoreszenzmaximum bei Ex 250 / Em 360 nm.

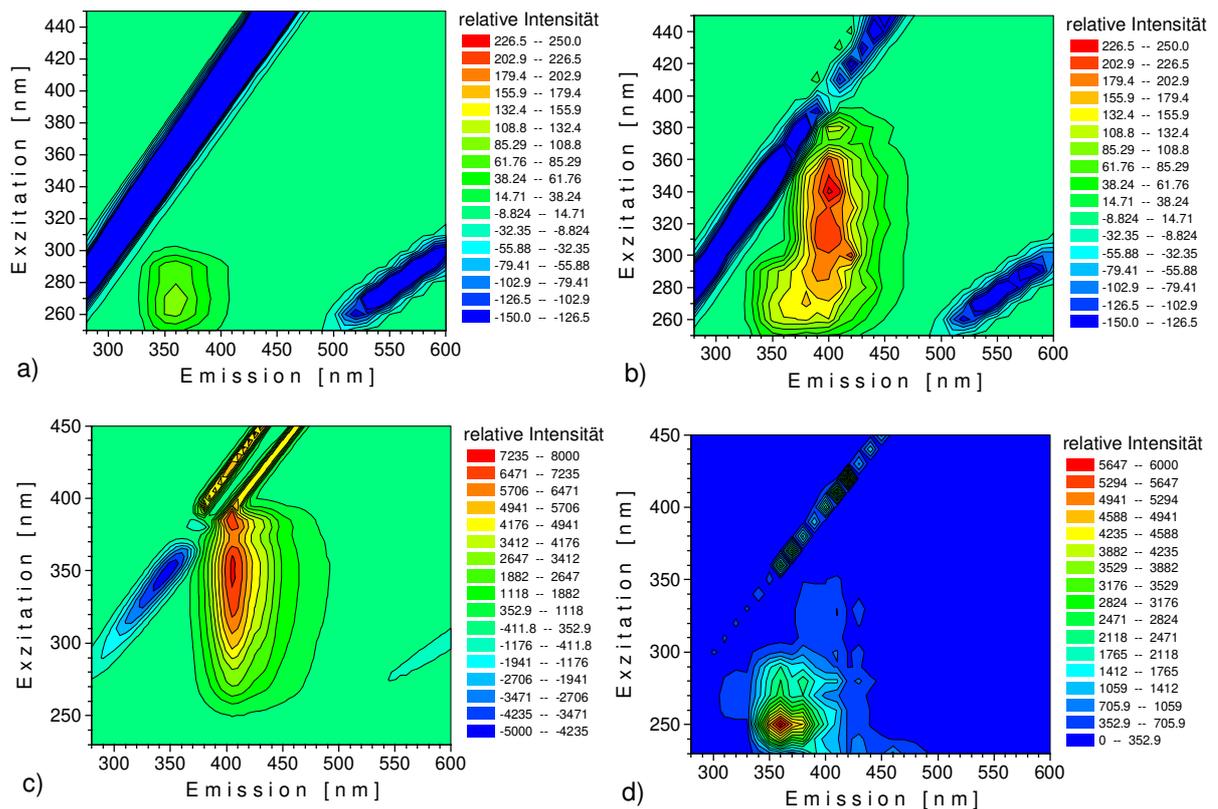


Abb. 7-1: 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren a) von gelöstem Phenanthren (ca. 1 mg/L), b) von etwa 100 mg/L Phenanthren (ca. 99% Feststoffanteil) jeweils minus dem Lösungsmittelspektrum von KPP-Puffer aufgenommen im 10 mL-Minireaktor und c) von festem Phenanthren minus dem Spektrum des Hintergrunds, aufgenommen mit dem Feststoffadapter und d) 2D-Fluoreszenzspektrum von gelöstem Phenanthren aufgenommen in der Makroküvette

Das Fluoreszenzmaximum von kristallinem Phenanthren liegt bei Ex 350 / Em 405 nm. Es erstreckt sich über den Bereich Ex 280-380 / Em 405 nm (Abb. 7-1 c). Das Feststoffspektrum wurde mit dem Feststoffadapter aufgenommen. Die Subtraktion des 2D-Fluoreszenzspektrums des schwarzen Hintergrunds zeigt, daß das Streulicht unterhalb von 370 nm abnimmt, während es oberhalb von 390 nm zunimmt. Der grüne Streifen im Streulicht kennzeichnet ein Überschreiten des Meßbereiches. Abb. 7-1 b zeigt das 2D-Fluoreszenzdifferenzspektrum von 100 mg/L Phenanthren in dem KPP-Puffer. Die Feststofffluoreszenz überwiegt.

## **7.4 Einfluß von Sophoroselipid auf die Fluoreszenz von Phenanthren**

Vor der Durchführung der Kultivierungen mit Tensidzusatz sollen Vorversuche den Einfluß von Sophoroselipid auf die Phenanthrenfluoreszenz zeigen.

### **7.4.1 Qualitativer Einfluß von Sophoroselipid auf die Fluoreszenz von Phenanthren**

Das reine MM-Brunn-Medium (Kap. 14) fluoresziert nicht (Abb. 7-2 a). Auch reines Sophoroselipid weist keine Fluoreszenz auf (Abb. 7-2 b).

Abb. 7-2 c zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum von 100 mg/L Phenanthren in MM-Brunn-Medium. Die Fluoreszenzmaxima liegen bei Ex 310,330,350 / Em 400 nm, wobei bei Em 400 nm ein breites Fluoreszenzband zu sehen ist.

Durch Zugabe des fluoreszenzfreien Sophoroselipids wird ein weiteres Fluoreszenzmaximum bei Ex 290 / Em 360 nm sichtbar, das mit der Menge zugefügten Sophoroselipids anwächst. Gleichzeitig nimmt die Phenanthrenfluoreszenz bei Ex 310,330,350 / Em 400 nm ab, bis sie bei hohem Sophoroselipidgehalt nicht mehr als Maximum sichtbar ist (Abb. 7-2 d-f).

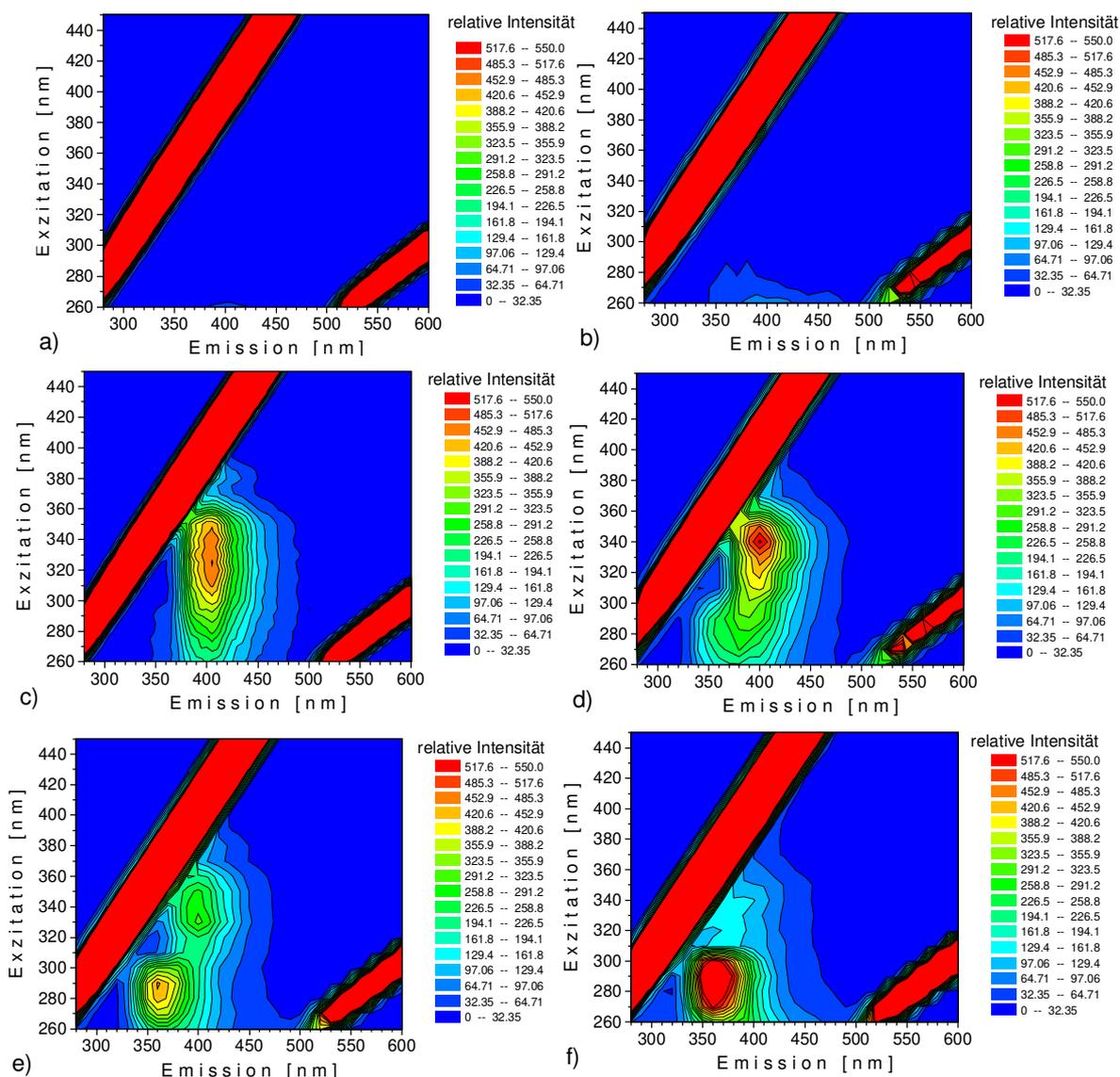


Abb. 7-2: 2D-Fluoreszenzspektren a) von reinem MM-Brunn-Medium, b) MM-Brunn-Medium mit 25 mg/L Sophoroselipid, c) MM-Brunn-Medium mit 100 mg/L Phenanthren, d) MM-Brunn-Medium mit 100 mg/L Phenanthren und 25 mg/L, e) 100 mg/L und f) 500 mg/L Sophoroselipid

#### 7.4.2 Zugabe von Phenanthren zu einer Sophoroselipidlösung

Nach Zugabe von Phenanthren (Phenanthren-Endkonzentration von 100 mg/L) zu einer 25 mg/L Sophoroselipidlösung in MM-Brunn-Medium unter Kultivierungsbedingungen (Tabelle 7.1) gleicht das 2D-Fluoreszenzspektrum nach 2 min (Abb. 7-3 a) dem Spektrum von Phenanthren in MM-Brunn-Medium ohne Sophoroselipidzusatz (Abb. 7-2 c) mit einer Fluoreszenz bei 400 nm. Nach 2 h ist das Fluoreszenzmaximum bei Ex 290 / Em 360 nm als Schulter deutlich zu erkennen (Abb. 7-3 b). Dieses Spektrum ist vergleichbar mit dem in Abb. 7-2 d) gezeigten Spektrum von 25 mg/L Sophoroselipid und 100 mg/L Phenanthren in MM-Brunn-Medium. In den nächsten 4 h erfolgen keine wesentlichen Veränderungen. Das 2D-Fluoreszenzspektrum nach 6 h ähnelt dem in Abb. 7-3 b) dargestellten (Spektrum nicht gezeigt). Die Abb. 7-3 zeigt jeweils Einzelspektren, so daß das ausgeprägte Maximum bei

Ex 330 / Em 400 nm in Abb. 7-3 a nicht repräsentativ sein muß. Es könnte von einem in diesem Moment im Meßbereich befindlichen Phenanthrenkristall verursacht sein.

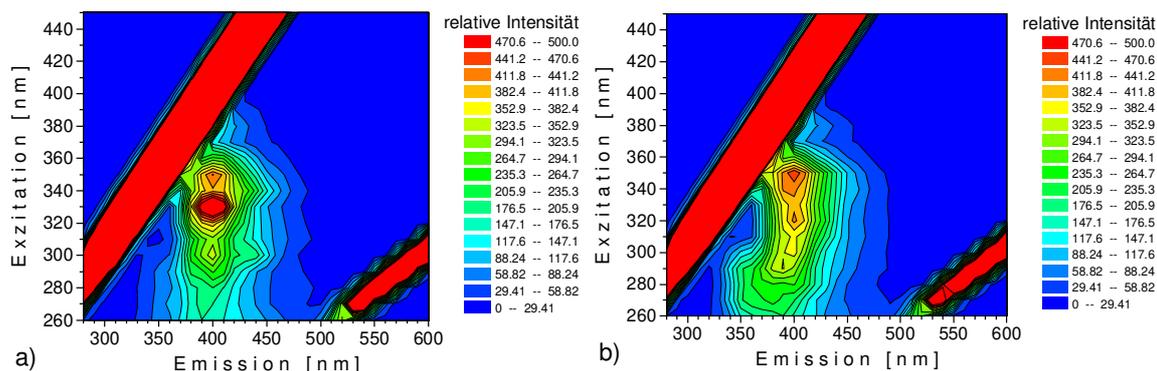


Abb. 7-3: 2D-Fluoreszenzspektrum einer 25 mg/L Sophoroselösung in MM-Brunn-Medium nach Zugabe von 100 mg/L (Endkonzentration) Phenanthren a) nach 2 min, b) nach 2 h

### 7.4.3 Zugabe von Sophoroselipid zu einer Phenanthrensuspension

Unter den in Tabelle 7.1 genannten Kultivierungsbedingungen wurden 20 mL Sophoroselipid zu 2 L MM-Brunn-Medium, in dem 100 mg/L Phenanthren enthalten waren, zugefügt. Abb. 7-4 zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum sofort nach der Sophoroselipidzugabe. Im Gegensatz zur Zugabe von Phenanthren zu einer Sophoroselipidlösung (Abb. 7-3 a) ist der Fluoreszenzbereich um Ex 290 / Em 360 nm, in dem das Phenanthren bei Zugabe von Sophoroselipid gelöst fluoresziert (Abb. 7-2 f), sofort zu erkennen. Das gesamte Spektrum sieht noch etwas ungleichmäßig aus. Gleiches gilt für das 2D-Fluoreszenzspektrum 2 min nach der Zugabe von 120 mL Sophoroselipid ebenfalls unter Kultivierungsbedingungen zu 2 L MM-Brunn-Medium, in dem sich 100 mg/L Phenanthren und 30 mL Sophoroselipid befinden (Abb. 7-5 a). Nach 3,5 h hat sich im Fluoreszenzspektrum wenig verändert, der Fluoreszenzbereich des kristallinen Phenanthrens ist wiederum nicht so intensiv, wie der des gelösten (Abb. 7-5 b). 2 h später ist der mit „1“ bezeichnete Fluoreszenzbereich des kristallinen Phenanthrens enorm angestiegen und deutlich intensiver als der ebenfalls zugenommene Fluoreszenzbereich 2 des gelösten Phenanthrens (Abb. 7-5 c). Nach 6,5 h kann die RFI in dem mit „1“ bezeichneten Fluoreszenzbereich gegenüber dem Bereich 2 vernachlässigt werden (Abb. 7-5 d).

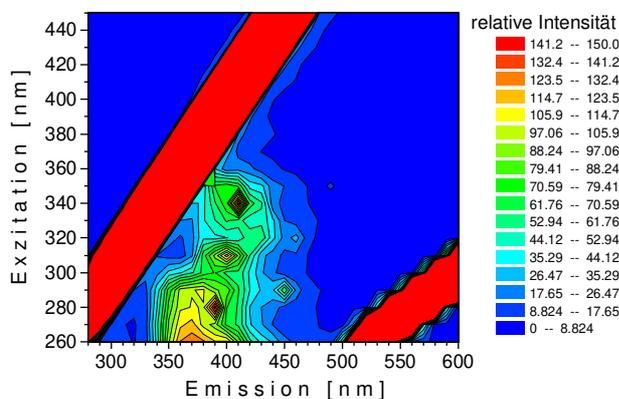


Abb. 7-4: 2D-Fluoreszenzspektrum von 100 mg/L Phenanthren in MM-Brunn-Medium sofort nach Zugabe von 20 mL Sophoroselipid

In Tabelle 4.3 sind die Wellenlängen aufgelistet, die in den einzelnen Fluoreszenzbereichen aus Abb. 7-5 verwendet wurden, um die Fluoreszenzverläufe nach der Zugabe von 120 mL Sophoroselipid zu 100 mg/L Phenanthren und 30 mL Sophoroselipid in 2 L MM-Brunn-Medium darzustellen (Abb. 7-6). Gezeigt werden die Veränderungen ab 3,5 h, bis nach 6,4 h das Gleichgewicht erreicht ist. Bis 4,5 h steigt die Fluoreszenzintensität im Bereich des mizellar gelösten Phenanthrens steil um etwa den Faktor 7 an. Die Intensität im Fluoreszenzbereich des wässrig gelösten Phenanthrens steigt erst ab 3,9 h bis 5,5 h auf den etwa 10fachen Wert an. Nach 5,5 h fallen die Kurven in den Bereichen "Phenanthren 1", "Phenanthren 2" und "Streulicht 390 nm", die bis zu diesem Zeitpunkt ansteigt, deutlich ab. Die Bereiche "Phenanthren 2" und "Streulicht 390 nm" durchlaufen nach 6,1 h ein Minimum, während die Fluoreszenzintensität des wässrig gelösten Phenanthrens bereits nach 5,6 h ihre Gleichgewichtslage nur etwas unterhalb der Ausgangswerte erreicht. Die Intensitäten im "Streulicht 340 nm" verlaufen spiegelbildlich zum "Streulicht 390 nm" (Abb. 7-6 b). Auch in den Streulichtbereichen erstrecken sich die Veränderungen über einen Zeitraum von etwa 2,5 h (3,9 h bis 6,4 h). Nach 6,5 h treten bis zur Beendigung des Versuches nach 13 h keine weiteren Veränderungen auf. Der Gleichgewichtszustand ist erreicht. Äußerlich sichtbar zeigt sich dieser dadurch, daß sich die Phenanthrenkristalle aufgelöst haben. Aus der klaren Suspension ist eine trübe, mizellare Lösung entstanden.

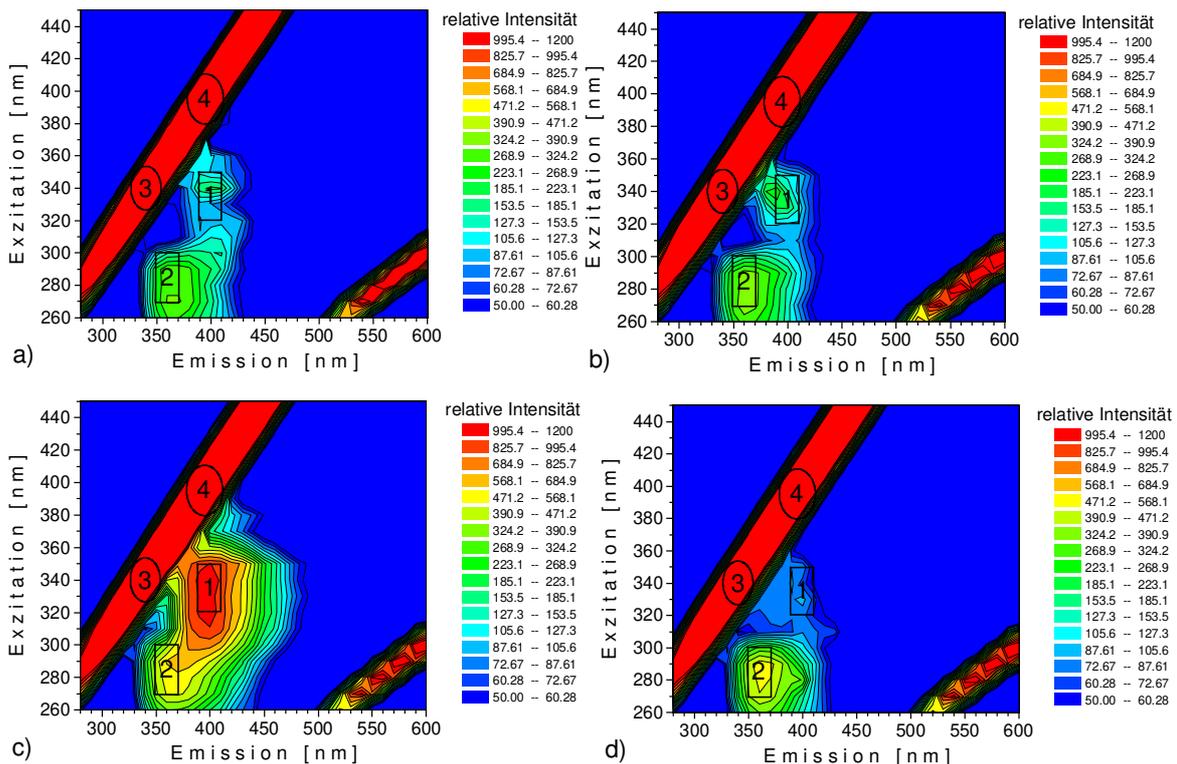


Abb. 7-5: 2D-Fluoreszenzspektren a) 2 min nach der Zugabe von 120 mL Sophoroselipid zu 100 mg/L Phenanthren und 30 mL Sophoroselipid in 2 L MM-Brunn-Medium b) nach 3,5 h, c) nach 5,5 h und d) nach 6,5 h

Tabelle 7.3: Fluoreszenzbereiche aus Abb. 7-5

Fluoreszenzbereich	1	2	3	4
RFI-Maximum [nm]	340/400	290/360	340/340	390/390
ausgewählte Wellenlängenpaare im Fluoreszenzbereich [nm]	320/390-410	270/350-370	330/320-340	380/370-390
	330/390-410	280/350-370	340/330-350	390/380-400
	340/390-410	290/350-370	350/340-360	400/390,410
	350/390-410	300/350-370		410/400,420
Bereichsbezeichnung	"Phenanthren 1"	"Phenanthren 2"	"Streulicht 340 nm"	"Streulicht 390 nm"

(Bei Ex 400 / Em 400 nm und Ex 410 / Em 410 nm wird der Meßbereich überschritten, daher wurden diese Wellenlängen nicht für Bereich 4 ausgewählt.)

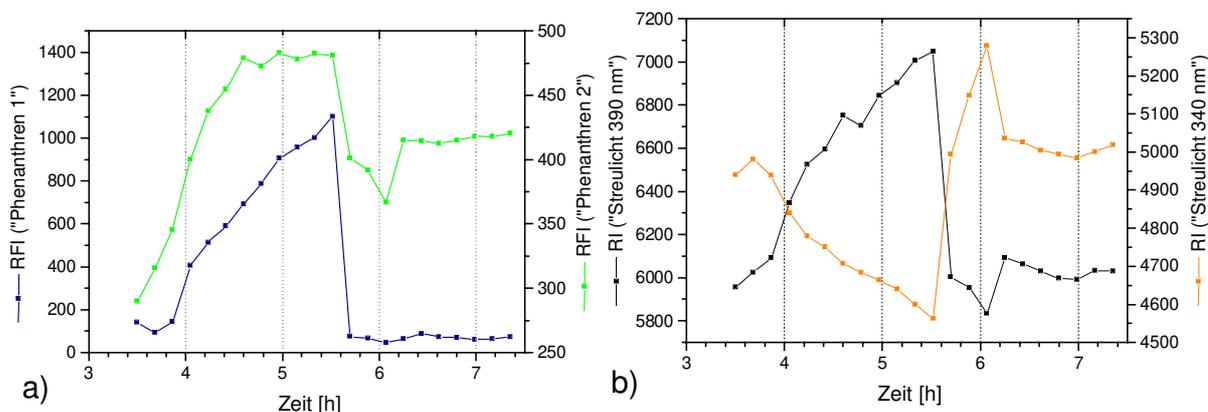


Abb. 7-6: Fluoreszenzverläufe in den Bereichen "Phenanthren wäßrig", "Phenanthren Tensid", "Streulicht 390 nm" und "Streulicht 340 nm" nach der Zugabe von 120 mL Sophoroselipid zu 100 mg/L Phenanthren und 30 mL Sophoroselipid in 2 L MM-Brunn-Medium

## 7.5 Kultivierungen mit unterschiedlichen Sophoroselipidgehalten

### 7.5.1 Korrelation der 2D-Fluoreszenzdaten mit Phenanthren und Biomasse

Aufgrund seines aromatischen Charakters ist Phenanthren sehr gut fluorimetrisch zu erfassen, wie in den Voruntersuchungen gezeigt werden konnte (Abb. 7-1 bis Abb. 7-5). Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie sollte dessen Abbau daher gut verfolgt werden können. In Zusammenarbeit mit GREENBERG vom Technion in Haifa, Israel (Arbeitskreis SHEINTUCH) wurde mit der Software MATLAB (The Mathworks Inc., USA) mit multilinearer Regression ein Korrelationsdiagramm (Abb. 7-7) erstellt. In der Darstellung sind die Bereiche hoher positiver Korrelation der Fluoreszenzintensitäten in den 2D-Spektren zu den offline bestimmten Phenanthrenggehalten dunkelrot gefärbt (Bereich 4 bis 6), dagegen die Bereiche hoher negativer Korrelation (Bereich 1 bis 3), in denen die Fluoreszenzintensitäten gegenläufig zum Phenanthrenghalt verlaufen, dunkelblau. Auffällig ist, daß in dem Fluoreszenzbereich kristallinen Phenanthrens um Ex 340 / Em 400 nm keine Korrelation zu den offline bestimmten

Phenanthrengelalten gefunden wurde (Abb. 7-7). Die ausgewählten Wellenlängenpaare in den weiß beschrifteten Korrelationsbereichen werden in Tabelle 7.4 aufgelistet.

Den Vergleich des Verlaufes der Fluoreszenzintensitäten in den Bereichen hoher positiver Korrelation mit dem Phenanthrengelalt zeigt Abb. 7-8 a. Lediglich am Anfang und am Ende der Kultivierung sind gute Übereinstimmungen festzustellen. Zwischen der 4. und der 19. Kultivierungsstunde zeigen besonders die Bereiche "Emission 380 nm" und "Emission 360 nm" (Bereich 4 und 5 aus Abb. 7-7) starke Abweichungen vom Phenanthrengelalt. Die Intensitäten im Bereich "Streulicht 400 nm" (Bereich 6 aus Abb. 7-7) verlaufen bereits nach 10 h wieder in guter Übereinstimmung mit dem Phenanthrengelalt. In Abb. 7-8 b werden die Verläufe der Intensitäten der drei negativen Korrelationsbereiche vergleichend dargestellt mit dem durch den Proteingelalt repräsentierten Zellwachstum. Lediglich der im Fluoreszenzbereich der Flavine gelegene Korrelationsbereich 2 zeigt gute Übereinstimmung. Die beiden anderen Bereiche verlaufen erst nach 19 h, also in der stationären Phase, vergleichbar mit dem Zellwachstum. Abb. 7-8 c zeigt die Gegenläufigkeit von Zellwachstum und Verstoffwechslung von Phenanthren. Außerdem werden die Wellenlängen bester Korrelation aus den Korrelationsbereichen 2 (Ex 420 / Em 530 nm) und 6 (Ex 380 / Em 400 nm) einzeln gezeigt.

Sämtliche in Abb. 7-8 gezeigten Intensitätsdaten wurden jeweils über fünf Punkte zeitlich gemittelt.

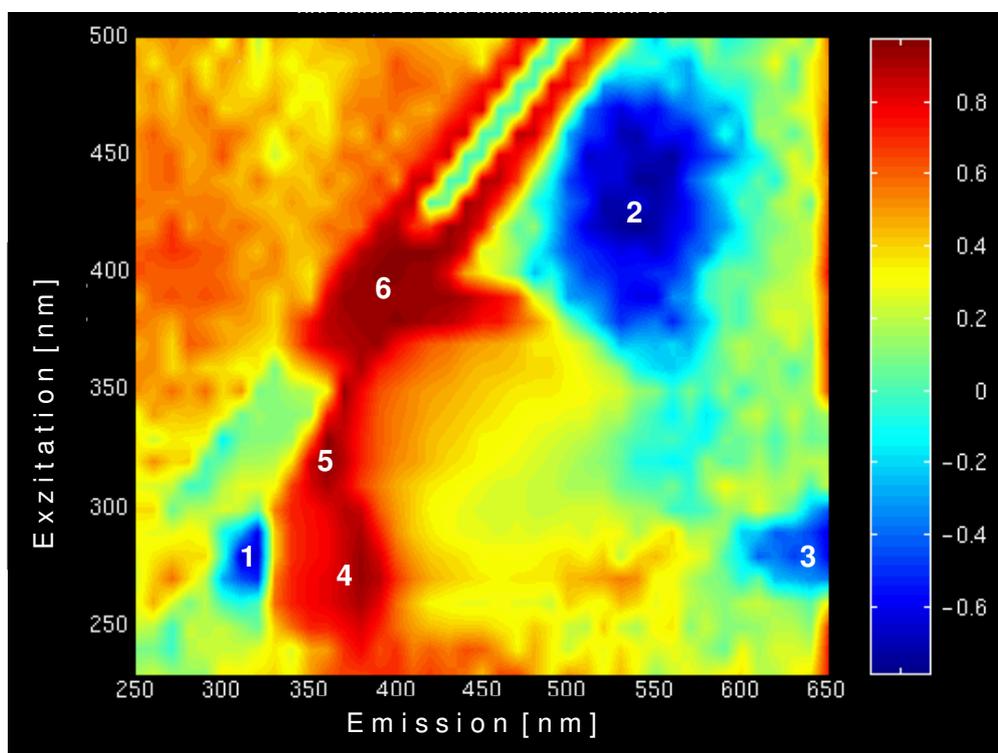


Abb. 7-7: Phenanthren-Korrelations-Diagramm der Kultivierung mit 100 mg/L Phenanthren und 100 mg/L Sophoroselipid

Tabelle 7.4: Ausgewählte Wellenlängenpaare aus den Fluoreszenzbereichen in Abb. 7-7

Korrelationsbereich	1	2	3	4	5	6
RFI-Maximum [nm]	280/320	430/540	280/650	280/380	310/360	380/400
ausgewählte Wellenlängenpaare im Korrelationsbereich [nm]	280/310,320 290/320	420/510 420-450/520 390-470/530 410-460/540 430-450/550 430-450/560	270-290/650	260-300/380	310-320/360	370/380,390 380/370-420 390/380-410 400/390-420
Bereichsbezeichnung	"Protein"	"Flavine"	"Protein 2"	"Emission 380 nm"	"Emission 360 nm"	"Streulicht 400 nm"

### 7.5.2 Veränderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren im Kultivierungsverlauf

Die Veränderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren im Kultivierungsverlauf von *S. yanoikuyae* unter Tensidzusatz sind in Abb. 7-9 am Beispiel der Kultivierung mit 25 mg/L Sophoroselipidzusatz gezeigt. Die Skalierung der RFI ist dem jeweiligen Spektrum angepaßt, so daß sich die Farbbereiche nicht direkt miteinander vergleichen lassen. In den ersten 10 h nach Zugabe der Zellen nimmt die Fluoreszenzintensität im Bereich des gelösten Phenanthrens um Ex 280 / Em 360 nm ab, während sie im benachbarten Bereich der Phenanthrenfeststofffluoreszenz zunimmt (Abb. 7-9 a). Dieser Bereich der Zunahme ist im Vergleich zu dem reinen Feststoffspektrum (Abb. 7-1 c, Em=405 nm) zu höheren Emissionswellenlängen (Em=420 nm) verschoben. Diese Verschiebung wird auch im Vergleich mit den eingezeichneten Bereichen aus Abb. 7-5 deutlich, die im Vorversuch mit Phenanthren und Sophoroselipid ohne Zellen ermittelt wurden. Im gesamten Streulicht nehmen die Intensitäten in den ersten 20 h ab. Im Bereich 3 ist diese Abnahme im Zeitraum 10 bis 20 h nicht so stark wie im Streulichtbereich 4 (Abb. 7-9 b), und in den letzten fünf Kultivierungsstunden nehmen die relativen Intensitäten im Bereich 3 sogar zu, während sie im Bereich 4 leicht abnehmen (Abb. 7-9 c). Die Phenanthrenfeststofffluoreszenz nimmt von der 10. bis zur 20. Kultivierungsstunde stark, in den 5 h danach noch wesentlich stärker ab, während sich im Bereich des gelösten Phenanthrens die Fluoreszenzintensität kaum verändert. In der gezeigten Skalierung sind die Veränderungen von intrazellulären biogenen Fluorophoren nicht zu erkennen. Zudem überlagert die starke Phenanthrenfluoreszenz im festen und auch im gelösten Zustand weite Bereiche des 2D-Fluoreszenzspektrums.

Beim Blindversuch mit abgetöteten Zellen nimmt die Fluoreszenzintensität im Bereich des kristallinen Phenanthrens (1) und noch wesentlich stärker im Bereich des gelösten Phenanthrens (2) nach Zugabe der Zellsuspension bis nach 10 h zu (Abb. 7-9 d).

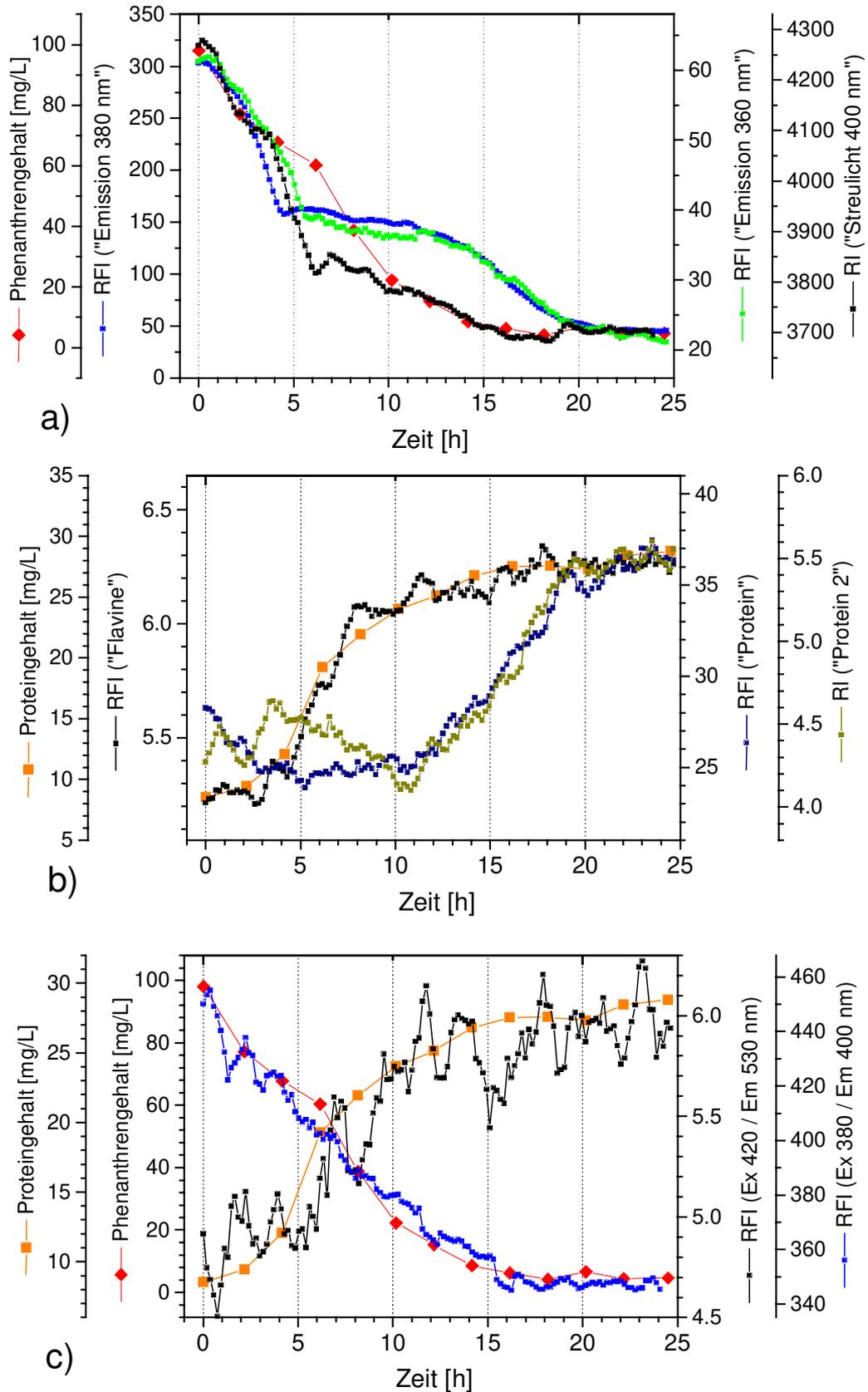


Abb. 7-8: Verlauf von Phenanthren- und Proteingehalt und Verlauf der Intensitäten in den Korrelationsbereichen aus Tabelle 7.4 und Abb. 7-7 während der Kultivierung von *S. yanoikuyae* mit jeweils 100 mg/L Phenanthren und Sophoroselipid

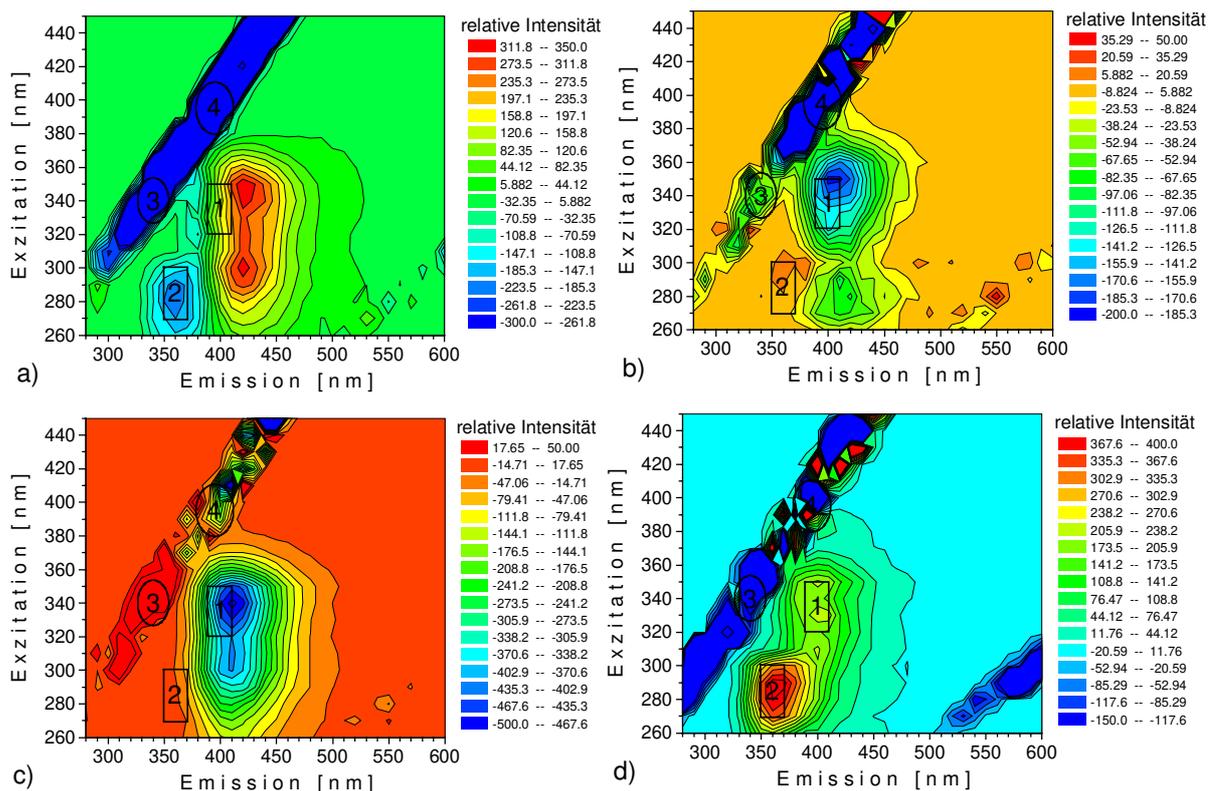


Abb. 7-9: 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren der Kultivierung von *S. yanoikuyae* in MM-Brunn-Medium mit 100 mg/L Phenanthren und 25 mg/L Sophoroselipid a) 10 h - 0 h, b) 20 h - 10 h, c) 25 h - 20 h und d) 10 h - 0 h des Blindversuchs mit dem gleichen Medium und abgetöteten Zellen

### 7.5.3 Fluoreszenzverläufe bei Kultivierungen von *S. yanoikuyae* mit unterschiedlichen Sophoroselipidgehalten

Abb. 7-10 zeigt den Phenanthrengehalt und den Verlauf der relativen Intensitäten in den Bereichen "Phenanthren 1", "Phenanthren 2" und "Streulicht 390 nm" (aus Abb. 7-5 und Tabelle 4.3) in Kultivierungen von *S. yanoikuyae* in MM-Brunn-Medium mit 100 mg/L Phenanthren und unterschiedlichen Sophoroselipidgehalten. In Abb. 7-10 a werden die Veränderungen beim Blindversuch mit abgetöteten Zellen und 25 mg/L Sophoroselipid gezeigt. Am Verlauf im Bereich "Phenanthren 1" wird deutlich, daß der Gleichgewichtszustand etwa 7 h nach Zugabe der abgetöteten Zellen erreicht ist. Bis dahin steigen die Fluoreszenzintensitäten an. Im Bereich "Phenanthren 2" ist die Streuung der jeweils nur im Bereich und nicht zeitlich gemittelten Intensitäten wesentlich geringer. Der Anstieg ist bereits 4 h früher beendet. Im gezeigten Streulichtbereich sinken die Intensitäten in den ersten 1,5 h ab und streuen danach deutlich stärker als in den übrigen Bereichen um etwa  $\pm 3\%$ . Der mit Gaschromatographie bestimmte Phenanthrengehalt (Kap. 14) streut auch stark (bis zu 20%). Insgesamt ist eine leicht fallende Tendenz zu erkennen.

Die in Abb. 7-10 b gezeigte Kultivierung wurde mit 2 mg/L Sophoroselipid und damit etwas unterhalb der cmc von 4 mg/L durchgeführt. Der Verlauf der Intensitäten in den drei gezeigten Bereichen ähnelt denen mit 25 mg/L, 100 mg/L und 500 mg/L Sophoroselipid (Abb. 7-10 c, d und e).

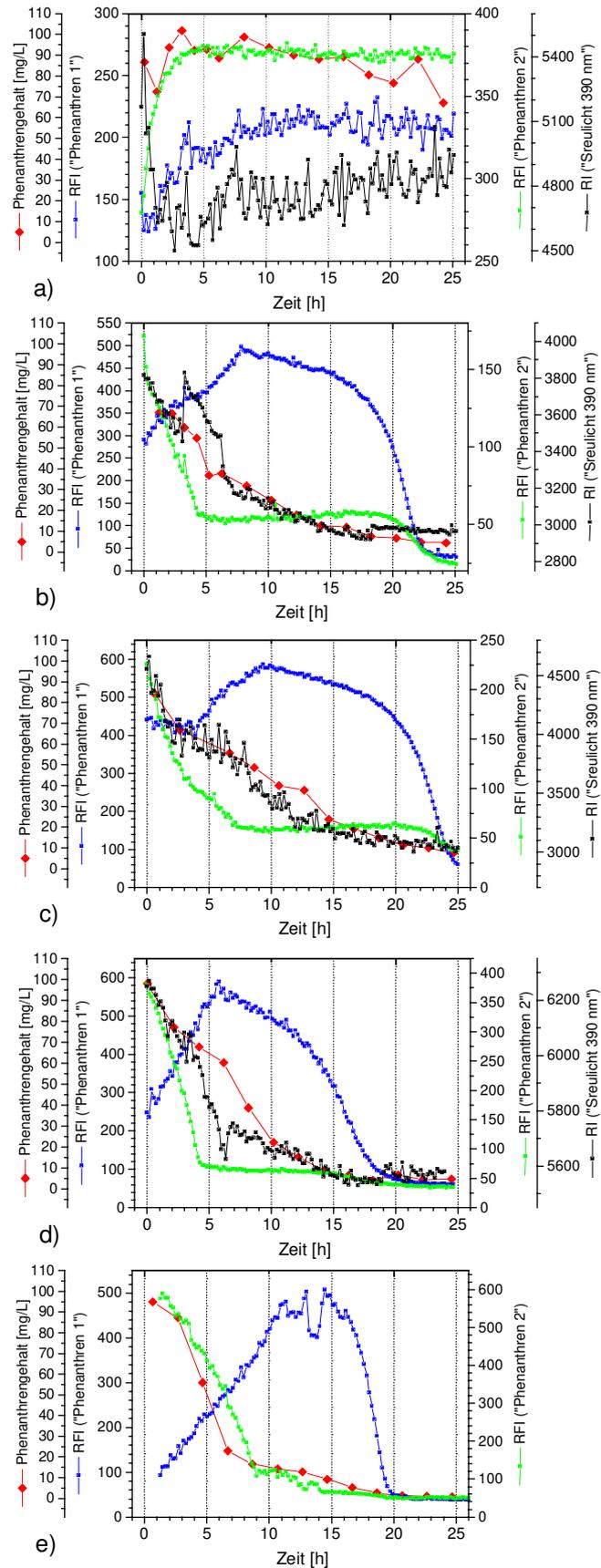


Abb. 7-10: Phenanthrenegehalt und Verlauf der RFI ("Phenanthren 1", "Phenanthren 2", "Streu-licht 390 nm") (siehe Abb. 7-5 und Tabelle 4.3) in Kultivierungen von *S. yanoikuyae* in MM-Brunn-Medium mit 100 mg/L Phenanthren und a) 25 mg/L (Blindversuch mit abge-töteten Zellen), b) 2 mg/L, c) 25 mg/L, d) 100 mg/L und e) 500 mg/L Sophoroselipid

Der Intensitätsverlauf im "Streulicht 390 nm" zeigt vor allem am Anfang und am Ende große Ähnlichkeit mit dem Phenanthrenabbau. Die Anfangswerte im Bereich "Streulicht 390 nm" nehmen mit steigender Sophoroselipidkonzentration zu und übersteigen bei 500 mg/L den Meßbereich, daher wird dieser Bereich in Abb. 7-10 e nicht gezeigt. Die Fluoreszenzintensitäten im Bereich "Phenanthren 2" fallen in den ersten Kultivierungsstunden steil ab und bleiben dann auf niedrigem Niveau. Am Kultivierungsende fällt die Kurve um etwa 30 relative Einheiten auf den Endwert ab. Aufgrund der dafür geeignetsten Skalierung ist dieser Abfall bei der geringsten Sophoroselipidkonzentration am auffälligsten sichtbar. Die Anfangsintensitäten nehmen mit steigender Sophoroselipidkonzentration von 160 auf 600 relative Einheiten deutlich zu. Die RFI ("Phenanthren 1") erreicht etwa 2 h bis 3 h nach Beendigung des Abfalls der RFI ("Phenanthren 2") ihr Maximum bei 500 bis 600 relativen Einheiten in der gleichen Größenordnung in allen dargestellten Kultivierungen. Der Abfall erfolgt erst allmählich und dann immer steiler bis zu einer relativen Fluoreszenzintensität von etwa 50 relativen Einheiten.

Der Einfluß steigender Tensidkonzentration auf den Phenanthrenabbau läßt sich besonders gut verfolgen durch den Zeitpunkt, an dem der Phenanthrengehalt auf 20 mg/L abgefallen ist. Aus Abb. 7-10 kann abgelesen werden, daß dieser beim Erhöhen der Sophoroselipidkonzentration von 2 mg/L, 25 mg/L, 100 mg/L auf 500 mg/L von 12 h, 14 h, 10 h auf 6,5 h verkürzt wird. Nähere Untersuchungen zum Einfluß steigender Tensidkonzentration auf den Phenanthrenabbau führte SCHIPPERS [1999] bei diesen Kultivierungen durch.

## 7.6 Versuche mit Bodenproben

Die ersten Untersuchungen an realen Bodenproben wurden durchgeführt an einem sandigen Schluffboden in 10 %iger Suspension, die mit 100 mg/L Phenanthren versetzt wurde. Um Bodenbestandteile und Zellen zu entfernen, wurden die Kultivierungsproben 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert. Die Überstände wurden in der Makroküvette im Fluoreszenzspektrophotometer F-4500 in Dreifachbestimmung vermessen. In einem zweiten Versuch wurden die Mikroorganismen mit Natriumacid abgetötet, um abiotische Faktoren für den Abbau auszuschließen.

Abb. 7-11 vergleicht den Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten bei Ex 340 / Em 410 nm dieser beiden Kultivierungen miteinander. Während die Fluoreszenzintensitäten im Versuch mit abgetöteten Zellen auf konstant niedrigem Niveau bleiben, steigen sie bei mikrobiellem Abbau in den ersten 6 h steil an, um danach bis 14 h wieder auf das Anfangsniveau abzufallen.

Abb. 7-12 zeigt logarithmisch skalierte 2D-Fluoreszenzspektren vom Zentrifugat beim Phenanthrenabbau im Boden mit *S. yanoikuyae*. a) nach 0 h, b) nach 6 h, c) nach 22 h und d) nach 6 h vom Versuch mit abgetöteten Zellen. Oberhalb der Anregungswellenlänge 270 nm sehen Abb. 7-12 a, c und d sehr ähnlich aus. Das Maximum liegt bei Ex 320-330 / Em 430-440 nm. Ein weiteres Fluoreszenzmaximum bei Ex 240 / Em 420 nm ist am Anfang der Kultivierung mit *S. yanoikuyae* ausgeprägter als am Ende. In dem Blindversuch mit abgetöteten Zellen ist es gar nicht zu sehen. Dies ist offensichtlich auf Fluoreszenzlöschung zurückzuführen, denn das Streulicht 2. Ordnung ist unterhalb von Ex = 270 nm nicht zu erkennen (Abb. 7-12 d). Das Fluoreszenzmaximum im 2D-Fluoreszenzspektrum nach 6 h (Abb. 7-12 b) liegt bei Ex 340 / Em 415 nm um etwa 10 Größenordnungen höher als am Anfang und am Ende der Kultivierung.

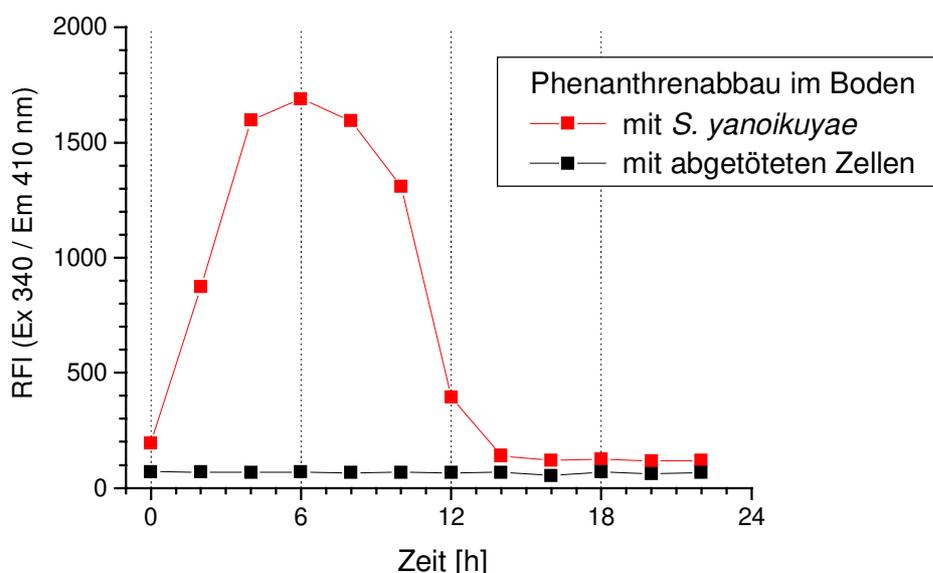


Abb. 7-11: Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten bei Ex 340 / Em 410 nm des Phenanthrenabbaus in 10 %iger Bodensuspension

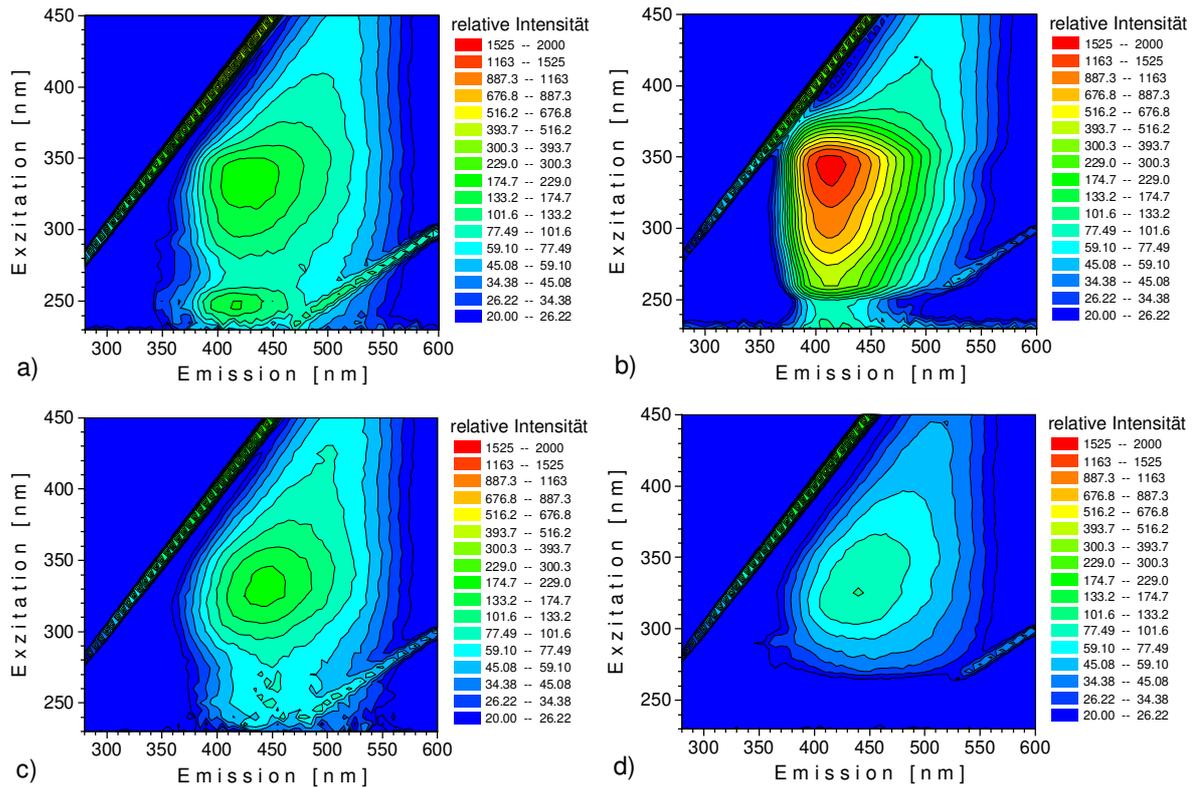


Abb. 7-12: 2D-Fluoreszenzspektren vom Zentrifugat beim Phenanthrenabbau im Boden mit *S. yanoikuyae*) nach 0 h, b) nach 6 h, c) nach 22 h und d) nach 6 h des Versuches mit abgetöteten Zellen

## 7.7 Diskussion

Das Fluoreszenzmaximum von Phenanthren wurde bei Ex 254 / Em 365 nm gefunden [BERLMAN, 1971; CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 1995]. Dieses Ergebnis konnte in der Küvettenmessung von gelöstem Phenanthren (Löslichkeit etwa 1 mg/L) reproduziert werden (Abb. 7-1 d). Die Transmission des zur Online-Beobachtung von Kultivierungen verwendeten Lichtleiters sinkt bei 270 nm auf unterhalb 0,4 ab und ist bei 260 nm auf etwa 0,1 abgefallen [HILMER, 1996]. Die Folge davon ist, daß das Fluoreszenzmaximum bei Verwendung des Lichtleiters auf Ex 260-280 / Em 360 nm scheinbar verschoben wurde (Abb. 7-1 a). Unter der Berücksichtigung, daß die Messungen in Abb. 7-1 bereits mit einem im nahen UV-Bereich verbesserten Lichtleiter aufgenommen wurden, entspricht dieses Maximum dem Fluoreszenzmaximum, das bei Zugabe von fluoreszenzfreiem Sophoroselipid (Abb. 7-2 b) zu einer Phenanthrensuspension bei Ex 290 / Em 360 nm detektiert wird und mit ansteigendem Tensidgehalt zunimmt (Abb. 7-2 d-f). Es wurde mit diesen Messungen herausgefunden, daß in diesem Bereich nicht nur wäßrig gelöstes, sondern auch mizellar gelöstes Phenanthren fluoresziert, das sich aufgrund seines hydrophoben Charakters in dem apolaren Innenraum der Mizellen des Sophoroselipids einlagert. Die Gesamtmenge eines hydrophoben Stoffes in wäßriger und mizellarer Phase wird als apparente Löslichkeit bezeichnet.

Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von kristallinem Phenanthren unterscheiden sich deutlich von dem gelösten. Die mit dem Feststoffadapter ermittelte Phenanthrenfeststofffluoreszenz liegt bei Ex 310, 330, 350 nm/ Em 400 nm (Abb. 7-2 c). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den von HILMER verwendeten Wellenlängen Ex 270, 330, 350 nm/ Em 400 nm zur Korrelation von Fluoreszenzdaten mit dem Phenanthrengesamtgehalt bei einer Kultivierung mit 1 g/L Glucose und 100 mg/L Phenanthren [HILMER, 1996]. Eine Erklärung für die im Vergleich zum Spektrum des gelösten Phenanthrens erhöhten Anregungs- und Fluoreszenzwellenlängen könnte die stärkere Elektronendelokalisierung im Kristallverbund liefern. Die Elektronen wären dadurch leichter (d.h. mit geringerer Energie, also bei höheren Wellenlängen) anregbar.

Der einzige Fluorophor, der für die Fluoreszenz verantwortlich ist, ist Phenanthren. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie kann die physikalische Mikroumgebung einzelner Phenanthrenmoleküle (apparent gelöst oder kristallin) erkannt werden und die Veränderungen der kristallinen Phenanthrenmoleküle von den wäßrig- oder mizellar-gelösten unterschieden werden.

So ist es möglich, Löslichkeitsgleichgewichte von kristallinem und apparent gelöstem Phenanthren zu verfolgen. Die Einstellung des Gleichgewichts kann sehr lange dauern. Bei der Zugabe von 120 mL Sophoroselipid zu 100 mg/L Phenanthren und 30 mL Sophoroselipid in MM-Brunn-Medium war erst nach 6,5 h der Gleichgewichtszustand erreicht (Abb. 7-6).

Bei der Zugabe von Phenanthren zu einer Sophoroselipidlösung kann anfangs nur kristallines Phenanthren fluoreszenzspektrometrisch detektiert werden (Abb. 7-3 a). Wird in umgekehrter Reihenfolge erst Phenanthren vorgelegt und anschließend Sophoroselipid zugefügt, so ist dagegen sofort die Fluoreszenz von (apparent) gelöstem Phenanthren zu erkennen (Abb. 7-4). Die Erklärung hierfür könnte sein, daß sich bei der Zugabe von Sophoroselipid die Mizellen frisch bilden und bei diesem Prozeß Phenanthrenmoleküle einschließen, wäh-

rend im anderen Fall das Phenanthren erst einmal in die bereits gebildeten Mizellen durch die polare Schicht gelangen muß, was offensichtlich einige Zeit in Anspruch nimmt und die Begründung für die langsame Einstellung des Lösungsgleichgewichtes ist.

Bei der Zugabe von Sophoroselipid zu einer Phenanthrensuspension kommt es nicht nur in dem Bereich gelösten Phenanthrens ("Phenanthren 1"), sondern auch im Bereich des kristallinen Phenanthrens ("Phenanthren 2") zu einem Intensitätsanstieg (Abb. 7-5 c und Abb. 7-6 a). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß beim Prozeß des Auflöserns der Phenanthrenkristalle immer kleinere Kristalle mit insgesamt wesentlich größerer Oberfläche entstehen. Zudem erhöht sich dann auch die Wahrscheinlichkeit, daß sich zum Meßzeitpunkt festes Phenanthren in der angestrahlten Meßumgebung hinter dem Lichtleiterkopf befindet. Bei diesem Prozeß nimmt die RI ("Streulicht 390 nm") zu, während spiegelbildlich dazu die RI ("Streulicht 340 nm") abnimmt. In Übereinstimmung mit der oben gegebenen Erklärung würde die vom RI ("Streulicht 390 nm") angezeigte Partikelstreuung bei kleiner werdenden Phenanthrenkristallbruchstücken zunehmen. Für die Abnahme der RI ("Streulicht 340 nm") könnten Absorptionseffekte verantwortlich sein.

Im Kultivierungsverlauf wurde erwartet, daß der Phenanthrenabbau aufgrund der Substratfluoreszenz gut verfolgt werden könnte. Da sich die Phenanthrenfluoreszenz in die Bereiche kristallinen und gelösten Phenanthrens aufteilt, ist eine direkte Korrelation eines dieser Bereiche mit dem offline im GC-MS bestimmten Phenanthrengehalt nicht möglich (Abb. 7-10). Im Phenanthren-Korrelations-Diagramm (Abb. 7-7) weisen Bereiche zwischen den beiden Phenanthrenfluoreszenzbereichen eine hohe Korrelation zum Phenanthrengehalt auf. Diese mit "Emission 380 nm" und "Emission 360 nm" bezeichneten Bereiche (Tabelle 7.4) zeigen Intensitätsverläufe, die sich aus den Überlagerungen der beiden Phenanthrenfluoreszenzbereiche ergeben und die lediglich am Anfang und am Ende der Kultivierung mit dem Phenanthrengehalt übereinstimmen (Abb. 7-8 a). Rechnerisch ergibt sich die Korrelation dadurch, daß die Abweichungen oberhalb des Phenanthrengehalts denen unterhalb etwa entsprechen. Dies ist ein Beispiel dafür, daß eine mathematisch berechnete hohe Korrelation nicht zwangsläufig einen Rückschluß auf einen vergleichbaren Verlauf erlaubt. Bessere Übereinstimmungen zum Phenanthrengehalt zeigen die Fluoreszenzintensitäten im Bereich "Streulicht 400 nm", vor allem bei Ex 380 / Em 400 nm (Abb. 7-8), der stark vom Partikelstreulicht beeinflusst wird. Auch im Verlauf der übrigen Kultivierungen mit unterschiedlichen Sophoroselipidgehalten läßt sich der mit dem Bereich "Streulicht 400 nm" (aus Abb. 7-7) vergleichbare Bereich "Streulicht 390 nm" (aus Abb. 7-5) gut mit dem Phenanthrengehalt korrelieren (Abb. 7-10).

Der Verbrauch der Kohlenstoff-Quelle (Phenanthren) weist eine hohe negative Korrelation (Abb. 7-7) in den Bereichen auf, mit denen sich das Zellwachstum verfolgen läßt (Abb. 7-8). Obwohl die Intensitätszunahme im mit "2" gekennzeichneten Bereich der Flavinfluoreszenz nur sehr gering ist (nur eine relative Einheit), sind die Übereinstimmungen mit dem Proteingehalt sehr gut (Abb. 7-8 b). Das Zellwachstum ist direkt verbunden mit dem Verbrauch der einzigen Kohlenstoff-Quelle, was den spiegelbildlichen Verlauf von Phenanthrengehalt und Proteingehalt in Abb. 7-8 c erklärt.

Im Blindversuch mit abgetöteten Zellen nehmen die Fluoreszenzintensitäten in den Bereichen gelösten und kristallinen Phenanthrens zu (Abb. 7-9 d und Abb. 7-10 a). Wie bereits oben diskutiert, könnten dafür die zunehmende apparente Löslichkeit einerseits und die Entstehung von immer kleineren Phenanthrenkristallen mit wachsender Gesamtoberfläche andererseits verantwortlich sein. Durch diesen Blindversuch wird die Vermutung entkräftet, daß Phenanthrenmetabolite den Fluoreszenzanstieg im Bereich kristallinen Phenanthrens in den ersten Kultivierungstunden des mikrobiellen Abbaus verursachen könnten [WODARCZAK, 1997].

Die Auswirkung der mikrobiellen Aktivität von *S. yanoikuyae* zeigt sich in einer steilen Abnahme der Intensitäten im Bereich des gelösten Phenanthrens in den ersten Kultivierungstunden (Abb. 7-9 a und Abb. 7-10 b bis e). In dieser Form ist das Phenanthren den Zellen offensichtlich zugänglich ("bioverfügbar"). In Übereinstimmung mit dieser Erklärung steht, daß bei vergleichbaren Kultivierungen ohne Tensidzusatz eine Adaptionsphase beobachtet wurde, die bei sämtlichen gezeigten Kultivierungen mit Tensidzusatz fehlt. Liegt Phenanthren zu Kultivierungsbeginn bereits mizellar gelöst vor, beginnt der Abbau sofort.

Der Anstieg der Intensität im Bereich des kristallinen Phenanthrens in den ersten Kultivierungsstunden (Abb. 7-9 a und Abb. 7-10 b bis e) könnte wiederum mit dem Auftreten von immer kleineren Phenanthrenkristallen im Verlauf des Abbauprozesses erklärt werden. Auffällig ist hierbei eine Emissionswellenlängenverschiebung des Fluoreszenzmaximums um etwa 20 nm (Abb. 7-9 a), die eventuell mit der Anlagerung der Phenanthrenkristalle an die Zelloberfläche zusammenhängt.

Auffällig ist, daß der Anstieg von RFI ("Phenanthren 1") von kristallinem Phenanthren bei den gezeigten Kultivierungen 2 h bis 3 h nach Beendigung der Abnahme von RFI ("Phenanthren 2") von gelöstem Phenanthren erfolgt (Abb. 7-10). Im Vorversuch wurde festgestellt, daß sich bei der Löslichkeitsgleichgewichtseinstellung die Veränderungen über einen Zeitraum von 2,5 h erstrecken (Abb. 7-6).

Nach Beendigung der Intensitätsabnahme im Bereich des gelösten Phenanthrens bleiben die Intensitäten auf konstant niedrigem Niveau. Da der Übergang von kristallinem Phenanthren in die Mizellen, wie durch Vorversuche bewiesen wurde, ein sehr langsamer Prozeß ist, liegt die Vermutung nahe, hier den für den Phenanthrenabbau geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu sehen. Sobald ein Phenanthrenmolekül (apparent) gelöst und damit bioverfügbar wird, wird es verstoffwechselt, ohne daß sich das apparent gelöste Phenanthren fluorimetrisch erfassen läßt.

Wegen der Gefahr einer Beschädigung der Quarzglas-Scheibe vor dem Lichtleiterkopf wurden die Bodenkultivierungen nicht online verfolgt. Die Ergebnisse der Offline-Messungen in der Küvette vom Zentrifugat der Kultivierungen mit *S. yanoikuyae* ohne Tensidzusatz und mit abgetöteten Zellen stimmen mit den oben gegebenen Erklärungsansätzen überein. Ohne mikrobiologische Aktivität verändert sich die Fluoreszenzintensität bei Ex 340 / Em 400 nm innerhalb von 22 h nicht signifikant. Die Phenanthrenkristalle werden nicht so klein, daß sie nach der Zentrifugation im Überstand zu finden sind. Der geringe Anteil gelösten Phenanthrens bleibt konstant (Abb. 7-11), der Gesamtphenanthrengehalt bleibt konstant hoch. Kleinste Phenanthrenkristalle werden unter den gewählten Bedingungen nicht abzentrifu-

giert, so daß im Verlauf des Phenanthrenabbaus im Boden mit *S. yanoikuyae* die Phenanthrenfeststofffluoreszenz wie in den Kultivierungen im Medium erst ansteigt, bevor sie den Phenanthrenabbau durch Intensitätsabnahme anzeigt (Abb. 7-11).

Aus den durchgeführten 2D-Fluoreszenzuntersuchungen wird folgender Mechanismus postuliert:

Der Abbau des Phenanthrens verläuft anfangs schnell. Das apparent gelöste Phenanthren wird verstoffwechselt. Dann wird der Eintritt von Phenanthren in die Mizellen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

Als Schlußfolgerung daraus sollte der Effekt einer ständigen Zugabe von Tensidlösung in geringer Konzentration untersucht werden. Damit wären keine festen Mizellen im Medium, sondern es würden immer neue gebildet, und Phenanthren könnte einfacher eingeschlossen werden.

Außerdem könnten durch stärkeres Rühren im Flüssigmedium die Mizellen zerstört werden, und so könnte Phenanthren leichter eingelagert werden.

In Übereinstimmung mit dem oben postulierten Mechanismus stellten bereits HITZMANN *et al.* [1998] einen untypischen Substratabbauverlauf beim Abbau von Phenanthren mit *S. yanoikuyae* unter Tensidzusatz fest. Eine Kinetik erster Ordnung, die auf einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Löslichkeit des Phenanthrens hindeutete, wurde annähernd erhalten.

Die durchgeführten Kultivierungen zum Phenanthrenabbau mit Tensidzusatz stellen ein sehr komplexes System dar. Phenanthren liegt in wäßriger Lösung überwiegend als Feststoff vor. Ein geringer Anteil ist wäßrig gelöst. Abhängig von der Tensidkonzentration wird Phenanthren auch unterschiedlich stark mizellar gelöst. Zusätzlich zu den Wechselwirkungen untereinander kommt es zu Wechselwirkungen mit den Mikroorganismen.

So kann es zur Adhäsion von Bakterien an das Substrat kommen [NEU, 1996]. Selbst durch Hitze abgetötete Zellen können die cmc um 30% erniedrigen. Diese Zellen selbst können dann als oberflächenaktive Komponenten angesehen werden [WILLUMSEN, 1998]. Der Austritt des PAK aus den Mizellen wird vielfach als sehr langsam beschrieben [VOLKERING *et al.*, 1992, 1995; GUHA und JAFFÉ 1996; ZHANG *et al.*, 1997]. Tenside können von bakteriellen Membranen aufgenommen werden [JAQUES *et al.*, 1985; ASTER und CORIIEU, 1987; GUERIN und JONES, 1988]. Oberflächenaktive Substanzen können zur Permeabilisierung der Zellwand führen [WILLUMSEN, 1998] oder die Zellen hydrophober machen. Neben den Tensid-Mizell-Zell-Wechselwirkungen sind außerdem auch noch die Tensidmonomer-Zell-Wechselwirkungen zu berücksichtigen. Sowohl zu viel Tensid, als auch zu viel PAK können toxisch für die Zellen sein [WILLUMSEN, 1998].

Durch einen Zusatz von Tensiden soll der geringen Löslichkeit von PAK entgegengewirkt und mehr PAK der Zelle zugänglich gemacht werden. Die vielfältigen Wechselwirkungen zeigen jedoch, daß es komplizierter ist, den genauen Mechanismus herauszufinden. Die

Aufnahme und Verwertung von Phenanthren durch die Zellen in Gegenwart von Tensiden ist noch nicht ganz geklärt. Verschiedene Organismen können über unterschiedliche Mechanismen bzw. Wechselwirkungen von Organismus, Tensidmolekül und PAK-Substrat verfügen [WILLUMSEN, 1998].

Bisher werden folgende Mechanismen zur Erhöhung der Schadstoffaufnahme durch Tenside postuliert:

1. Löslichkeit (damit Bioverfügbarkeit) wird erhöht,
2. Zellen werden hydrophober,
3. Zellwand wird permeabilisiert, dadurch können PAKmolekülen vereinfachter in die Zellen eindringen

[SCHIPPERS, 1999].

Einen wertvollen Beitrag zur Untersuchung dieser komplexen Wechselwirkungen sollte nach den hier präsentierten Ergebnissen die 2D-Fluoreszenzspektroskopie leisten können. Sie könnte ein tieferes Verständnis von Schadstoffabbauwegen auf molekularer Ebene ermöglichen.

Es ist bereits gezeigt worden, daß sich die fluoreszierenden PAK durch unterschiedliche Exzitations- und Emissionswellenlängen durch die 2D-Fluoreszenzspektroskopie unterscheiden lassen [ROCH, 1994]. In Kombination mit der Messung der Fluoreszenzlebensdauer würde sich der Abbau von PAK-Gemischen (z. B. Mineralöle) charakterisieren lassen.

## 8 Synchrones Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*

### 8.1 Theorie des synchronen Wachstums

Als synchrones Wachstum wird eine gleichzeitige Teilung eines Großteils von Zellen verstanden. Es handelt sich um einen speziellen Fall des kontinuierlichen Wachstums von Mikroorganismen, bei dem die Werte nahezu sämtlicher Kultivierungsvariablen ohne äußeren Eingriff stabil oszillieren. In Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen sind Synchronisationen auch möglich, jedoch nicht so effektiv und reproduzierbar.

Auch der circadiane Tagesrhythmus bei Mensch, Pflanze und Tier äußert sich in Oszillationen biochemischen Ursprungs. Glykolytische Oszillationen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die durch die Regulation der Phosphofruktokinase (PFK) in der Glykolyse entstehen, haben eine Periodendauer von unter einer Minute, wie durch Oszillationen der NAD(P)H-Kulturfluoreszenz gezeigt werden konnte [TEUSINK *et al.*, 1996].

Ein synchrones Wachstum von *S. cerevisiae*, dessen Perioden dagegen einige Stunden betragen können, wird nur in einem bestimmten Bereich des Gelöstsauerstoffgehalts, des pH-Wertes und der Verdünnungsrate beobachtet, der je nach Kultivierungsbedingungen und dem verwendeten Stamm etwas variieren kann [PARULEKAR *et al.*, 1986; MARTEGANI *et al.*, 1990]. Die Periodenlänge wird bei geringerer Verdünnungsrate verlängert.

Die Induktion von Synchronkulturen kann durch den Start der kontinuierlichen Kultur nach einstündiger Hungerphase [BEUSE, 1998], kurzzeitigem Begasungswechsel auf anaerobe Bedingungen [SCHEPER und SCHÜGERL, 1986], Substratshift- oder -pulsversuche [KÜENZI und FIECHTER, 1969; MARTEGANI *et al.*, 1990; PORRO *et al.*, 1988] erfolgen. Vor dem Start des Chemostaten ist ein völliger Verbrauch der Kohlenstoffquellen zur Induktion von Synchronkulturen notwendig.

Der Zellzyklus der sprossenden Hefe *S. cerevisiae* besteht aus vier Abschnitten (Abb. 8-1). Die Initiierung der Sprossung erfolgt in der G<sub>1</sub>-Phase (*gap*<sub>1</sub>), die den längsten Abschnitt darstellt. In dieser Phase wächst die Zelle. Die Dauer der G<sub>1</sub>-Phase kann innerhalb des Zellzyklus variieren, während der Sprossungsvorgang selbst stets mit einer konstanten Geschwindigkeit abläuft. In der folgenden S-Phase (*synthesis*) finden die Duplikation des Spindelapparates und die DNA-Replikation statt. Eine Knospe wird an der Mutterzelle sichtbar, und eine Spindel aus Mikrotubuli wird gebildet. Die anschließende G<sub>2</sub>-Phase ist nur schwach ausgeprägt. Am Übergang zur M-Phase (Mitose, *mitosis*) kommt es zur gleichmäßigen Aufteilung des Genoms auf Mutter- und Tochterzelle. In der M-Phase findet die Teilung des Zellkerns statt. Nach der Trennung der beiden Zellen bleibt auf der Zellwand der Mutterzelle ein Chitinring als Sprossungsnarbe zurück, während die Tochterzelle eine konkave Geburtsnarbe behält. Sprossungsnarben ermöglichen die genetische Bestimmung des genealogi-

schen Alters einer Zelle und führen durch eingeschränkten Stofftransport dazu, daß ein unbegrenzter Stofftransport ausgeschlossen werden kann [LORD und WHEALS, 1980].

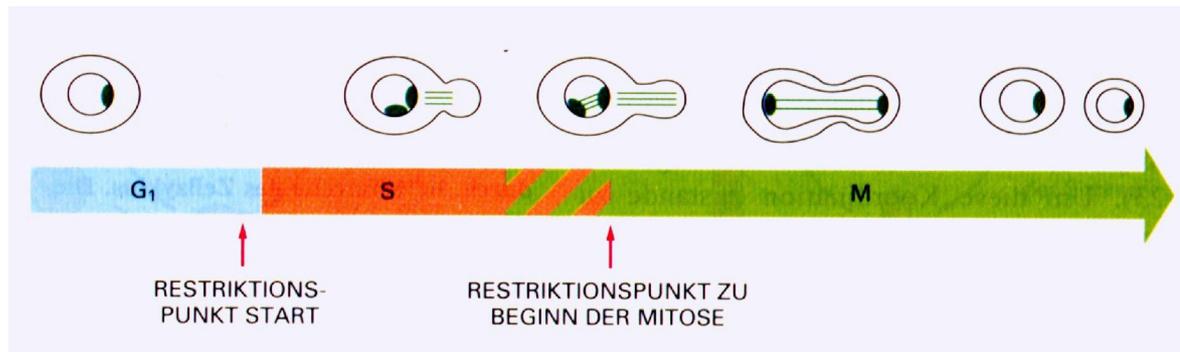


Abb. 8-1: Zellzyklus von *S. cerevisiae* [ALBERTS *et al.*, 1997]

Die Zellzykluslänge von Mutter- und Tochterzelle muß nicht gleich sein, unterscheidet sich jedoch nur durch ganzzahlige Vielfache der Periodenlänge. Das Verhältnis der Zykluszeiten von Mutter- und Tochterzellen wird als Wachstumsmodus bezeichnet [BELLGARDT, 1994]. Die ruhende Zelle befindet sich in der  $G_0$ -Phase.

Synchron wachsende Hefekulturen in kontinuierlicher Kultur zeigen während der Periode eines Zellzyklus deutliche Veränderungen in biologischen (z. B. Biomasse, Metabolismus), chemischen (z. B. pH, Redoxverhalten) und physikalischen (z. B.  $pO_2$ , Trübung) Prozeßgrößen [DUBOC *et al.*, 1996]. Sie ermöglichen daher eine Analytik in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Neben den Veränderungen der NAD(P)H-Kulturfluoreszenz [SCHEPER und SCHÜGERL, 1986; STRÄSSLE *et al.*, 1989] sollen mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie RFI-Verläufe weiterer biogener Fluorophore untersucht werden. Auch der Einfluß von Störungen auf das synchrone Wachstum und Substratpulse mit Glucose und Ethanol soll näher betrachtet werden.

## 8.2 Kultivierungsbedingungen

*S. cerevisiae* ist ein sich überwiegend durch Sprossung vermehrender Eukaryont und gehört zu den Protoascomyceten. Neben dem Einsatz als Back- und Brauereihefe gewinnt die Expression und Produktion genetisch veränderter Proteine zunehmend an Bedeutung [RATLEDGE, 1991].

Die für die kontinuierliche Kultivierung verwendeten Bedingungen werden in Tabelle 8.1 aufgelistet.

Tabelle 8.1: Kultivierungsbedingungen

♦ <b>Betriebsweise</b>	kontinuierliche Kultivierung
♦ <b>Organismus</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H 620
♦ <b>Kultivierungsanlage</b>	2 L-Reaktor (Typ Biostat M, B. Braun Biotech International, Melsungen)
♦ <b>Arbeitsvolumen</b>	1,5 L
♦ <b>Meßdatenerfassung</b>	RISP (TCI)
♦ <b>Medium</b>	Schatzmann-Medium mit 30 g/L Glucose (Kap. 14)
♦ <b>Temperatur</b>	30°C
♦ <b>pH</b>	4,85
♦ <b>Begasungsrate</b> (mit Druckluft)	1 vvm (1,5 L/min) für die kontinuierliche Kultivierung
♦ <b>Rührerdrehzahl</b>	800 UpM
♦ <b>Verdünnungsrate (D)</b>	0,13 h <sup>-1</sup>

Der pH-Wert wurde mit 10 % NaOH und 5 % HCl auf pH 4 reguliert. Als Antischaummittel wurde Wacker-Silikon (eingesetzte Konzentration 1:1000, Wacker Chemie GmbH, München) verwendet.

Zur Online-Messung der Kulturfluoreszenz wurde einerseits der BioView (Kap. 3) zur Charakterisierung der gesamten Kultivierung, andererseits das F-4500 (Kap. 3) zur genaueren Analytik eines Zellzyklus verwendet. Die Fluorometer-Einstellungen sind in Tabelle 8.2 angegeben.

Tabelle 8.2: Fluorometer-Einstellungen

verwendetes Fluoreszenzmeßgerät	BioView	F-4500
• Exzitationswellenlängenbereich	290-550 nm	250-550 nm
• Emissionswellenlängenbereich	310-590 nm	260-600 nm
• Schrittweite der Exzitations- / Emissionswellenlänge	20 nm / 20 nm	10 nm / 10 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	ca. 20 nm	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	1000 Einheiten	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	-	30000 nm/s
• Meßwiederholungen je Wellenlängeneinstellung	3	1
• Aufnahme-Intervall	5 min	2 min

Anschließend an eine Batch-Kultivierung wurde auf kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate von  $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$  umgestellt. Nach Durchlaufen eines Zellzyklus wurden die Verdünnungsrate auf  $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ , die Begasungsrate von 1 L/min auf 1,5 L/min und die Rührgeschwindigkeit von 700 UpM auf 800 UpM erhöht. Die betrachteten Oszillationen wurden durch eine vorangehende zweiminütige Stickstoffbegasung induziert.

## 8.3 Zellzyklusanalyse

### 8.3.1 Zellzyklusanalyse anhand von 2D-Fluoreszenzspektren mit dem BioView und dem F-4500

In Abb. 8-2 ist der gegenläufige Verlauf von Kohlendioxid und Sauerstoff im Abgas während einer Periode der synchronen Kultur von *S. cerevisiae* dargestellt. Die Periodenlänge beträgt ca. 5 h.

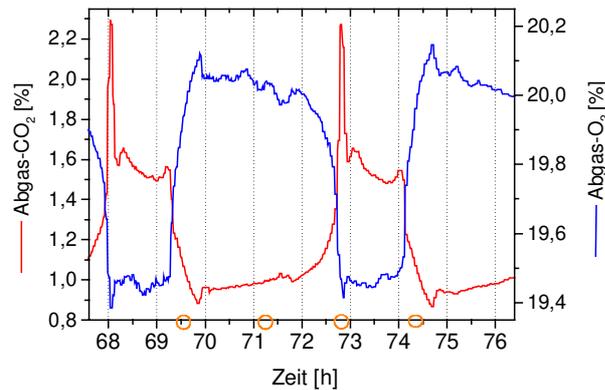


Abb. 8-2: Verlauf von Kohlendioxid und Sauerstoff im Abgas während einer Periode einer synchronen Kultur von *S. cerevisiae*

Auf der Zeitachse von Abb. 8-2 sind die Zeitpunkte orange markiert, die zur Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren in Abb. 8-3 und Abb. 8-4 herangezogen wurden. Die Spektren in Abb. 8-3 wurden mit dem F-4500, die Spektren in Abb. 8-4 mit dem BioView aufgenommen.

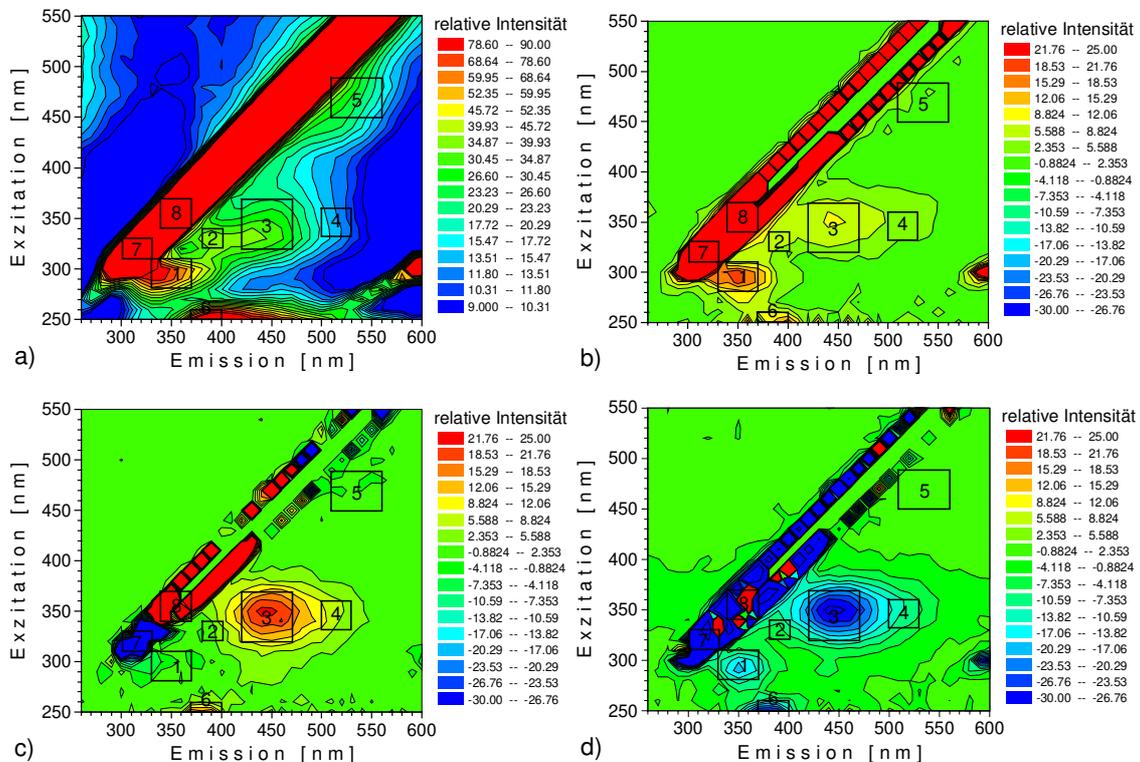


Abb. 8-3: a) 2D-Fluoreszenzspektrum nach 69,6 h in der synchronen Kultur von *S. cerevisiae* und 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren, b) 71,2 h - 69,6 h, c) 72,8 h - 71,2 h und d) 74,4 h - 72,8 h, aufgenommen mit dem F-4500

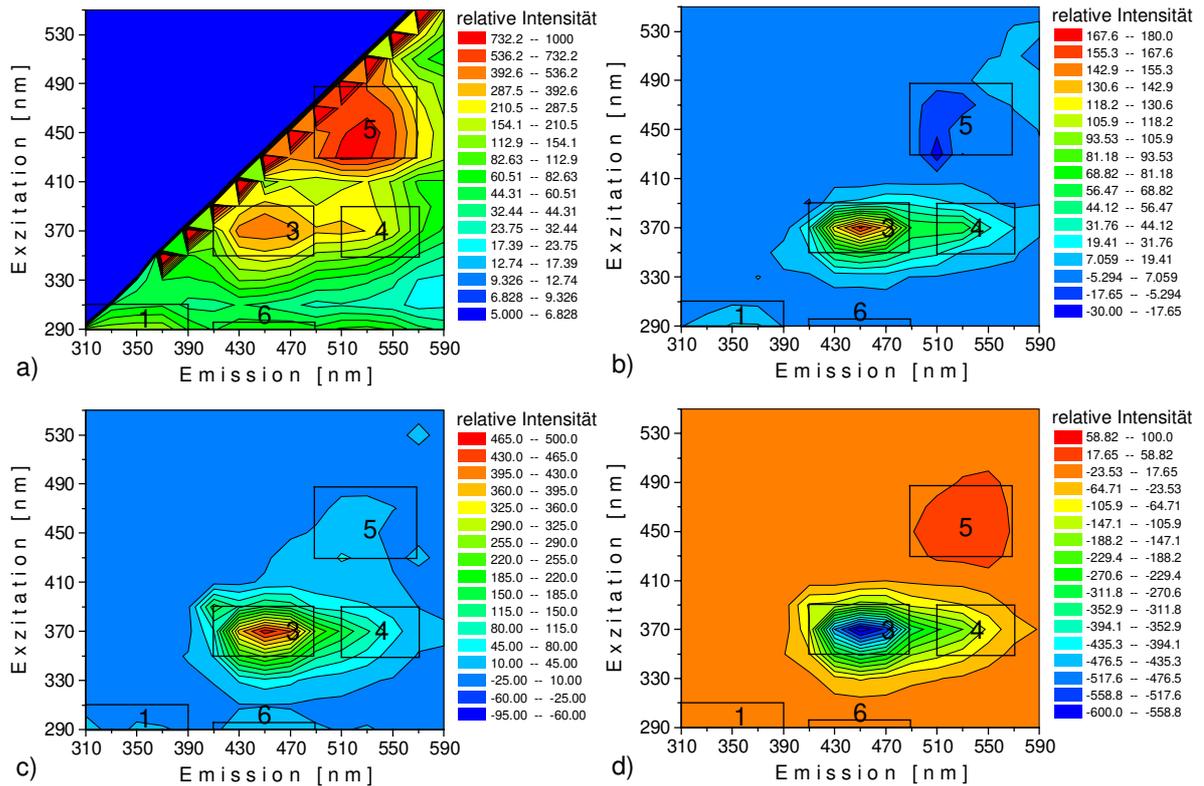


Abb. 8-4: 2D-Fluoreszenzspektrum und 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren der synchronen Kultur von *S. cerevisiae* aufgenommen mit dem BioView (Zeiten siehe Abb. 8-3)

In Abb. 8-3 a und Abb. 8-4 a werden die 2D-Fluoreszenzspektren nach 69,6 h gezeigt. Die markierten Bereiche werden in Tabelle 8.3 miteinander verglichen und im Vergleich zu Tabelle 2.2 biogenen Fluorophoren zugeordnet. In den Bereichen "Proteine" und "Flavine 2" stimmen die beiden Fluorometer gut miteinander überein. "Flavine 1" ist beim BioView wesentlich stärker ausgeprägt, dagegen weist der Exzitationsbereich von 310 nm bis 350 nm im Unterschied zum F-4500 keine Fluoreszenzpeaks auf. Daß in diesem Bereich geringe RFI mit dem BioView gemessen werden, wurde bereits in Kap. 2 festgestellt. "Pyridoxin" ist daher in Abb. 8-4 a nicht zu erkennen, "NAD(P)H" ist zu höheren Exzitationswellenlängen verschoben. "Bereich 6" fällt zum einen in den Bereich der Eigenfluoreszenz des Lichtwellenleiters und zum anderen in einen Nebenpeak von NAD(P)H.

Abb. 8-3 b-d und Abb. 8-4 b-d zeigen in 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren die Veränderungen in einem Zeitintervall von 1,6 h während des Durchlaufens eines Zellzyklus. Die mit dem F-4500 aufgenommenen Spektren (Abb. 8-3 b-d) sind gleich skaliert, während die mit dem BioView aufgenommenen Spektren (Abb. 8-4 b-d) wegen wesentlich intensiverer Veränderungen unterschiedlich skaliert wurden. In den ersten 1,6 h (von 69,6 h bis 71,2 h) detektiert das F-4500 vor allem einen Anstieg der RFI ("Proteine"), während der BioView zusätzlich und hauptsächlich einen Anstieg der RFI ("NAD(P)H") anzeigt, der auch im F-4500-Spektrum sichtbar ist. Die RFI ("Flavine 1") nimmt im BioView-Spektrum ab, im F-4500-Spektrum dagegen leicht zu. In den folgenden 1,6 h (von 71,2 h bis 72,8 h) steigt bei beiden Fluorometern vor allem die RFI ("NAD(P)H"), daneben wesentlich schwächer auch die RFI ("Proteine", "Flavine 1", "Flavine 2" und "Bereich 6") an (Abb. 8-3 c und Abb. 8-4 c). Die Veränderungen der RFI in den folgenden 1,6 h (von 72,8 h bis 74,4 h) heben die Veränderungen in den vor-

herigen 3,2 h wieder auf, so daß das 2D-Fluoreszenzspektrum nach 74,4 h dem nach 69,6 h entspricht.

Tabelle 8.3: Auswahl von Wellenlängenpaaren in den Bereichen aus Abb. 8-3 und Abb. 8-4

Fluoreszenzbereich	1	2	3	4	5	6	7	8
RFI-Maximum Ex / Em [nm] F-4500	290/330	330/390	330/440	350/520	480/530	250/390	330/330	370/370
RFI-Maximum Ex / Em [nm] BioView	290/350	-	370/450	370/520	450/530	290/450	-	-
zugeordnetes biogenes Fluorophor	Trp	Pyr	NADH NADPH	FMN FAD	FMN FAD	-	-	-
Fluoreszenzmaxima Ex / Em [nm] aus Tabelle 2.2 (Literaturwerte)	290/350	325/390	340/460	365/520	450/530	-	-	-
Bereich Exzitation F-4500 [nm]	280-310	320-340	320-370	330-360	450-490	250-260	310-330	340-370
Bereich Emission F-4500 [nm]	330-370	380-400	420-470	500-530	510-560	370-400	300-330	340-370
Bereich Exzitation BioView [nm]	290-310	-	350-390	350-390	430-490	290	-	-
Bereich Emission BioView [nm]	310-390	-	410-490	510-570	490-570	410-490	-	-
Bereichsbezeichnung	"Proteine"	"Pyridoxin"	"NAD(P)H"	"Flavine 2"	"Flavine 1"	"Bereich 6"	"Streulicht 1"	"Streulicht 2"

### 8.3.2 Zellzyklusanalyse über viele Oszillationen mit dem BioView

In einem Zeitraum von etwa 83 h der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur werden in Abb. 8-5 Veränderungen verschiedener Prozeßvariablen den mit dem BioView aufgenommenen RFI-Verläufen in den Bereichen aus Tabelle 8.3 gegenübergestellt.

Die Gleichmäßigkeit der Oszillationen wird an drei Stellen unterbrochen. Zwischen 76 h und 83 h sind die Oszillationen ohne äußeren Einfluß ausgeblieben. Nach 94,2 h wurde eine Glucoselösung (7,5 g gelöst in 20 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, Endkonzentration im Reaktor 5 g/L) steril injiziert, nach 122 h reines Ethanol (Endkonzentration im Reaktor 5 g/L).

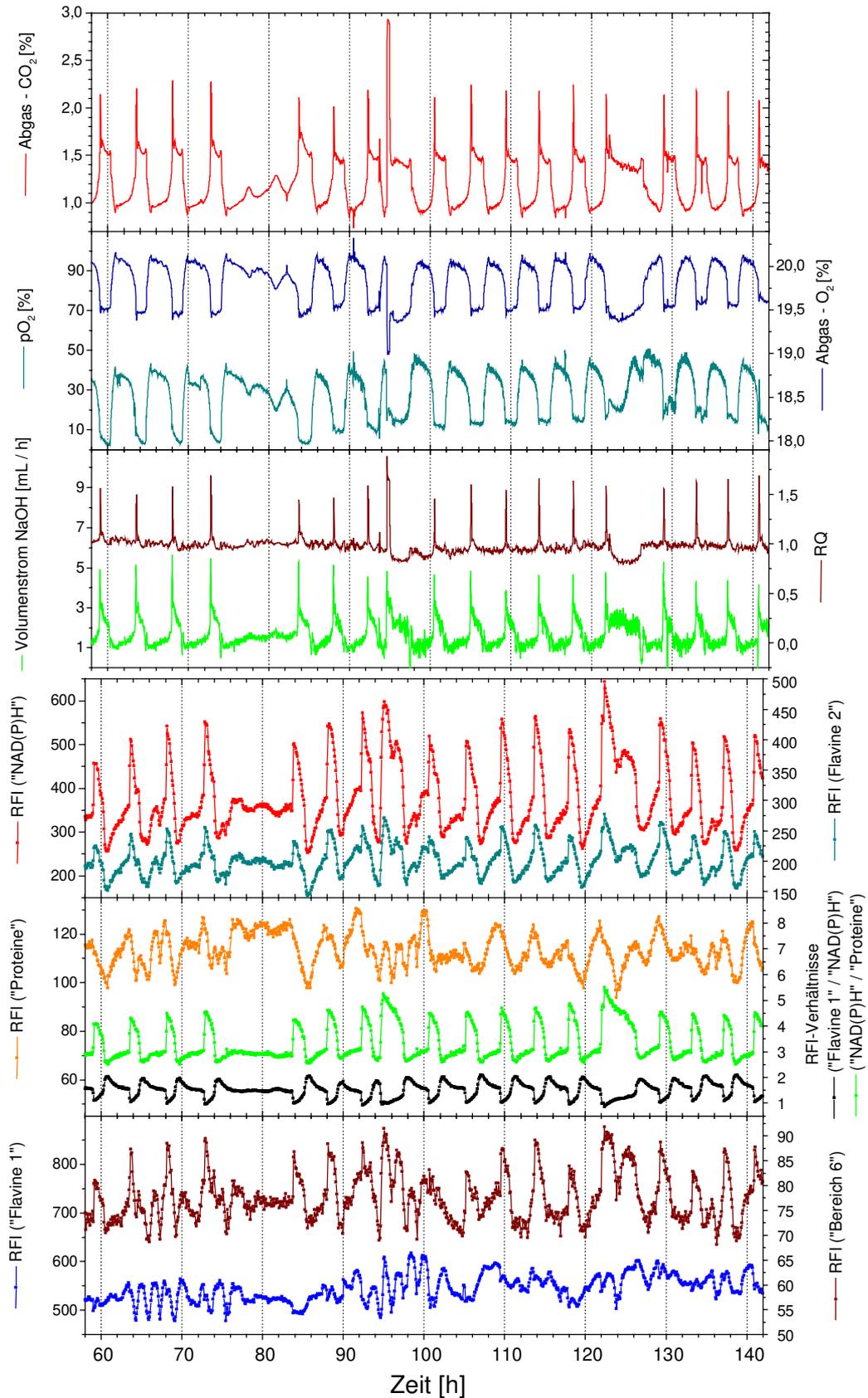


Abb. 8-5: Verläufe des Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalts im Abgas, des Gelöstsauerstoffgehalts, des RQ, des Volumenstroms NaOH, der mit dem BioView aufgenommenen RFI in den Bereichen aus Tabelle 8.3 und des RFI-Verhältnisses im Zeitraum von 83 h einer synchronen *S. cerevisiae*-Kultur

Im Bereich gleichmäßiger Oszillation fallen mit steil ansteigendem Kohlendioxidgehalt im Abgas (Abgas-CO<sub>2</sub>-Gehalt) der Gelöstsauerstoffgehalt (pO<sub>2</sub>) und der Sauerstoffgehalt im Abgas (Abgas-O<sub>2</sub>-Gehalt) steil ab. Der Respirationsquotient (RQ) steigt zu diesem Zeitpunkt kurzfristig über 1,5 an, bleibt sonst weitgehend konstant etwas unterhalb 1,0. Auch der Volumenstrom NaOH, die zeitliche Ableitung der Laugezugabe, steigt kurzfristig steil an. Im Unterschied zum RQ sinkt er nicht sofort wieder auf sein unteres Niveau von 0,0 ab, sondern fällt sofort auf die Hälfte des Maximumwertes und dann langsam ab, solange der CO<sub>2</sub>-Gehalt erhöht ist. Auch dieser fällt sofort auf etwa die Hälfte des Maximums ab, bleibt annähernd auf diesem Niveau und fällt dann nach kurzem, geringem Anstieg steil ab. Gegenläufig dazu steigen pO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>-Gehalt steil an.

Die RFI ("NAD(P)H") durchläuft zum Zeitpunkt des Abgas-CO<sub>2</sub>-Maximums auch ihr spitzes Maximum, fällt anschließend annähernd linear ab, bis der Abgas-CO<sub>2</sub>-Gehalt auf sein Minimum abgefallen ist und steigt dann steiler als dieser an. Parallel zur RFI ("NAD(P)H") verläuft die RFI ("Flavine 2"). Gegenläufig dazu ist der Verlauf des RFI-Verhältnisses ("Flavine 1" / "NAD(P)H"). Das RFI-Verhältnis ("NAD(P)H" / "Proteine") bleibt in der Zeit nach dem ausgeprägten Abfall des Abgas-CO<sub>2</sub> bis zu seinem steilen Anstieg annähernd konstant auf 2,8. Im folgenden Anstieg und Abfall verläuft es parallel zur RFI ("NAD(P)H"). Die RFI ("Proteine", "Flavine 1", "Bereich 6") streuen stärker als in die übrigen RFI. Die Verläufe wurden nicht zeitlich gemittelt. In der Bereichsmittelung wurden RFI von Null oder oberhalb des Meßbereiches nicht erfaßt. Im Verlauf der RFI ("Proteine") ist trotz einiger Schwankungen ein „Sägezahn“-Verlauf auszumachen, der sein Maximum bzw. Minimum zum Zeitpunkt des Abgas-CO<sub>2</sub>-Maximums bzw. Abgas-CO<sub>2</sub>-Minimums aufweist. Anstieg und Abfall sind im Unterschied zum Verlauf des Abgas-CO<sub>2</sub> linear. Ähnlich, jedoch stärker gestreut und überlagert, verläuft die RFI ("Bereich 6"). Oszillationen sind im Verlauf der RFI ("Flavine 1") nicht zu erkennen. Das Maximum liegt häufig im Abgas-CO<sub>2</sub>-Minimum (deutlich sichtbar nach 70 h, 92 h, 99 h, 102 h, 107 h und 139 h).

Zwischen 76 h und 83 h sind die Oszillationen in den Verläufen des Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalts im Abgas, des Gelöstsauerstoffgehalts, der RFI ("Proteine") und der RFI ("NAD(P)H") nur angedeutet, während sie am RQ, an dem Volumenstrom NaOH und in den RFI-Verhältnissen gar nicht zu erkennen sind. Die RFI ("NAD(P)H") bleibt in diesem Zeitraum auf dem Niveau vor Beginn des steilen Abgas-CO<sub>2</sub>-Anstiegs. Die Proteinfluoreszenz bleibt in diesem Zeitraum auf ihrem Höchststand.

Der Glucose-Puls am Abgas-CO<sub>2</sub>-Minimum nach 94,2 h bewirkt einen sofortigen steilen Abgas-CO<sub>2</sub>-Anstieg von 0,8 % auf fast 3,0 % statt der sonst üblichen 2,2 %. Etwas länger als während der Oszillationen bleibt der Abgas-CO<sub>2</sub> auf diesem Maximum, um dann auf das Plateau von 1,4 % abzufallen, welches bei den Oszillationen nach der Störung auch erreicht wird. Vor der Störung lag dieses Plateau oberhalb 1,5 %. Die Dauer dieses Plateaus ist wiederum länger als bei den Oszillationen. Wie schon bei den Oszillationen beschrieben, verlaufen die Abgas-O<sub>2</sub>- und die pO<sub>2</sub>-Kurve gegenläufig dazu. Im Gegensatz zum pO<sub>2</sub>, der auf dem Niveau der folgenden Oszillationen von über 10 % bleibt, sinkt die Abgas-O<sub>2</sub>-Kurve zum Zeitpunkt des Abgas-CO<sub>2</sub>-Maximums deutlich unterhalb ihres Oszillations-Minimums ab.

Auch das RQ-Maximum liegt höher als sonst. Der RQ bleibt länger auf hohem Niveau und sinkt parallel zum Abfallen des Abgas-CO<sub>2</sub> auf das Plateau auf 0,8 ab. Der Volumenstrom NaOH steigt nicht höher als sonst an, fällt jedoch langsamer ab. Im Verlauf der RFI ("NAD(P)H", "Flavine 1", "Flavine 2", "Bereich 6" und "Proteine") treten in dieser verlängerten Periode zwei statt des sonst üblichen einen Maximums auf. Das erste Maximum ist jeweils deutlich stärker ausgeprägt, nur im Verlauf der RFI ("Proteine") sind die Maxima gleich hoch. Die RFI-Verhältnisse zeigen den von den normalen Oszillationen bekannten Verlauf, nur etwas ausgeprägter und zeitlich verlängert.

Durch den Ethanol-Puls kurz nach dem Erreichen des Abgas-CO<sub>2</sub>-Plateaus nach 122 h steigt die Abgas-CO<sub>2</sub>-Kurve kurzfristig etwas an, bleibt dann mit leichtem Abfall etwa doppelt so lange wie sonst (0,4 h statt 0,2 h) auf dem üblichen Plateau bei 1,4 %, steigt danach ausgeprägter an und fällt langsamer auf das übliche Abgas-CO<sub>2</sub>-Minimum ab. Im Unterschied zum Glucose-Puls fällt die Abgas-O<sub>2</sub>-Kurve nicht deutlich unterhalb des sonst üblichen Minimums ab. Auffällig ist ein pO<sub>2</sub>-Anstieg noch zu der Zeit des Abgas-CO<sub>2</sub>-Plateaus. Der RQ fällt wie auch beim Glucose-Puls auf 0,8 ab, ohne jedoch vorher deutlich anzusteigen. Auch der Volumenstrom NaOH erreicht nach Ethanolzugabe nicht sein Maximum, sondern bleibt längere Zeit auf mittlerem Niveau. Wie beim Glucose-Puls durchlaufen die RFI ("NAD(P)H", "Flavine 1", "Flavine 2", "Bereich 6" und "Proteine") im Abgas-CO<sub>2</sub>-Plateau ein weiteres, weniger intensives Maximum.

### 8.3.3 Analytik eines einzelnen Zellzyklus mit dem F-4500

Abb. 8-6 erlaubt die nähere Betrachtung einer einzelnen Periode der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur. RIESEBERG bestimmte mit Hilfe der Durchflußcytometrie die mittlere Zellgröße und nach Ethanolfixierung durch Einsatz des Fluorophors SYTOX® Green, Molecular Probes, USA (Emissionsmaximum: 523 nm) den Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen [RIESEBERG, 1999]. Dieser ermöglicht eine Zuordnung der gezeigten Veränderungen zu den einzelnen Phasen im Zellzyklus.

Mit dem Verlauf der RFI ("NAD(P)H") vergleichbar, nur weniger stark ausgeprägt, sind die Verläufe der RFI ("Flavine 2") und der RFI ("Pyridoxin"), die deshalb im folgenden nicht weiter diskutiert werden. Die RI ("Streulicht 2") repräsentiert am besten die Veränderungen der RI ("Streulicht 1"), der RFI ("Bereich 6") und der RFI ("Proteine"). Das RFI-Verhältnis ("Flavine 1" / "NAD(P)H") verläuft insgesamt spiegelbildlich zur RFI ("NAD(P)H").

Eine Übersicht über die Veränderungen von Kultivierungsdaten aus Abb. 8-6 in Gegenüberstellung mit entsprechenden Fluoreszenz- und Streulichtveränderungen liefert Tabelle 8.4.

Tabelle 8.4: Veränderungen der Kultivierungsdaten, RFI und RI im Verlauf der Kultivierung

Kultivierungszeit (prägende Zellzyklusphase)	Veränderungen in den Kultivierungsdaten	Veränderungen in den Fluoreszenz- bzw. Streulichtbereichen
	69,8 h - 72,5 h (>65 % G <sub>0</sub> - und G <sub>1</sub> -Phase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Zunahme mittlere Zellgröße und Ethanolgehalt</li> <li>◆ leichte Zunahme Abgas-CO<sub>2</sub></li> <li>◆ leichte Abnahme Abgas-O<sub>2</sub></li> <li>◆ annähernd konstanter Verlauf OD<sub>offline</sub></li> </ul>
72,5 h - 72,7 h (G <sub>0</sub> - und G <sub>1</sub> -Phase, zunehmend S-Phase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Abnahme Ethanolgehalt, OD<sub>offline</sub>, Abgas-O<sub>2</sub> und mittlere Zellgröße</li> <li>◆ Zunahme Abgas-CO<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Abnahme RFI ("Flavine 1")</li> <li>◆ annähernd konstanter Verlauf RFI ("NAD(P)H" und "Streulicht 2")</li> </ul>
72,7 h - 72,9 h (25 % S-Phase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ steile Zunahme Abgas-CO<sub>2</sub> zu einem kurzzeitigen Maximum</li> <li>◆ steile Abnahme Abgas-O<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ sehr steile Zunahme RFI ("NAD(P)H") und RFI-Verhältnis ("NAD(P)H" / "Proteine")</li> </ul>
72,9 h - 73,8 h (G <sub>2</sub> - und M-Phase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ annähernd konstanter Verlauf Abgas-CO<sub>2</sub>, Abgas-O<sub>2</sub> und mittlere Zellgröße</li> <li>◆ Zunahme OD<sub>offline</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Abnahme RFI ("NAD(P)H") und RI ("Streulicht 2")</li> <li>◆ konstanter Verlauf RFI-Verhältnis ("NAD(P)H" / "Proteine")</li> </ul>
73,8 h - 74,2 h (zunehmend G <sub>0</sub> - und G <sub>1</sub> -Phase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ leichte Zunahme mit folgender steiler Abnahme Abgas-CO<sub>2</sub></li> <li>◆ leichte Zunahme mit folgender steiler Zunahme Abgas-O<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ steile Abnahme RFI ("NAD(P)H") und RFI-Verhältnis ("NAD(P)H" / "Proteine")</li> <li>◆ Zunahme RFI ("Flavine 1")</li> </ul>
74,2 h - 74,7 h (G <sub>0</sub> - und G <sub>1</sub> -Phase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Abnahme Abgas-CO<sub>2</sub></li> <li>◆ Zunahme Abgas-O<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ konstanter Verlauf RFI ("NAD(P)H") und RI ("Streulicht 2")</li> </ul>

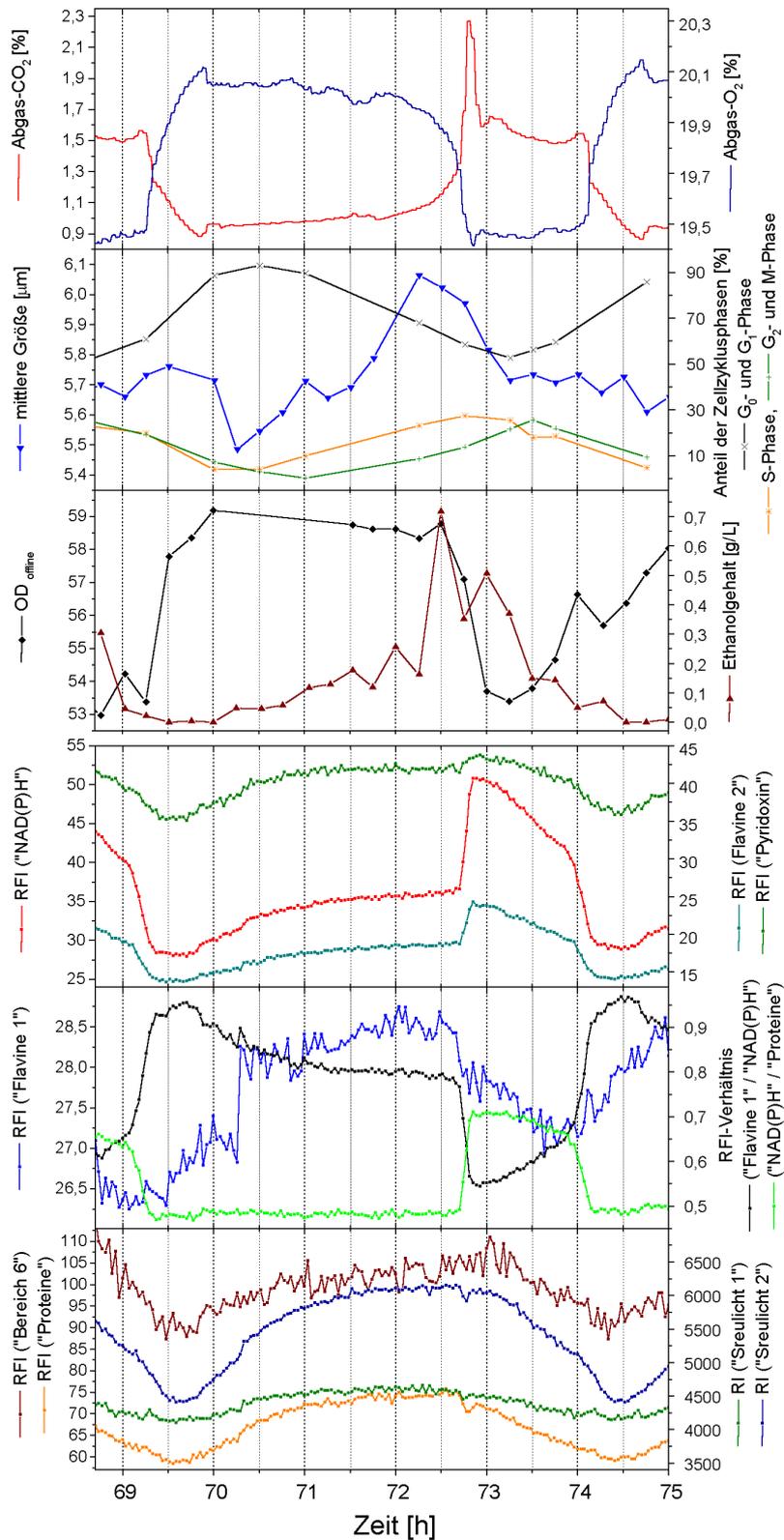


Abb. 8-6: Verläufe des Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalts im Abgas, der mittleren Zellgröße, des Anteils der Zellzyklusphasen, der OD<sub>offline</sub>, des Ethanolgehalts, der mit dem F-4500 aufgenommenen RFI in den Bereichen aus Tabelle 8.3 und der RFI-Verhältnisse im Zeitraum von 16,3 h im Verlauf einer Periode einer synchronen *S. cerevisiae*-Kultur

Aus Abb. 8-6 und Tabelle 8.4 geht hervor, daß vor allem Veränderungen in den Steigungen der RFI-Verläufe wichtigen Veränderungen in den Kultivierungsdaten entsprechen. Zur deutlicheren Illustration zeigt Abb. 8-7 den Verlauf der zeitlichen Ableitung des RFI-Verhältnisses ("Flavine 1" / "NAD(P)H") im Vergleich zum Abgas-CO<sub>2</sub>-Verlauf. Vom konstanten Verlauf um Null weicht die Steigung, abgesehen von kleinen Veränderungen, die sich auch im Abgas-CO<sub>2</sub>-Verlauf wiederfinden (z. B. nach 102,4 h, 107,3 h, 111,5 h, 116,9 h), vor allem zweimal je Periode ab. Deutlich negativ ist die Steigung in der S-Phase zum Zeitpunkt des Abgas-CO<sub>2</sub>-Maximums, deutlich positiv dagegen nach Beendigung der M-Phase, die durch die Abnahme des Abgas-CO<sub>2</sub>-Verlaufs auf sein Minimum dokumentiert wird. Beginn und Ende des erhöhten CO<sub>2</sub>-Gehalts werden somit sehr deutlich angezeigt. Abb. 8-7 zeigt außerdem, daß das RFI-Verhältnis ("Flavine 1" / "NAD(P)H") wesentlich weniger streut als der Verlauf der RFI ("NAD(P)H").

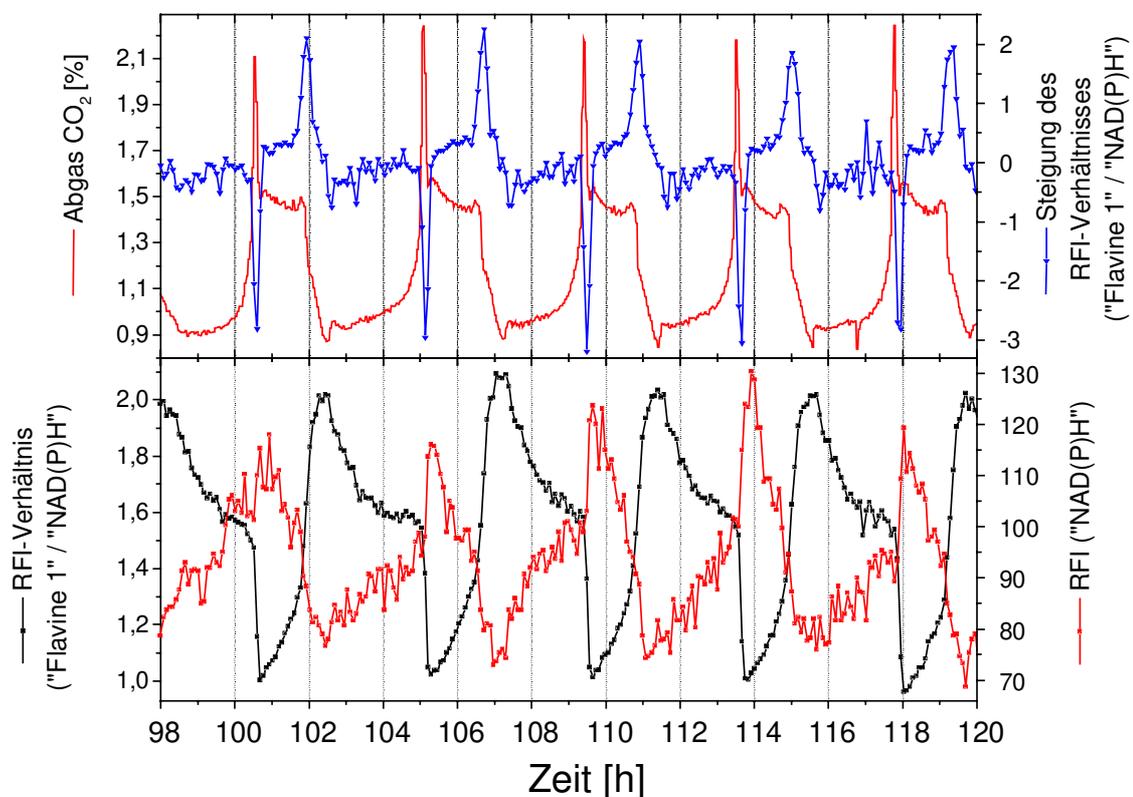


Abb. 8-7: Verläufe des Kohlendioxidgehalts im Abgas, der mit dem BioView aufgenommenen RFI ("NAD(P)H"), des RFI-Verhältnisses ("Flavine 1" / "NAD(P)H") und dessen zeitliche Ableitung

## 8.4 Diskussion

Bisher ist es lediglich mikroskopisch möglich, die morphologischen Merkmale einer einzelnen Zelle zu untersuchen. Synchrone Kulturen ermöglichen die Analytik einer Vielzahl von Zellen im gleichen Stadium des Zellzyklus. Da sich im Verlauf von Oszillationen Änderungen in kurzer Zeit ereignen können, ist eine schnelle und empfindliche Online-Analytik notwendig.

Wie gezeigt werden konnte, ist die dargestellte Methode der 2D-Fluoreszenzspektroskopie schnell und empfindlich genug, um direkt im Kulturmedium, ohne den Stoffwechsel der synchron wachsenden Hefezellen zu beeinträchtigen, relevante Veränderungen im Verlauf des Zellzyklus von *S. cerevisiae* zu detektieren.

Die Veränderungen im Bereich "NAD(P)H" sind so hoch, daß die benachbarten Bereiche "Flavine 2" und "Pyridoxin" durch Überlagerung parallel dazu verlaufen und keine zusätzlichen Informationen liefern (Abb. 8-5 und Abb. 8-6). In Abb. 8-6 sind die Verläufe der RFI ("Bereich 6") und RFI ("Proteine") und die Verläufe der RI ("Streulicht 1") und RI ("Streulicht 2") vergleichbar, da alle hauptsächlich vom Zellwachstum abhängig sind und sich auch gut mit dem Verlauf der mittleren Zellgröße vergleichen lassen. Am besten sichtbar werden die Veränderungen bei RI ("Streulicht 2"), dessen Verlauf nur wenig streut.

### 8.4.1 Zellzyklus

#### G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase

In der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase wächst die einzelne Zelle an, was durch den Anstieg der mittleren Zellgröße in Abb. 8-6 dokumentiert wird. Eine Erklärung dafür, daß die OD<sub>offline</sub> auf hohem Niveau leicht abfällt, könnte sein, daß zu dieser Zeit keine Zellteilung stattfindet, Zellen ausgewaschen werden und nur durch das Wachstum der einzelnen Zellen die OD<sub>offline</sub> auf dem hohen Niveau gehalten werden kann. In Übereinstimmung mit dieser Erklärung fällt die OD<sub>offline</sub> ab, sobald die mittlere Zellgröße nicht weiter ansteigt. Mit dem Anwachsen der einzelnen Zellen nehmen auch im Zellinneren die Konzentrationen der mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie detektierbaren biogenen Fluorophore zu, was sich in einem Anstieg der RFI in allen betrachteten Bereichen auswirkt. Die Erhöhung der Zellgröße hat auch eine stärkere Streuung des Lichtes zur Folge, weshalb die Streulichtintensitäten ebenfalls ansteigen. Der Verlauf des RFI-Verhältnisses ("NAD(P)H" / "Proteine") auf konstantem Niveau bekräftigt, daß sich auf beide Bereiche lediglich das Zellwachstum und keine metabolische Veränderung auswirkt, die sich in der Kulturfluoreszenz vom NAD(P)H deutlicher bemerkbar macht als in dem unspezifischen Proteinsignal. In der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase wird Glucose oxidativ metabolisiert [SATROUTDINOV *et al.*, 1992]. Ein RQ zwischen 0,5 und 1 deutet auf oxidatives Stoffwechselverhalten hin [WOEHRER und ROEHR, 1981]. In der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase war der RQ meist unterhalb von 1,0 (Abb. 8-5). Die Tatsache, daß trotzdem Ethanol produziert wurde und der Anteil von Zellen in der S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase auch bei vorwiegender G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase relativ hoch war (Abb. 8-6), läßt darauf schließen, daß die Kultur nicht vollständig synchron wuchs.

### S- und M-Phase

Mit fallender mittlerer Zellgröße nehmen beim Übergang in die S-Phase die das Zellwachstum anzeigenden Verläufe der  $OD_{\text{offline}}$  und der RI im Bereich "Streulicht 2" ab. In Übereinstimmung damit haben DUBOC *et al.* bei einer Verdünnungsrate von  $0,10 \text{ h}^{-1}$  eine Wachstumsrate in der S-Phase berechnet, die nur etwa halb so groß wie in  $G_2$ -, M- und  $G_1$ -Phase war [DUBOC *et al.*, 1996]. Die einzelnen Zellen sind groß genug, der Ethanolgehalt ist auf sein Maximum angestiegen, es erfolgt der Übergang in die S-Phase. Innerhalb der S-Phase ist die Sprossungsaktivität gesteigert [DUBOC *et al.*, 1996]. Die erhöhte  $\text{CO}_2$ -Produktion zu Beginn der S-Phase resultiert aus der DNA-Synthese bei Initiation der S-Phase [MÜNCH, 1992]. Zu diesem Zeitpunkt steigt die RFI ("NAD(P)H") steil an. Noch deutlicher wird dieser Zeitpunkt durch den Anstieg des in der  $G_0$ - und  $G_1$ -Phase konstanten Verlaufes des RFI-Verhältnisses ("NAD(P)H" / "Proteine") in Abb. 8-6 und durch den negativen Peak der zeitlichen Ableitung des RFI-Verhältnisses ("Flavine 1" / "NAD(P)H") in Abb. 8-7 gekennzeichnet. Im RFI-Verhältniss ("NAD(P)H" / "Proteine") wirkt sich der durch die Stoffwechselveränderung ausgelöste Anteil der NAD(P)H-Kulturfluoreszenz aus. Der vom Zellwachstum ausgelöste Anteil wird durch Division durch die Protein-Kulturfluoreszenz entfernt. In der S-Phase wird Glucose oxido-reduktiv metabolisiert [SATROUTDINOV *et al.*, 1992]. In Abb. 8-5 steigt der RQ im Abgas- $\text{CO}_2$ -Maximum auf über 1,5 an, was auf einen oxido-reduktiven Stoffwechsel hindeutet [WOEHRER und ROEHR, 1981]. Mit dem Abfallen des Abgas- $\text{CO}_2$ -Gehalts auf das Plateau fällt auch der RQ schnell wieder ab, bleibt danach jedoch noch einige Zeit oberhalb von 1 (Abb. 8-5), wodurch auf einen oxido-reduktiven Stoffwechsel auch während der  $G_2$ - und M-Phase geschlossen werden kann.

Nach Initiierung der Sprossung findet diese, auch bei folgendem Substrat- oder Sauerstoffmangel, unter Mobilisierung des reduktiven katabolen Stoffwechsels in jedem Falle statt [SONNLEITNER, 1991]. Die Energie wird nicht für das Wachstum, sondern für die überlebenswichtige Zellteilung gebraucht. Kurz vor Ende des oxidativen Glucoseverbrauchs, der Sprossungsinitiation, werden auch zuvor akkumulierte intrazelluläre Speicherstoffe, insbesondere Trehalose und Glycogen, oxidiert [HEINZLE *et al.*, 1982]. Reservekohlenstoffe sind in der S-Phase beteiligt, um die für die Sprossung notwendige Energie bereitzustellen [BEUSE, 1998]. Der dadurch gesteigerte Verbrauch an Sauerstoff macht sich im geringen Gelöstsauerstoffgehalt bemerkbar (Abb. 8-5). Der erhöhte Stoffwechselfluß von Reservekohlenstoffen bei begrenzter Atmungskapazität resultiert in der Bildung von Pyruvat.

Überschüssige Reduktionsäquivalente werden zu Ethanol abgebaut [SONNLEITNER und KÄPPELI, 1986]. Die dadurch entstehenden Säuren bewirken eine Zugabe von NaOH, um den pH-Wert konstant zu halten. Der Volumenstrom NaOH steigt zu Beginn der S-Phase kurzzeitig steil an und bleibt solange erhöht, bis der Abgas- $\text{CO}_2$ -Gehalt vom Plateau abfällt, Ethanol verbraucht ist und der oxido-reduktive Stoffwechsel wieder in den rein oxidativen übergeht (Abb. 8-5).

Der Verlauf der RFI ("Flavine 1") zeigt in der S-,  $G_2$ - und M-Phase einen gegenläufigen Verlauf zur RFI ("NAD(P)H"). Eine Erklärung hierfür wurde bereits in Kap. 4 diskutiert.

Zu Beginn der Zellzyklusforschung wurde die Vermehrung von Zellen mit einem kontinuierlich verlaufenden Uhrwerk verglichen, später setzte sich die Erkenntnis durch, daß erst nach Abschluß eines Vorgangs der nächste Teil des Zyklus durchlaufen wird. Diese beiden Sichtweisen werden auch als Uhrwerk- und Domino-Theorie (Abb. 8-8 a) bezeichnet [MURRAY und KIRSCHNER, 1989]. Jüngste Experimente haben gezeigt, daß der Zellzyklus durch ein Zellzykluskontrollsystem kontrolliert wird. Danach funktioniert die Steuerung des Zellzyklus ähnlich einer modernen Waschmaschine (Abb. 8-8 b). Ein zentrales Kontrollelement prüft und löst jeden Vorgang der Reihe nach in einer bestimmten Abfolge aus. Im Zellzyklus wird dieses Kontrollelement durch Bremsen reguliert, die den Zyklus an bestimmten Restriktionspunkten anhalten können. [ALBERTS, 1997]. Zwei Restriktionspunkte werden in Abb. 8.1 gezeigt. Wird ein Restriktionspunkt durchlaufen, hat dies eine Stoffwechselumstellung zur Folge. Die in Tabelle 8.4 gezeigten sprunghaften Veränderungen in den Kultivierungsdaten und zu gleichen Zeitpunkten auch in den Fluoreszenz- und Streulichtbereichen könnten mit Restriktionspunkten in Zusammenhang gebracht werden. Dies wäre dann auch eine Erklärung für den Verlauf des RFI-Verhältnisses ("Flavine 1" / "NAD(P)H") in Abb. 8-6. Vermutlich zeigen die abrupten Veränderungen der Steigung Restriktionspunkte im Zellzyklus von *S. cerevisiae* an.

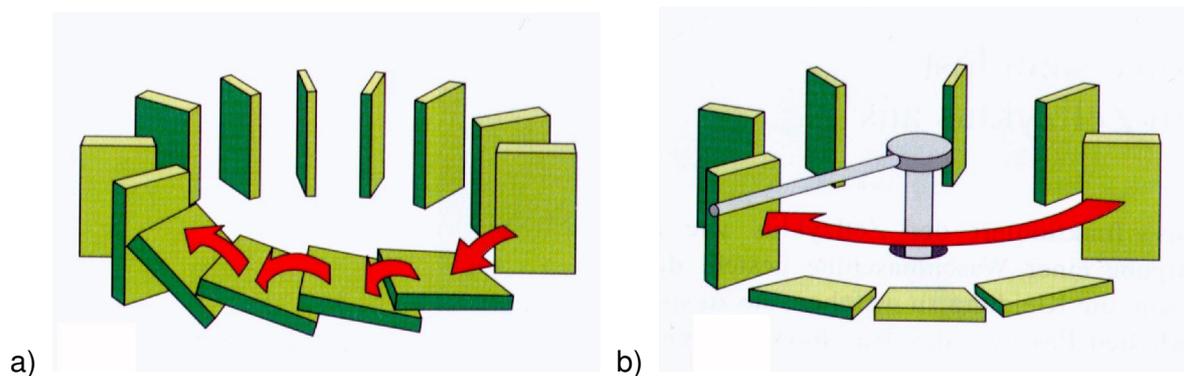


Abb. 8-8: Kontrolle des Zellzyklus a) Domino-Theorie, b) Waschmaschinen-Theorie [ALBERTS, 1997]

Vermutlich ist der Zellzyklus im Verlauf der Störung (76 h - 83 h in Abb. 8-5) an einem Restriktionspunkt angehalten worden.

#### 8.4.2 Substratpulse

Durch Glucose- und Ethanol-Pulse können synchrone Sprossungsvorgänge induziert werden [BEUSE, 1998], daneben sind auch Acetat, Pyruvat oder Glycerin als Induktor einer erzwungenen Oszillation bekannt [MÜNCH *et al.*, 1992]. Während die Induktion durch den Glucose-Puls gelang, wurde durch den Ethanol-Puls kein vergleichbar steiler Abgas-CO<sub>2</sub>-Anstieg ausgelöst (Abb. 8-5). Vermutlich wurde durch den Glucose-Puls ein Restriktionspunkt übersprungen, während der Ethanol-Puls Bremsen aktiviert hat, die den Zellzyklus an einem Restriktionspunkt angehalten haben.

Durch die Zugabe von Glucose nach dem Ende der Zellteilung, das durch das Abgas-CO<sub>2</sub>-Minimum festgelegt wurde, wurde die G1-Phase auf ein Minimum verkürzt und sofort eine neue S-Phase ausgelöst. Dies wird sichtbar durch den erhöhten und verlängerten steilen Anstieg des Abgas-CO<sub>2</sub>-Gehalts. Parallel dazu steigt auch der RQ an, ebenfalls höher (auf

1,8) und für einen längeren Zeitraum als bei den normalen Oszillationen, was auf einen intensiven oxido-reduktiven Stoffwechsel hindeutet. Anschließend fällt der RQ tiefer als sonst auf unterhalb von 0,8 ab. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die intensive Verstoffwechslung von Ethanol, das im vorher ausgeprägten oxido-reduktiven Stoffwechsel gebildet wurde. Durch den Ethanol-Puls wird der RQ nicht wesentlich erhöht. Er fällt anschließend noch tiefer als durch den Glucose-Puls auf 0,7 ab. Die Zeit, in der der Abgas-CO<sub>2</sub>-Gehalt sich auf dem Plateau bei 1,5 % befindet, wurde durch die Ethanolzugabe gegenüber den normalen Oszillationen etwa verdoppelt (Abb. 8-5). Auch in den normalen Oszillationen wird das Plateau erst nach verbrauchtem Ethanol verlassen (Abb. 8-6).

Ethanol setzt als energiearme Substratquelle die zur Sprossung und Zellteilung nötige Zellgröße herab. Eine Anwesenheit von Ethanol im Medium induziert mehr Zellen als üblich zur Sprossung [MARTEGANI *et al.*, 1990; PORRO *et al.*, 1988].

Ethanol wird unter anderem als Ursache der spontanen Synchronisation des Wachstums von *S. cerevisiae* angesehen und sorgt als Trigger für Stabilität der Oszillationen [PARULEKAR *et al.*, 1986; CHEN und McDONALD, 1990].

### 8.4.3 Ausblick

Durch den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wird ein Einblick direkt in die Zelle möglich, der viele neue Erkenntnisse für das genauere Verständnis der Theorie von synchronen *S. cerevisiae*-Kulturen ermöglicht. Auch für die Erstellung von mathematischen Modellen zur vollständigen Simulation der Oszillationen ist als Grundlage eine genaue Analytik notwendig.

Die Analytik von Synchronkulturen von *S. cerevisiae* könnte durch Übertragung auf humane Zellen neue Erkenntnisse über die Bildung von Tumoren und über Kontrollmechanismen des Zellzyklus liefern.

Mit den Informationen, die die 2D-Fluoreszenzspektroskopie liefert, könnte eine geregelte Zufütterung von Glucose oder anderen Kohlenstoffquellen gesteuert werden, die sich an bestimmten Phasen des Zellzyklus orientiert.

Mit Hilfe von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen könnte die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur In-vivo-Anfärbung von Sprossungsnarben eingesetzt werden, um neue Erkenntnisse über Populationsverteilungen und Wachstumsmodi im Verlauf von synchronen Kulturen zu erhalten.

STRÄSSLE *et al.* schlagen vor, synchrone Kulturen von *S. cerevisiae* als biologisches Testsystem für Bioreaktoren zu verwenden, da die Ansprüche an die Kultivierungsumgebung sehr hoch sind [STRÄSSLE *et al.*, 1989]. Im 2-L-Edelstahl-Bioreaktor (Kap. 3) gelang die Induktion im Unterschied zum 1,5-L-Edelstahl-Bioreaktor nicht, was dafür spricht, diesen noch weiter zu verbessern und anschließend einem erneuten biologischen Test durch synchrone Kulturen von *S. cerevisiae* zu unterziehen.

## 9 Steigerung des Informationsgehaltes der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung durch den Zusatz externer Fluorophore

### 9.1 Anforderungen an externe Fluorophore zur erweiterten Bioprozeßüberwachung

Außerhalb der Bereiche biogener Fluorophore ist innerhalb der 2D-Matrix noch viel freier Raum (blaues Gebiet im Fluoreszenzbereich von Abb. 9-1), der sich für den Einsatz externer Fluorophore anbietet. Diese sollen zusätzlich zum Informationsgehalt, den die intrinsischen Fluorophore liefern, die Detektion der physikalischen (z. B. Temperatur) und chemischen Umgebung (z. B. pH-Wert, Gelöstsauerstoffgehalt) und des biologischen Zustands der Zellen (z. B. Proteingehalt, Enzymaktivität) ermöglichen. Dabei sollte jedoch der Bioprozeß nicht beeinflußt werden.

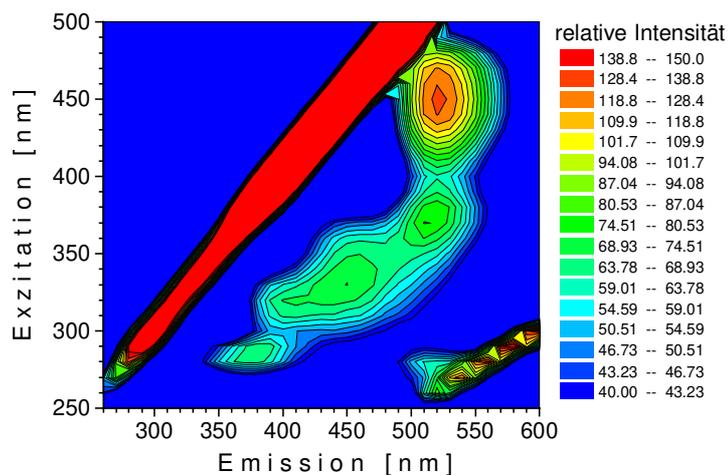


Abb. 9-1: 2D-Fluoreszenzspektrum der in Mikroorganismen auftretenden internen Fluorophore Tryptophan, Riboflavin, Pyridoxin und NADH (Konzentrationen siehe Abb. 2-1)

Hohe Anforderungen werden an extern zugesetzte Fluorophore zur Erhöhung des Informationsgehaltes von 2D-Fluoreszenzspektren zur Bioprozeßbeobachtung gestellt (Tabelle 9.1). Zur Detektion des Gelöstsauerstoffgehaltes und des pH-Wertes wurden in Zusammenarbeit mit STÄRK mehrere Fluorophore getestet, inwieweit sie diesen Voraussetzungen entsprechen. Sämtliche untersuchten Fluorophore zeigten im Toxizitätstest in den verwendeten Konzentrationsbereichen keinen meßbaren Einfluß auf das Wachstum von *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* und erfüllen damit eine wichtige Voraussetzung zum Fluorophorzusatz [STÄRK, 1997].

Tabelle 9.1: Voraussetzungen für zugesetzte Fluorophore in der Bioprozeßüberwachung

▪ spezifisch nur für die gewünschte Einflußgröße
▪ keine Beeinflussung vorhandener Fluorophore
▪ hohe Löslichkeit in der Fermentationsbrühe
▪ stabil über den Kultivierungszeitraum
▪ vernachlässigbare Störung des Bioprozesses
▪ hohe Quantenausbeute (bedeutet geringe Konzentration des zugesetzten Fluorophors)
▪ keine Beeinflussung der Produktaufarbeitung
▪ geringe Kosten

## 9.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierungsbedingungen für die *E.coli*- und die Hefekultivierung, die zur Untersuchung von externem Fluorophorzusatz durchgeführt wurden, werden in Tabelle 9.2 aufgelistet.

Tabelle 9.2: Kultivierungsbedingungen

♦ <b>Organismus</b>	<i>Escherichia coli</i> 5K (pHM12)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H620
♦ <b>Betriebsweise</b>	Batch	
♦ <b>Kultivierungsanlage</b>	Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen)	
♦ <b>Arbeitsvolumen</b>	2 L	
♦ <b>Meßdatenerfassung</b>	Micro-MFCS (B. Braun Biotech International, Melsungen)	
♦ <b>Medium</b> (Kap. 14)	DHE-Medium	Schatzmann-Medium
♦ <b>Temperatur</b>	27°C	30°C
♦ <b>pH</b>	nicht reguliert	nicht reguliert
♦ <b>Begasungsrate</b>	0,5 vvm (1,0 L/min)	0,6 vvm (1,2 L/min)
♦ <b>Rührerdrehzahl</b>	700 UpM	

Die Online-Messungen der Kulturfluoreszenz wurden mit dem F-4500 (Kap. 3) im Bypass in der Durchflußzelle durchgeführt, dessen Einstellungen in Tabelle 5.23 angegeben werden.

Tabelle 9.3: Spektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	250-550 nm
• Emissionswellenlängenbereich	280-650 nm
• Schrittweite der Exzitations- / Emissionswellenlänge	10 nm / 10 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	10 nm / 20 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	30000 nm/s
• Aufnahme-Intervall	5 min

## 9.3 Sauerstoffabhängigkeit ausgewählter Fluorophore

### 9.3.1 Beispiele sauerstoffabhängiger Fluorophore

In Tabelle 9.4 wird eine Übersicht über untersuchte externe Fluorophore gegeben, die sich zur Detektion des Sauerstoffgehalts eignen [STÄRK, 1997].

Tabelle 9.4: Übersicht über ausgewählte sauerstoffabhängige Fluorophore

	PBA	[Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> ]	HNS
Vollständiger Name	Pyrenbuttersäure	Tris(2,2-bipyridin)-Ru(II)-chlorid	3-Hydroxy-2-naphthoesäure
Farbe, Beschaffenheit	weißes Pulver	rötliches Salz	weißes Pulver
Löslichkeit	kaum wasserlöslich	wasserlöslich	wasserlöslich
Farbstoffklasse	Alkylpyren	Ruthenium(II)-Komplexe	Naphtalinsäure-Derivat
Abhängig von	Sauerstoffgehalt pH-Wert (4,5 bis 6,5)	Sauerstoffgehalt	Sauerstoffgehalt Anstieg bei Temperaturzunahme
Fluoreszenzmaximum Ex / Em [nm]	340 / 390	470 / 590	350 / 510
Geeigneter pH-Bereich	pH 7 bis 10	keine Einschränkung	pH 4
Quantenkonzentration	hoch	relativ gering	gering
Farbstoffkonzentration	10 <sup>-8</sup> M	2,5 · 10 <sup>-5</sup> M	5 · 10 <sup>-6</sup> M
Bemerkungen	keine Fluoreszenzlöschung	Fluoreszenz deutlich außerhalb des Bereiches biogener Fluorophore  bewirkt Fluoreszenz- löschung im UV-Bereich  hohe Sauerstoffsensitivität  völlig pH-unabhängig	geringe pO <sub>2</sub> Sensitivität  Fluoreszenz nah beim riboflavinabhängigen Bereich

Abb. 9-2 a zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum einer wäßrigen 10<sup>-8</sup> molaren Lösung von Pyrenbuttersäure (PBA), aufgenommen in der Makroküvette. Das Fluoreszenzmaximum liegt mit Ex 340 / Em 380 nm relativ dicht am Streulicht. Außerdem ist noch ein kleinerer zweiter Peak bei Ex 270 / Em 380 nm zu erkennen. Die Fluoreszenz von PBA liegt in der 2D-Matrix außerhalb des Bereiches biogener Fluorophore (Abb. 9-1). Der Zusammenhang der Fluoreszenzintensität bei Ex 340 / Em 380 gegen den Gelöstsauerstoffgehalt in 0,1 M KPP-Puffer (10,71 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) wird in Abb. 9-2 b dargestellt.

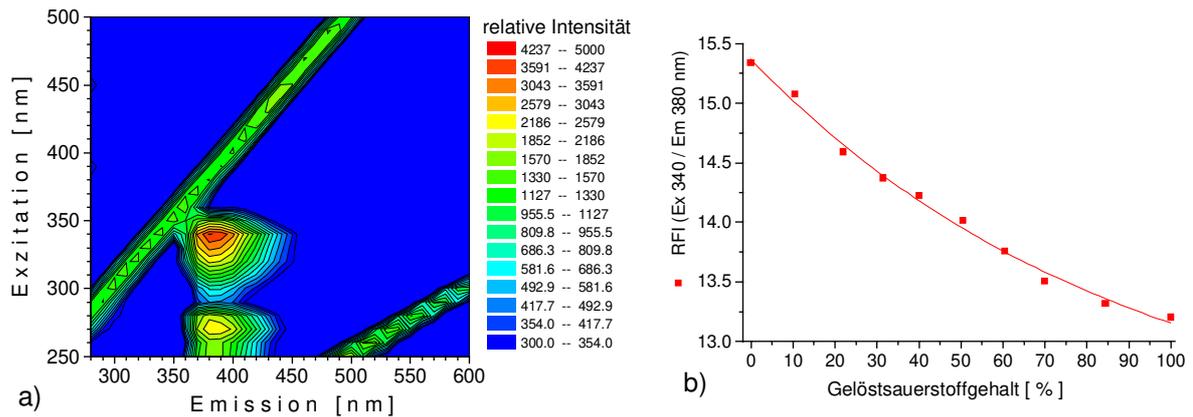


Abb. 9-2: a) 2-D-Fluoreszenzspektrum von  $10^{-8}$  M PBA, b) Auftragung der RFI von PBA gegen den Gelöstsauerstoffgehalt

Angeregt im weiten Bereich von 300 nm bis 520 nm fluoresziert der Komplex Tris(2,2-bipyridin)-Ru(II)-chlorid  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$  in wässriger Lösung bei 590 nm (Abb. 9-3). Dieser Emissionsbereich liegt bei höheren Wellenlängen als der biogene Fluoreszenzbereich. Die Absorption von emittiertem Fluoreszenzlicht anderer Fluorophore führt jedoch zu störender Fluoreszenzlöschung (Quencheffekten). Die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$  gegenüber dem Sauerstoffgehalt ist in Abb. 9-3 b dargestellt.

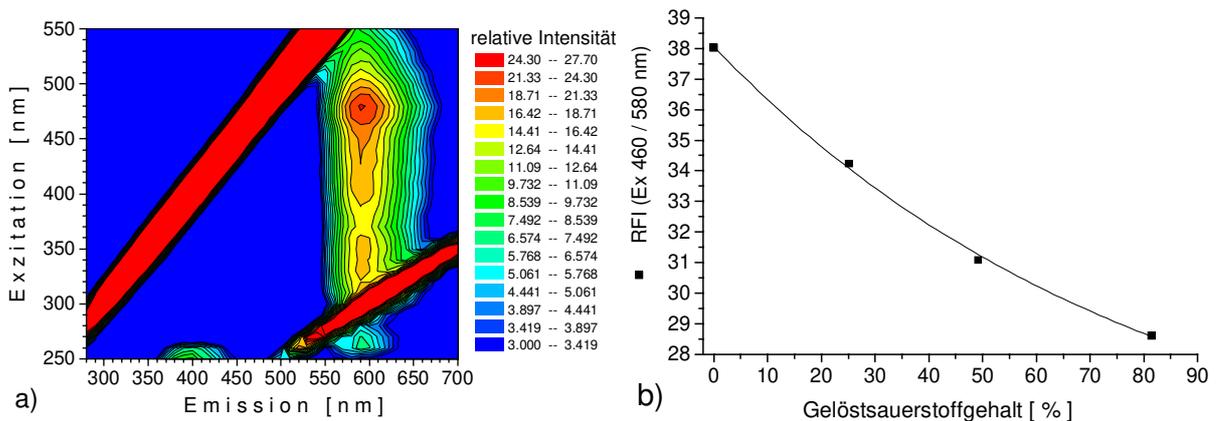


Abb. 9-3: a) 2D-Fluoreszenzspektrum von  $10^{-4}$  M Tris(2,2-bipyridin)-Ru(II)-chlorid-Komplex  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ , b) Auftragung der RFI vom  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ -Komplex gegen den Gelöstsauerstoffgehalt

### 9.3.2 Online-Detektion des Sauerstoffgehaltes durch einen extern zugesetzten Ru(II)-Komplex bei einer *E. coli*-Kultivierung

Im Verlauf einer Kultivierung von *E. coli* 5K (pHM12) wurde  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$  extern für eine Online-Gelöstsauerstoffdetektion eingesetzt. Abb. 9-4 zeigt den Fluoreszenzverlauf des Ruthenium-Komplexes bei Ex 470 / Em 610 nm, den Fluoreszenzverlauf des benachbarten riboflavinabhängigen Bereiches bei Ex 470 / Em 510 nm und den Verlauf des Gelöstsauerstoffgehalts gegen die Kultivierungszeit. Die Fluoreszenzintensität des Ruthenium-Komplexes verläuft weitestgehend in spiegelbildlicher Übereinstimmung mit dem Gelöstsauerstoffverlauf. Obwohl die gewählte Emissionswellenlänge der Ruthenium-Komplex-Fluoreszenz mit 610 nm um 20 nm über dem Fluoreszenzmaximum bei 590 nm

liegt, wird diese am Anfang der Kultivierung durch Überlagerung mit der etwa dreimal so intensiven, stark ansteigenden Riboflavinfluoreszenz beeinflusst. Letztere steigt in Übereinstimmung mit dem Zellwachstum weiter an, während die  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ -Fluoreszenz nach 9,5 h mit zunehmendem Gelöstsauerstoffgehalt abnimmt. Sauerstoff löscht die Fluoreszenz des Ruthenium-Komplexes.

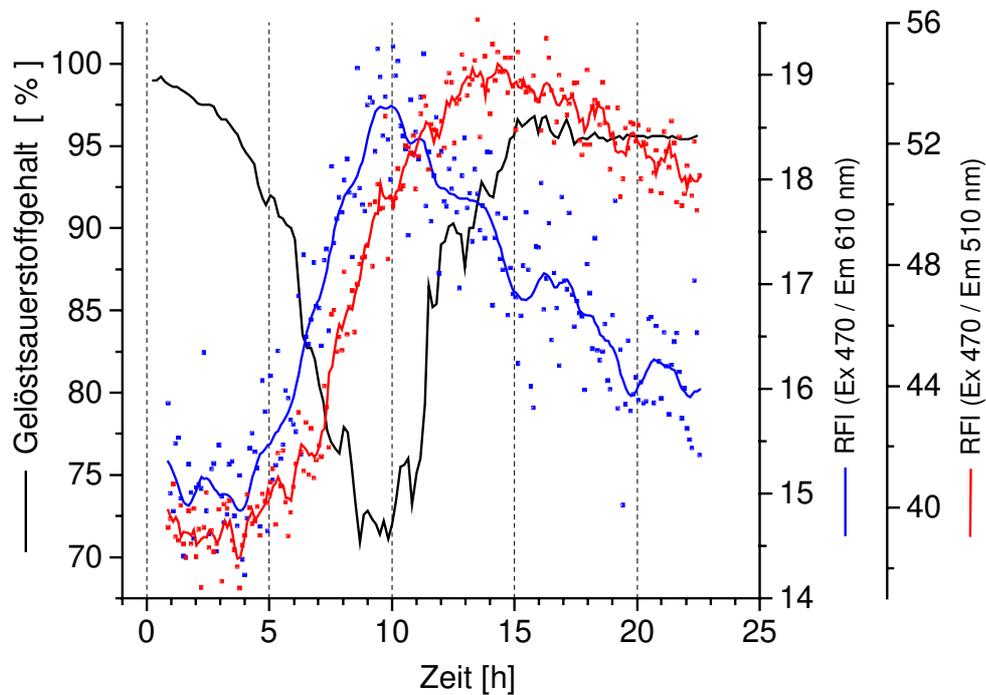


Abb. 9-4: Fluoreszenzverlauf im Bereich des zugesetzten Ruthenium-Komplexes zur  $\text{pO}_2$ -Detektion im Verlauf einer *E. coli*-Kultivierung

## 9.4 pH-Abhängigkeit ausgewählter Fluorophore

### 9.4.1 Beispiele ausgewählter Fluorophore zur pH-Detektion

Eine Übersicht über untersuchte externe Fluorophore, die sich zur Detektion des pH-Wertes eignen, gibt Tabelle 9.5 [STÄRK, 1997].

Tabelle 9.5: Übersicht über ausgewählte pH-abhängige Fluorophore

	Eosin	4-MB	ANS	DAS	Fluorescein
Vollständiger Name	Eosin	4-Methyl-Umbelliferon	8-Anilino-1-Naphthalin-sulfonsäure	9,10-Dimethoxyanthrazen-2-sulfonsäure, Natriumsalz	Fluorescein
Farbe, Beschaffenheit	rötliches Salz	weißes Pulver	schwarzes Salz	gelbes Salz	rötliches Salz
Löslichkeit	wasserlöslich				
Farbstoffklasse	Fluorescein-Derivat	Cumarin-Derivat	Naphtalinsäure-Derivat	polyzyklisch, aromatisch	
Abhängig von	pH-Wert	pH-Wert Abnahme bei Temperaturzunahme	pH-Wert	pH-Wert	pH-Wert
Fluoreszenzmaximum Ex / Em [nm]	520 / 530	330 / 450	400 / 480	380 / 460	490 / 510
Geeigneter pH-Bereich	2 bis 4	7 bis 9	3 bis 6	7 bis 9	5 bis 7
Verwendete Konzentration	$10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-6}$ M	$10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M
Quantenausbeute	hoch	hoch	rel. gering	hoch	hoch
Farbstoffkonzentration	$10^{-8}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$10^{-6}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M
Bemerkungen	Fluoreszenz außerhalb des biogenen Fluoreszenzbereiches	unabhängig vom $pO_2$ bei pH 2 bis 7 unabhängig vom pH Fluoreszenz im Bereich von NAD(P)H	Fluoreszenz im Bereich von Pyridoxal-phosphat Anfärbung extrazellulärer Proteine	unabhängig vom $pO_2$ Fluoreszenz nahe beim Bereich von NAD(P)H	Fluoreszenz außerhalb des biogenen Fluoreszenzbereiches

Abb. 9-5 zeigt die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten von Fluorescein (Ex 490 / Em 510 nm) und DAS (Ex 370 / Em 450 nm) vom pH-Wert. Ein steiler, linearer Anstieg der DAS-Fluoreszenz liegt bei pH 7,5 bis pH 8,5, für die Fluorescein-Fluoreszenz bei pH 5,5 bis pH 6,5.

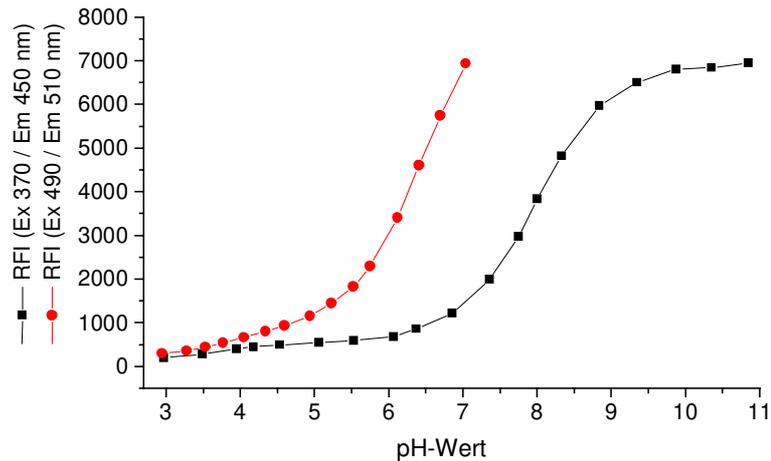


Abb. 9-5: Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten von Fluorescein (Ex 490 / Em 510 nm) und DAS (Ex 370 / Em 450 nm) vom pH-Wert

#### 9.4.2 Online-Detektion des pH-Wertes durch extern zugesetztes Fluorescein bei einer Hefe-Kultivierung

Das Maximum der Fluorescein-Fluoreszenz liegt bei neutralem und leicht saurem pH bei Ex 490 / Em 510 nm, bei pH 3 dagegen bei Ex 440 / Em 510 nm. Mit saurer werdender Lösung nimmt die Fluorescein-Fluoreszenz bei höherer Anregungswellenlänge ab, während sie bei der geringeren Exzitationswellenlänge zunimmt. Werden beide Verläufe ins Verhältnis gesetzt, so wurde im Verlauf einer Hefekultivierung eine gute Übereinstimmung mit dem pH-Wert gefunden (Abb. 9-6). Dieser fiel von anfangs pH 4 auf pH 2,5 ab. Durch Zugabe von NaOH wurde er in der stationären Phase der Batch-Kultivierung stufenweise auf pH 5 erhöht.

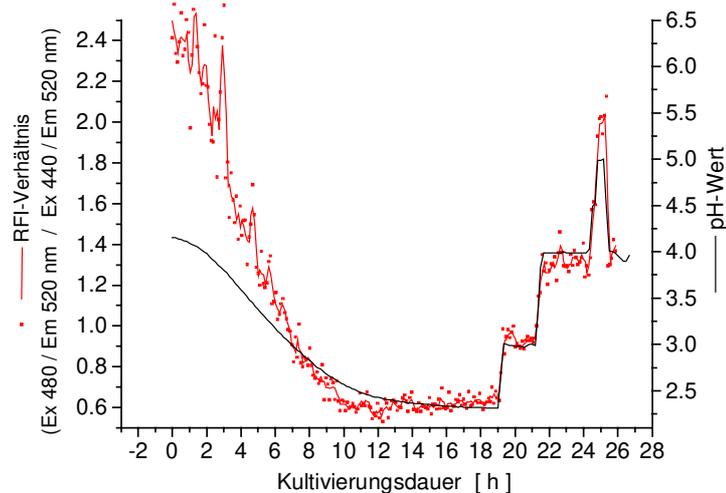


Abb. 9-6: Verlauf des pH-Wertes und des Verhältnisses zweier Fluoresceinmaxima während einer Kultivierung von *S. cerevisiae*

## 9.5 Diskussion

Zur Detektion des Sauerstoffgehaltes eignen sich von den untersuchten Fluorophoren PBA und der Ruthenium-Komplex am besten. Die Fluoreszenz von PBA ist stark abhängig vom Sauerstoffgehalt [JUNKER *et al.*, 1987]. Sie liegt außerhalb des biogenen Fluoreszenzbereiches und ist wegen der hohen Quantenausbeute in sehr geringen Konzentrationen einsetzbar. Da sie jedoch auch vom pH-Wert abhängt, ist der Einsatz von PBA nur bei Kultivierungen mit geregelter pH-Wert sinnvoll.

Zur pH-Kontrolle im Verlauf einer Hefekultivierung kann Fluorescein eingesetzt werden, sofern das Verhältnis der beiden Peaks ausgewertet wird. Das konzentrationsunabhängige Verhältnis berücksichtigt auch die Veränderung der Trübung der Fermentationsbrühe mit der Zeit.

Durch die Zugabe externer Fluorophore können informationslose Lücken in dem 2D-Fluoreszenzspektrum gefüllt werden. Als Beispiele für einen erhöhten Informationsgehalt durch Fluorophorzusatz wurden Fluorophore für die Online-Bestimmung von Sauerstoffgehalt und pH-Wert vorgestellt. Diese erwiesen sich in den eingesetzten Konzentrationen als nicht toxisch für die Zellen. Durch deren Zugabe erfolgt kein Eingriff in den Bioprozeß. Bedingt durch die hohe Detektionsgeschwindigkeit von Fluoreszenzmessungen stehen alle Informationen in Echtzeit auf einen Blick zur Verfügung. Das Spektrofluorometer könnte durch Fluorophorzusatz in der Zukunft verschiedene, etablierte Meßverfahren ersetzen.

Darüber hinaus bietet diese Methode große Vorteile bei Anwendungen in schwer zugänglichen Systemen (z. B. in Mikroreaktoren und im Bypass). Da nur extrem geringe Substanzmengen benötigt werden (bis zu  $10^{-8}$  M), stellt diese Methode zudem eine kostengünstige Analytik dar. Durch chemometrische Verfahren kann das Potential dieser Methode sicherlich noch stärker genutzt werden.

## 10 Entwicklung eines Vitalitätstests mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie

### 10.1 Theorie

Die Biomasse ist in der Bioanalytik häufig eine entscheidende Meßgröße. Die Detektion der Vitalität ermöglicht die Erfassung des aktiven, lebenden und damit produktiven Anteils der Biomasse. Die Vitalität einer Zellkultur wird durch das Verhältnis der Zahl lebender Zellen zur Gesamtzellzahl angegeben:

$$\text{Zellvitalität} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Lebendzellzahl} + \text{Totzellzahl}} \cdot 100 [\%]$$

Im Bereich der Medizin, der pharmazeutischen und kosmetischen, sowie in der Lebensmittelindustrie wird die Vitalitätsbestimmung zunehmend eingesetzt zur Qualitätskontrolle, Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektions- oder Sterilisationsmaßnahmen und der Prüfung toxischer Stoffeigenschaften [DIAPER *et al.*, 1992]. Bedeutende medizinische Anwendungen von Vitalitätstests liegen in der Erkennung von Antibiotikaresistenzen bestimmter Bakterienstämme [MASON *et al.*, 1994, PIDDOCK, 1990] oder in der Bestimmung der Wirksamkeit von Antibiotika [MÜLLER *et al.*, 1996]. In der Biotechnologie können mit Hilfe der Vitalität Kultivierungsprozesse kontrolliert werden, optimale Zeitpunkte für die Zufütterung bei einer Fed-Batch-Kultivierung, zum Einfrieren von Zellen für die Stammhaltung oder zur Isolation von Zellen für Klonierungen [RONOT *et al.*, 1996] bestimmt werden.

Bei den etablierten Vitalitätsbestimmungsmethoden handelt es sich vor allem um Offline-Verfahren [JONES, 1987]. Die Bestimmung der metabolischen Aktivität (NADH-Gehalt (fluorimetrisch), ATP-Gehalt (luminometrisch), Glykolyseaktivität (Gasmessung) und Mikrokalorimetrie oder Kapazitätsmessungen liefern nur indirekte Aussagen zur Vitalität. Zellvermehrungsverfahren (Objekträgerkulturen, Koch'sches Plattengußverfahren) sind mit einem erheblichen Zeit- und Personalaufwand verbunden (üblicherweise 3 bis 5, unter Umständen bis zu 14 Tage) [BRAILSFORD, 1997]. Zudem erfordern die mikroskopischen Verfahren und die mit relativ hohem apparativem Aufwand verbundene Durchflußcytometrie geschultes Personal. Die individuelle Erfahrung und subjektive Einschätzung des Auswertenden kann zu einem hohen statistischen Fehler führen [FORSTMAIER, 1979].

Benötigt wird eine schnelle und verlässliche Vitalitäts-Analytik, die die kommerziell angebotenen Vitalfarbstoffe effizient nutzen kann. In Kooperation mit FINKE wurden die Anwendungsmöglichkeiten der Methode der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der Vitalität unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen getestet [FINKE, 1998].

### 10.2 Meßbedingungen

Für die Vitalitätsbestimmungen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden Zellen aus Schüttelkolben-Kultivierungen (30°C, 120 UpM) von *Saccharomyces cerevisiae* H620 in Schatzmann-Medium (Kap. 14) verwendet. Damit die so aufgenommenen Spektren untereinander vergleichbar blieben, wurden alle Zellsuspensionen, die in diesem Versuch verwendet wurden,

aus derselben Ursprungsprobe hergestellt. Als Gesamtzellzahl wurden  $4,58 \cdot 10^7$  Zellen/mL in einer Helber-Zählkammer gezählt. Die Totzellzahl wurde durch Trypan-Blau-Färbung ermittelt. Die danach errechnete Vitalität betrug 98,7%. Die Hälfte der Zellen wurde in einem temperierbaren Schüttler (Eppendorf, Hamburg) über einen Zeitraum von 20 Minuten auf 75°C erhitzt. Die Überprüfung mittels Trypan-Blau-Färbung ergab eine vollständige Abtötung der Zellen, ohne daß sich eine Änderung der Zellmorphologie feststellen ließ. Somit standen von der ursprünglichen Probe zwei Hälften mit je 100% bzw. 0% Vitalität, gleicher Gesamtzellzahl und gleicher Trübung zur Verfügung. Durch Mischen in entsprechenden Volumenverhältnissen ließen sich daraus Zellsuspensionen mit definierter Vitalität herstellen.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit dem F-4500 (Kap. 3) und in der Makroküvette durchgeführt. Wenn nötig, wurde zeitweise gerührt. Die Einstellungen sind in Tabelle 10.1 angegeben.

Tabelle 10.1: Spektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	400-640 nm
• Emissionswellenlängenbereich	480-700 nm
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	5 nm / 5 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions-Spaltbreite	5 nm / 10 nm
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	2400 nm/min

### 10.3 Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe

Um die Möglichkeiten, die die 2D-Fluoreszenzspektroskopie durch gleichzeitige Verwendung mehrerer Exzitations- und Emissionswellenlängen und durch die damit verbundene Informationsfülle der Spektren bietet, voll auszuschöpfen, wurde eine Farbstoff-Kombination gesucht, die sowohl lebende, als auch tote Zellen spezifisch anfärbt und möglichst beide Farbstoffe auf einen Blick im 2D-Fluoreszenzspektrum erkennen läßt. Dafür wurden verschiedene ausgewählte Fluoreszenzfarbstoffe getestet [FINKE, 1998]. Einen Überblick liefert Tabelle 10.2.

Tabelle 10.2: Übersicht der getesteten Fluoreszenzfarbstoffe zur Vitalitätsbestimmung

	Propidium-Iodid	DiBAC <sub>4</sub> (3)	H <sub>2</sub> DCFDA	FITC
Farbe, Beschaffenheit	dunkelroter Feststoff	rot-grün schillernder Feststoff	weißer, sehr feinkörniger und klebriger Feststoff	orangeroter Feststoff
Löslichkeit	rot, mäßig gut in Wasser	gelb in Ethanol	farblos in DMSO	gelb in Ethanol
Farbstoffklasse	Ausschlußfarbstoff	Oxonol	Fluorescein-Derivat	Fluorescein-Derivat
Einsatz als	Totzellfarbstoff	Totzellfarbstoff	Lebendzellfarbstoff	Gesamtzellfarbstoff
Fluoreszenzbereich	$\lambda_{Ex} = 500-560 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 600-620 \text{ nm}$	$\lambda_{Ex} = 490-500 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 510-520 \text{ nm}$	$\lambda_{Ex} = 500-520 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 520-570 \text{ nm}$	$\lambda_{Ex} = 440-490 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 510-520 \text{ nm}$
Geeigneter pH-Bereich	pH 4 bis 7	pH 4 bis 7	stark pH-abhängig	pH 2 bis 5
Farbstoffkonzentration	150-400 $\mu\text{mol/L}$	8 $\mu\text{mol/L}$	10-100 $\mu\text{mol/L}$	6 $\mu\text{mol/L}$
Inkubationszeit	15 bis 20 Minuten (bei hohen Zelldichten von <i>S. cerevisiae</i> )	15 min (bei hohen Zelldichten)	keine eindeutige Anfärbung	5 min (auch bei hohen Zelldichten)
Wirkungsweise	Durch gesunde Zellen mit intakter Zellmembran erfolgt Ausschluß. In der Zelle werden DNA und RNA angefärbt.	Elektrochemisches Transmembranpotential verhindert die Aufnahme des Farbstoffs in das Zellinnere lebender Zellen.	Esterase-Aktivität und Membran-Integrität bestimmen die Aufnahme. Im Zellinneren erfolgt intrazelluläre Spaltung und Zurückhaltung des fluoreszierenden Hydrolyseproduktes.	Passive Anlagerung an Proteine der äußeren Zellwand von Mikroorganismen erfolgt.
Literatur	BRUL, 1997	MASON <i>et al.</i> , 1994 EPPS <i>et al.</i> , 1994 LLOYD und HAYES, 1995 MATSUNAGA <i>et al.</i> , 1995 DEERE <i>et al.</i> , 1995 LÓPEZ-AMORÓS <i>et al.</i> , 1995 BECK und HUBER, 1997	HAUGLAND, 1996 BECK und HUBER, 1997	PITAL <i>et al.</i> , 1966 BABIUK und PAUL, 1970 GORDON und FLIERMANS, 1978 BUTCHER und WEISSMAN, 1980 BRUL <i>et al.</i> , 1997

## 10.4 Vitalitätsmessungen mit Propidium-Iodid an *Saccharomyces cerevisiae*

Zellsuspensionen unterschiedlicher Vitalität wurden nach dem in den Meßbedingungen genannten Verfahren hergestellt und mit Propidium-Iodid (Konzentration 265  $\mu\text{mol/L}$ ) versetzt. In Abb. 10-1 ist deutlich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Vitalität zu erkennen. Gleichzeitig kommt es zu einer Verlagerung des Peakmaximums. Der Peak des in den toten Zellen gebundenen Propidium-Iodids liegt bei Ex 560 nm / Em 600 nm (Abb. 10-1 a). Dagegen befindet sich das Fluoreszenzintensitätsmaximum des freien Propidium-Iodids bei Ex 530 nm / Em 600 nm. Es wird bei einer Vitalität von 100 % sichtbar (Abb. 10-1 e), da Propidium-Iodid durch gesunde Zellen mit intakter Zellmembran ausgeschlossen wird und nicht, wie innerhalb der toten Zelle, die DNA und RNA anfärben kann.

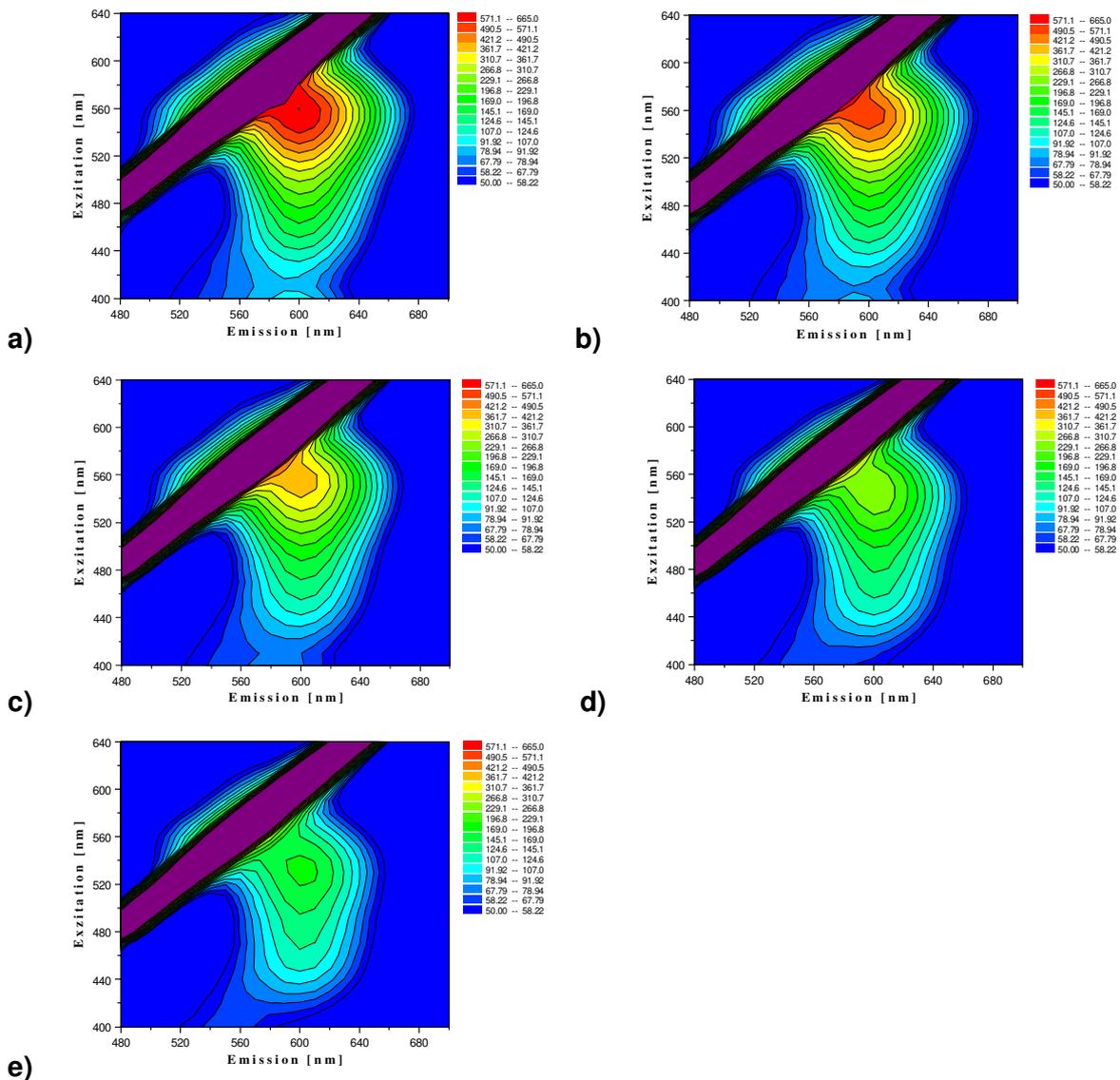


Abb. 10-1: 2D-Fluoreszenzspektren von Hefezellsuspensionen unterschiedlicher Vitalität angefärbt mit 265  $\mu\text{mol/L}$  Propidium-Iodid (a) 0%, b) 25%, c) 50%, d) 75%, e) 100%) [FINKE, 1998]

Bei der quantitativen Auswertung der Spektren erwies sich die Beziehung zwischen der RFI (Ex 560 nm / Em 600 nm) und der Vitalität als linear (Abb. 10-2). Mit steigender Vitalität, und damit auch abnehmender Totzellzahl, fiel die relative Fluoreszenzintensität des Propidium-Iodid-Peaks linear ab.

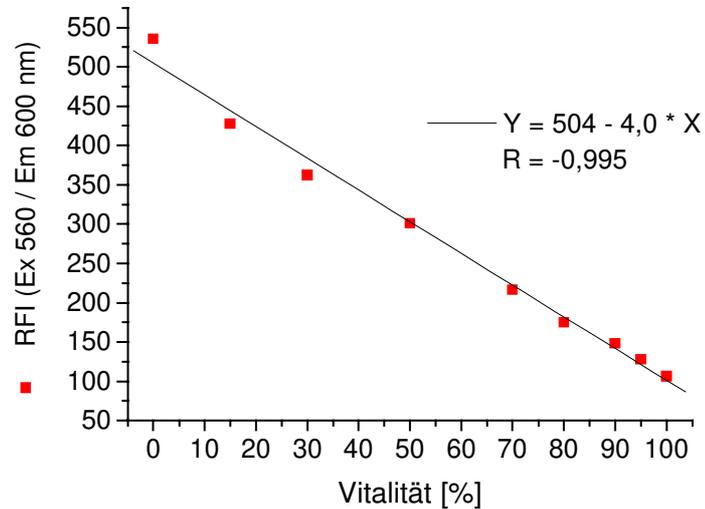


Abb. 10-2: Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensitäten von Propidium-Iodid bei Ex 560 / Em 600 nm von der Vitalität verschiedener Hefezellsuspensionen

## 10.5 Diskussion

Am Beispiel der Vitalitätsmessung mit Propidium-Iodid an *S. cerevisiae*-Zellsuspensionen wurde gezeigt, daß eine Bestimmung der Vitalität mittels der 2D-Fluoreszenzspektroskopie bei Verwendung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe zumindest im Modellsystem qualitativ und auch quantitativ möglich ist. Gegenüber herkömmlicher Fluoreszenzspektroskopie bietet die 2D-Technik den Vorteil, Verlagerungen des Peakmaximums bei unterschiedlicher Vitalität zu erkennen.

Die neben Propidium-Iodid getesteten Fluoreszenzfarbstoffe DiBAC<sub>4</sub>(3), H<sub>2</sub>DCFDA und FITC erfüllten in Untersuchungen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie nicht die gestellten Anforderungen [FINKE, 1998]. Für eine Fortsetzung der Suche nach geeigneten Vitalfarbstoffen für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie spricht die Zeit- und Arbeitersparnis dieser Methode zur Vitalitätsbestimmung im Vergleich zu den etablierten Methoden, die zusätzlich geschultes Personal und einen hohen materiellen Aufwand erfordern. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, innerhalb eines Spektrums verschiedene Analyte voneinander unabhängig zu detektieren. Gesucht werden sollte daher nach einer Vitalfarbstoff-Kombination, die sowohl lebende als auch tote Zellen spezifisch anfärbt und möglichst beide Farbstoffe auf einen Blick im 2D-Fluoreszenzspektrum erkennen läßt.

Die hinderliche, unterschiedlich lange Inkubationszeit der Farbstoffe könnte durch den Einsatz von Detergenzien verkürzt werden, die das Eindringen des Farbstoffs in die Zelle erleichtern. Da die 2D-Fluoreszenzspektroskopie als optische Methode nicht invasiv ist, ist eine Online-Vitalitätsbestimmung denkbar. Dafür müßten die Vitalfarbstoffe in so geringer Konzentration zugegeben werden, daß keine wachstumshemmende Wirkung auf die kultivierten Zellen auftritt.

Durch die Anwendung der Methode der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der Vitalität könnten auch Zellen mit myzelartigem Wachstum oder Clusterbildung, die den meisten etablierten Methoden (wie Durchflußcytometrie oder Mikroskopie) nicht zugänglich sind, erfaßt werden.

# 11 Fluoreszenzanfärbung von bakteriellen Polyhydroxyalkansäuren mit Nilrot

## 11.1 Theorie

Viele Bakterien sind in der Lage, Polyhydroxyalkansäuren (PHA) als Speicherstoffe in Form von intrazellulären Grana zu produzieren, wenn die Kohlenstoffquelle im Überschuß vorliegt, das Wachstum jedoch durch Mangel an einer weiteren Nährstoffquelle eingeschränkt ist. Diese Polymere finden als biologisch abbaubare „Kunststoffe“ Verwendung. Die chemische Zusammensetzung dieser Polyester ist vielfältig und bestimmt deren Eigenschaften [ANDERSON, 1990; HOCKING, 1994; STEINBÜCHEL, 1991].

Analytische Methoden zur Bestimmung des PHA-Gehaltes von Zellen beschränken sich auf Gaschromatographie, NMR oder Massenspektrometrie [BRAUNEGG *et al.*, 1978; BLOEMBERGEN *et al.*, 1986; DOI *et al.*, 1986; BALLISTRERI *et al.*, 1989]. Diese Methoden erfordern eine aufwendige, zeitintensive Probenvorbereitung und einen hohen apparativen Aufwand. Eine effektive Prozeßkontrolle und Optimierung der biotechnologischen Produktion von PHA bedarf einer verlässlichen, schnellen und kostengünstigen Überwachungsmethode. Optische Methoden bieten sich hierfür an. Erste Ergebnisse sind bereits mit der Durchflußzytometrie erhalten worden [DEGELAU *et al.*, 1995; AKERLUND *et al.*, 1995]. Die Möglichkeiten, die die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Qualifizierung und Quantifizierung von PHA nach Anfärbung mit Nilrot bietet, sind in Kooperation mit GORENFLO untersucht worden [GORENFLO *et al.*, 1999].

## 11.2 Meßbedingungen

Die Anzucht der Stämme (3 Tage aerobe Kultivierung), Isolierung der PHA (durch Extraktion mit Chloroform) und deren gaschromatographische Bestimmung (nach Methanolyse) sind am Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt worden [GORENFLO, 1999].

Die Fluoreszenzmessungen wurden meist in der Makroküvette mit dem F-4500 (Kap. 3) durchgeführt. Wenn nötig, wurde zeitweise gerührt. Die Einstellungen sind in Tabelle 11.1 angegeben. In Klammern werden die Einstellungen für Fluoreszenzmessungen im 10-mL-Minireaktor gegeben, der für Voruntersuchungen verwendet wurde.

Tabelle 11.1: Spektrophotometer-Einstellungen

• Exzitationswellenlängenbereich	480-610 nm (450-650 nm)
• Emissionswellenlängenbereich	550-650 nm (500-700 nm)
• Schrittweite der Exzitationswellenlänge / Emissionswellenlänge	5 nm / 5 nm
• Exzitations-Spaltbreite / Emissions- Spaltbreite	10 nm / 10 nm (10 nm/ 20 nm)
• Photomultiplierspannung	700 Volt
• Scan-Geschwindigkeit	30000 nm/min (2400 nm/min)

Zur qualitativen Untersuchung verschiedener PHA hinsichtlich ihres Fluoreszenzmaximums wurde eine Schicht der wasserunlöslichen Polymere an der Innenseite einer Dreiecksküvette (Kap. 3) erzeugt. 2 mL einer Lösung von PHA in Chloroform (5,0 g/L) wurden im Druckluftstrom getrocknet. Der in der Küvette entstandene PHA-Film wurde durch eine 10 minütige Inkubation in einer wässrigen Nilrotlösung (30 µg/mL) angefärbt und vermessen. Als Stammlösung diente eine Lösung von Nilrot in Azeton (1 mg/mL).

Grana-Suspensionen wurden mit Hilfe von Ultraschall erzeugt (Bandelin Sonoplus GM 200, Berlin).

### 11.3 2D-Fluoreszenzspektren verschiedener Polyhydroxyalkansäuren

Abb. 11-1 zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum von mit Nilrot angefärbter Poly-3-hydroxybuttersäure (Poly(3HB)) im 10 mL-Minireaktor. Die Grana-Suspension (0,6 mg/mL) wurde mit 2,5 µg/mL angefärbt. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei einer Exzitationswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. In wässriger Lösung fluoresziert Nilrot nicht, und auch der Polymerfilm allein weist keine Fluoreszenz auf.

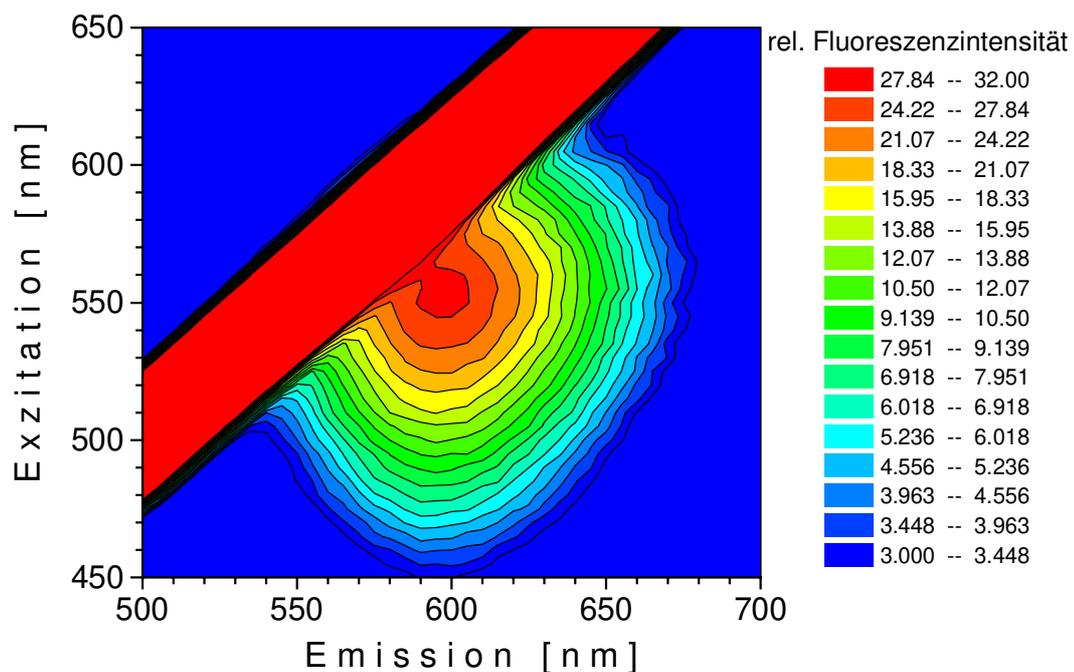


Abb. 11-1: 2D-Fluoreszenzspektrum einer mit Nilrot gefärbten Poly(3HB)-Grana-Suspension

Weitere biologisch erzeugte Polymere sind als Schicht in der Dreiecksküvette untersucht worden. Die aus den 2D-Fluoreszenzspektren ermittelten Fluoreszenzmaxima sind in Tabelle 11.2 zusammengefaßt. Sie liegen zwischen  $\lambda_{\text{Ex}} = 540 - 560 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Em}} = 570 - 605 \text{ nm}$ .

Tabelle 11.2: Fluoreszenzmaxima untersuchter Polyesterfilme

Polyester	Wellenlängenmaximum [nm]	
	Exzitation	Emission
Poly(3HB)	550	590
Poly(3HV)	545	580
Poly(3HO)	540	575
Poly(3HD)	540	570
Poly(3HB-co-3HV-co-4HV)	550	590
Poly(4HB)	550	590
P[R,S-3HB]	550	600

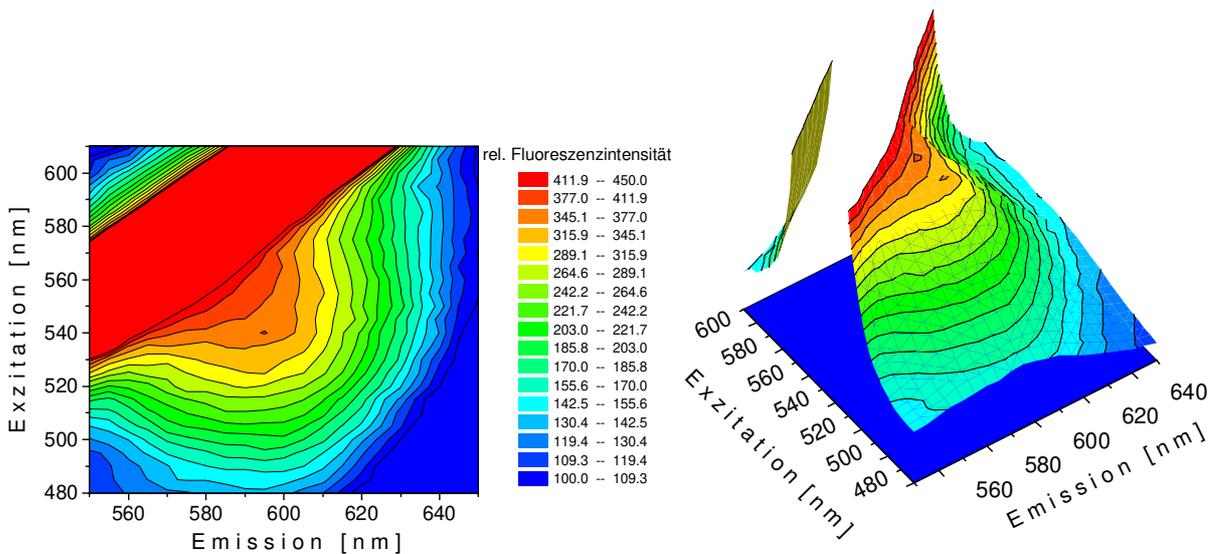
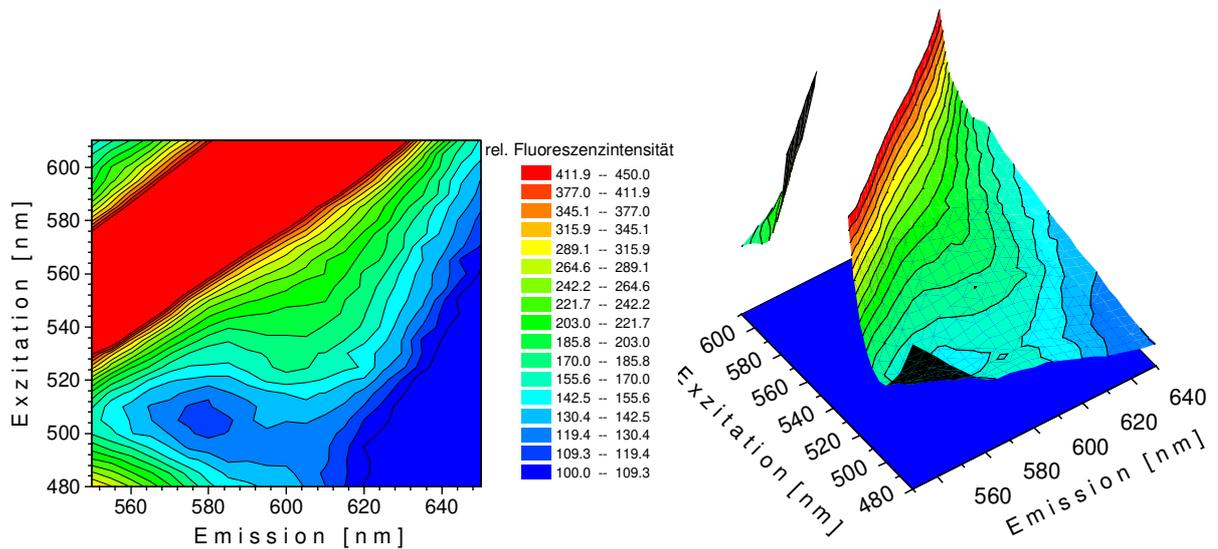
Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctanonsäure; 3HD, 3-Hydroxydecanonsäure; 4HB, 4-Hydroxybuttersäure [GORENFLO *et al.*, 1999]

Neben den reinen Polymeren wurden auch die jeweiligen Produzenten, die Bakterienzellen, mit dem intrazellulär angereicherten Polyester *in vivo* spektroskopisch untersucht. Abb. 11-2 zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum einer Suspension von *Ralstonia eutropha* H16, die Poly(3HB) gespeichert hat, angefärbt mit Nilrot. Das Fluoreszenzmaximum liegt deutlich sichtbar bei Ex 560 / Em 595 nm. Dagegen ist auf dem 2D-Fluoreszenzspektrum der Poly(3HB) negativen Mutante (*R. eutropha* PHB-4 (SK 4035)) bei gleicher Zelldichte nach Nilrotanfärbung kein ausgeprägtes Fluoreszenzmaximum, sondern nur eine geringe Fluoreszenzintensität in der Region um Ex 560 / Em 595 nm zu erkennen (Abb. 11-3). Zur Verdeutlichung der Unterschiede werden neben den Konturdarstellungen die 3D-Diagramme gezeigt.

In Tabelle 11.3 werden die aus den 2D-Fluoreszenzspektren der jeweiligen Erzeuger-Zellsuspension ermittelten Fluoreszenzmaxima weiterer Polyester aufgeführt. Sie liegen zwischen  $\lambda_{\text{Ex}} = 540 - 560$  nm und  $\lambda_{\text{Em}} = 585 - 605$  nm.

Tabelle 11.3: Fluoreszenzmaxima untersuchter Zellen und deren angereicherter Polyester [GORENFLO *et al.*, 1999]

Spezies (Plasmid)	Extrahiertes Polyester	Wellenlängenmaximum [nm]	
		Exzitation	Emission
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Poly(3HB)	560	595
PHB <sup>4</sup> (PHA-negative Mutante von H16)	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> (pHP1014::B28)	Poly(3HB-co-3HV-co-4HV)	550	600
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Poly(3HV)	555	600
<i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 29347	Poly(3HO)	545	605
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Poly(3HD)	545	600
<i>E. coli</i> (pKSSE5.3)	Poly(4HB)	540	585

Abb. 11-2: 2D-Fluoreszenzspektrum von *Ralstonia eutropha* H16, angefärbt mit NilrotAbb. 11-3: 2D-Fluoreszenzspektrum der Poly(3HB)-negativen Mutante von *Ralstonia eutropha* PHB-4, angefärbt mit Nilrot

## 11.4 Quantifizierung von bakteriellen Polyhydroxyalkansäuren mit Nilrot

Für eine genauere Quantifizierung von bakteriellen Polyhydroxyalkansäuren mit Nilrot ist es notwendig, die Nilrot-Sättigungskonzentration für die Anfärbung zu ermitteln. Ein typisches Sättigungsspektrum ist in Abb. 11-4 zu sehen. Zum Anfärben einer Grana-Suspension von 0,6 mg/mL werden 2,5 µg/mL Nilrot benötigt, während zum Anfärben von Zellsuspensionen 10 µg/mL Nilrot und mehr benötigt werden.

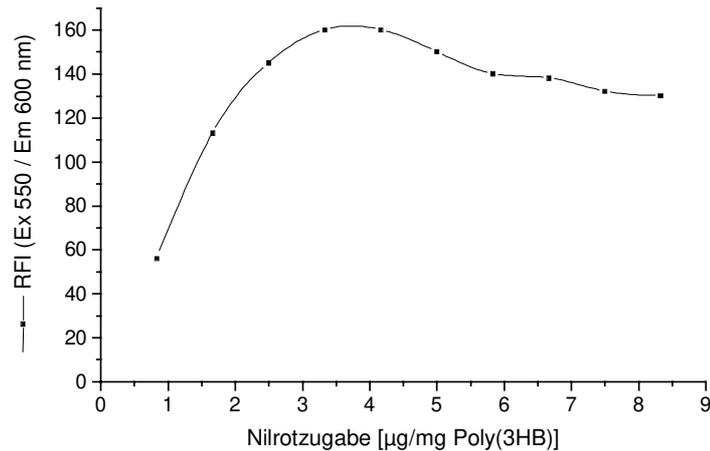


Abb. 11-4: Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von dem Verhältnis Nilrot zu Poly(3HB)

Für quantitative Untersuchungen wurden isolierte Poly(3HB)-Grana aus *Ralstonia eutropha* H16 eingesetzt. Zur Untersuchung, ob die Durchschnittsgröße der Granula die Fluoreszenzeigenschaften beeinflusst, wurden neben den Granulasuspensionen des Wildtyps außerdem noch Polymersuspensionen einer Mutante verwendet, die größere Grana produziert. Hierzu wurden wäßrige Suspensionen dieser Grana in vier unterschiedlichen Konzentrationen mit Nilrot angefärbt (Nilrotkonzentration:  $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) und spektroskopisch untersucht (Abb. 11-5). Bei höheren Poly(3HB)-Konzentrationen wurde das Färbungsgleichgewicht jeweils später erreicht, die Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht (FG) wie auch die Anfangssteigung ( $m$ ) der Fluoreszenzintensität lagen wesentlich höher.

Zur quantitativen Ermittlung der Poly(3HB)-Konzentrationen wurden diese sowohl für den Wildtyp, als auch für die Mutante gegen die aus dem linearen Bereich der ersten 180 s ermittelten Anfangssteigung und gegen die Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht aufgetragen. Es wurde jeweils ein linearer Zusammenhang gefunden (Abb. 11-5 und Tabelle 11.4). Sowohl bei der Auftragung der Poly(3HB)-Konzentrationen gegen die Anfangssteigungen als auch gegen die Fluoreszenzintensitäten im Gleichgewicht wurde ein Regressionskoeffizient ( $R$ ) von über  $R=0,999$  gefunden. Die Korrelationskoeffizienten ( $K$ ) variieren deutlich mit der Größe der Partikel. Diese wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt, die auch Aufschluß darüber brachte, daß die Streuung der Partikelgröße vom Durchschnittswert relativ gering ist [RIESEBERG, 1999].

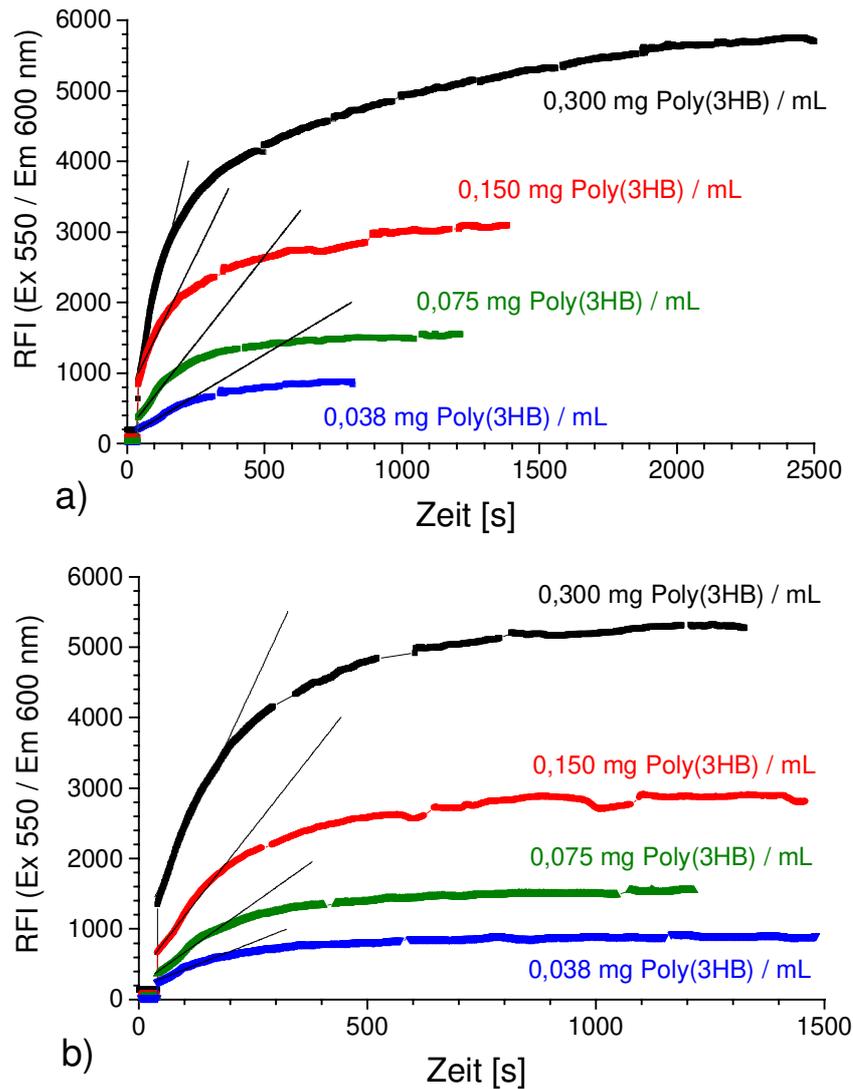


Abb. 11-5: Zeitliche Verläufe der Fluoreszenzintensitäten bei Ex 550 / Em 600 nm nach Nilrotfärbung (Nilrotkonzentration:  $2,5 \mu\text{g/mL}$ ) von Grana-Suspensionen mit vier unterschiedlichen Konzentrationen von Poly(3HB) isoliert aus *Ralstonia eutropha* H16 a) Wildtyp, b) Mutante

Tabelle 11.4: Linearität der Auftragung von verschiedenen Poly(3HB)-Grana-Konzentrationen in unterschiedlichen Granagrößen gegen die aus Abb. 11-5 ermittelten Fluoreszenzintensitäten im Gleichgewicht (FG) und Anfangssteigungen (m)

Herkunft der Grana	Durchschnittsgröße $\mu\text{m}$	Auftragung gegen die Fluoreszenzintensitäten im Gleichgewicht		Auftragung gegen die Anfangssteigungen	
		$K_{\text{FG}}$ (mg/mL)	$R_{\text{FG}}$	$K_{\text{m}}$ (mg · s/mL)	$R_{\text{m}}$
Wildtyp	0,60	$6 \cdot 10^{-5}$	0,999	$1,9 \cdot 10^{-2}$	0,999
Mutante	0,76	$12 \cdot 10^{-5}$	1,000	$3,6 \cdot 10^{-2}$	1,000

## 11.5 Diskussion

Nilrot fluoresziert nur in hydrophober Umgebung, z. B. umgeben von Polyhydroxyalkansäuren, während diese allein und Nilrot in wäßriger Lösung keine Fluoreszenz aufweisen (Abb. 11-1). Dies sind die Voraussetzungen für den Einsatz von Nilrot zum qualitativen und quantitativen Anfärben von biologischen Polyhydroxyalkansäuren.

Es wurde eine Methode gefunden, die verschiedenen nicht wasserlöslichen Polymere in der Dreiecksküvette qualitativ fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen und die Fluoreszenzmaxima verschiedener, mit Nilrot angefarbter Biopolymere in der 2D-Matrix genauer zu lokalisieren (Tabelle 11.2). Da diese nahe beim Streulicht liegen, ist häufig nur eine Schulter zu erkennen, und das eigentliche Maximum läßt sich nur abschätzen. Die Schrittweite von 5 nm erlaubt zudem nur eine ungefähre Ermittlung des Fluoreszenzmaximums. Eine Unterscheidung der verschiedenen Biopolymere ist unter den gegebenen Bedingungen nur eingeschränkt möglich. Der Fluoreszenzbereich ist, bedingt durch das Fluoreszenzmaximum von Nilrot, bei den untersuchten Polymeren nahezu identisch.

Trotzdem ist generell eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen bei *in vivo* Messungen verschiedener Zellen mit unterschiedlichen Polymeren (Tabelle 11.3) im Vergleich zu den Messungen mit den reinen Polymeren in Lösung (Tabelle 11.2) beobachtet worden. Die einzige Ausnahme stellt Poly(4HB) dar.

Daß *in vivo* selektiv Polyhydroxyalkansäuren in den Zellen mit Nilrot angefarbt werden können, zeigen Abb. 11-2 und Abb. 11-3. Die Nilrotfärbung ist für die Zellen nicht toxisch, was durch Ausplattieren von gefärbten Zellen gezeigt wurde [DEGELAU, 1993]. Bei der Poly(3HB)-negativen Mutante ist lediglich eine schwache Hintergrundfluoreszenz sichtbar (Abb. 11-3), die vermutlich durch das Anfärben von Phospholipiden in der Membran und von gelösten Lipiden im Zytoplasma verursacht wird. Ein deutlich ausgeprägter Peak, wie bei den mit Poly(3HB) angereicherten Zellen (Abb. 11-2), wurde im 2D-Fluoreszenzspektrum jedoch nicht detektiert.

Zum Anfärben von Zellen mit Nilrot wird eine im Vergleich zu Grana-Suspensionen etwa vierfache Nilrotkonzentration benötigt. Grund hierfür könnte das erschwerte Eindringen des Nilrots in das Zellinnere und die Absorption durch die Zellmembran sowie durch lösliche Lipide innerhalb der Zelle sein.

Die Bestimmung der Nilrot-Sättigungskonzentration für die Anfärbung ist zur Quantifizierung der Polyhydroxyalkansäuren notwendig. Aus den zeitlichen Verläufen der Fluoreszenzintensitäten nach Nilrotfärbung von Poly(3HB)-Suspensionen (Abb. 11-5) wurden drei Methoden zur Ermittlung der Grana-Konzentration aus den Fluoreszenzintensitäten erhalten. Bei höherem PHB-Gehalt wird das Gleichgewicht später erreicht, zweitens ist die Anfangssteigung größer und zum Dritten liegt die Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht höher. Der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung kann nur ungenau ermittelt werden. Dagegen korreliert die Polyesterkonzentration sehr gut sowohl mit der Anfangssteigung, als auch mit dem Gleichgewichtswert der relativen Fluoreszenzintensität (Tabelle 11.4).

Dies gilt jedoch nur bei gleicher Granagröße, denn mit der Größe der Partikel variieren die Korrelationskoeffizienten (K) deutlich. Unter der Annahme, daß nur die Oberfläche der Partikel angefarbt werden kann, ist die Fluoreszenzintensität nicht direkt von der Granamasse, sondern von deren Oberfläche abhängig. In Übereinstimmung damit ist für größere Grana,

deren Oberfläche bei gleicher Masse geringer ist als bei kleineren, sowohl die Anfangssteigung als auch die RFI im Gleichgewicht geringer, wie aus Abb. 11-5 ersichtlich ist. Somit muß für jede Granagrößenverteilung der Korrelationskoeffizient neu bestimmt werden.

Der Methode der Granakonzentrationsbestimmung über die Anfangssteigung ist der Vorzug zu geben, da sie in den gezeigten Beispielen innerhalb von 3 min möglich ist, während es mehr als 30 min dauern kann, bis das RFI-Gleichgewicht bestimmt werden kann. Neben der Zeitersparnis werden durch eine kürzere Bestrahlung außerdem Photobleaching-Effekte minimiert. Bei einheitlicher Granagrößenverteilung ist somit eine schnelle quantitative Bestimmung der Granakonzentration durch Fluoreszenzspektroskopie möglich.

Dagegen benötigen herkömmliche analytische Methoden wie Gaschromatographie, NMR oder Massenspektrometrie etwa 12 Stunden, um die PHA-Konzentration zu bestimmen. Der Personalaufwand ist bei Fluoreszenzmessungen wesentlich geringer, teure Chemikalien für die Extraktion oder Derivatisierung werden nicht benötigt, hochentwickelte, teure analytische Geräte sind nicht notwendig. Bedingt durch die hohe Quantenausbeute von Nilrot sind für die Anfärbung nur minimale Mengen (wenige  $\mu\text{g}$ ) notwendig. Für die quantitative Bestimmung von hydrophoben bakteriellen Polyhydroxyalkansäuren ist die fluoreszenzspektroskopische Anfärbung mit Nilrot eine extrem schnelle, verlässliche und darüber hinaus auch kostengünstige Methode.

GORENFLO hat aufbauend auf diese Versuchsergebnisse Fluoreszenzmessungen im Verlauf von Kultivierungsprozessen erfolgreich eingesetzt [GORENFLO, 1999].

## 12 Zusammenfassung und Ausblick

Der Einfluß verschiedener Wechselwirkungen auf die Fluoreszenz ist keineswegs trivial. Dadurch entstehen vielfältige Probleme bei der In-situ-Fluoreszenzanalytik von Bioprocessen [LIDÉN, 1993]. Die umfangreiche Beeinflussung der Fluoreszenz bei der Bioprozeßbeobachtung ist in Tabelle 2.1 zusammengefaßt. Diese Einflüsse müssen jedoch nicht unbedingt als störende Beeinflussung gesehen werden, sondern können auch als weitere Informationsquelle zur Bioprozeßkontrolle genutzt werden. So sind Stoffe, die selbst nicht fluoreszieren, aber als Fluoreszenzlöscher (Quencher) fungieren, durch Fluoreszenzspektroskopie analysierbar. Nahezu sämtliche Veränderungen in den Fluoreszenzeigenschaften im Verlauf von Kultivierungsprozessen haben ihren Ursprung in der biologischen Aktivität der Zellen. Die komplexen Wechselwirkungen auf die Fluoreszenz sind durch die Messung von eindimensionalen Spektren oder nur eines eng begrenzten Meßbereiches (wie beim Fluorosensor) häufig nicht zu interpretieren. Daher wurde der Meßbereich erweitert und 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung eingesetzt, was zu einem immensen Anstieg der auswertbaren Datenmenge führte, angefüllt mit vielfältiger, komplexer Information.

Durch die enormen Fortschritte auf dem Gebiet der Computertechnik, die zur Entwicklung immer leistungsfähigerer, preiswerter Computer geführt hat, müssen heute kaum noch Einschränkungen bei der Datenaufnahme und -speicherung hingenommen werden. Die Entwicklung geht deshalb dahin, so viele Daten wie möglich zu erfassen und im nachhinein die relevante Information unter Zuhilfenahme von Rechenprozeduren herauszufiltern. Eine manuelle Auswertung wird bei dieser zunehmenden Datenflut immer schwieriger und aufgrund der komplexen Wechselwirkungen teilweise unmöglich.

Die Aufnahme von 2D-Fluoreszenzspektren erfolgt automatisch und nahezu wartungsfrei. Gemäß des beschriebenen Trends werden immer mehr Daten (größere Bereiche, höhere Meßfrequenz) erfaßt. Das Problem liegt jedoch in der Interpretation dieser Datenflut.

Zur Datenreduktion der durchgeführten Fluoreszenzmessungen sind chemometrische Verfahren (Wavelet-Transformation, selbstorganisierende Merkmalskarten und Hauptkomponentenanalyse) durchgeführt worden [PEKELER, 1999; WEI, 1998]. Diese Methoden können die Dimension und die Menge der Fluoreszenzdaten ohne wesentlichen Informationsverlust drastisch verringern. Mit der selbstorganisierenden Merkmalskarte ist eine Reduktion auf bis zu 20 %, mit der Wavelet-Transformation auf bis zu 11 % und nach Durchführung der Hauptkomponentenanalyse auf ca. 5 % der ursprünglichen Datenmenge möglich. Mit den reduzierten Daten wurden hervorragende Korrelationen zu verschiedenen Prozeßvariablen berechnet, selbst wenn, wie z. B. bei Glucose oder dem Kohlendioxidgehalt im Abgas, kein direkter Zusammenhang zu Fluorophoren ersichtlich war.

Problematisch ist jedoch häufig noch die Übertragung der berechneten Modelle von einer Kultivierung auf eine vergleichbare. Außerdem ist kein direkter Rückschluß auf die Auslöser

der Fluoreszenzveränderung mehr möglich, da die Angaben über Exzitations-, Emissionswellenlängen und Fluoreszenzintensität bei der Datenreduktion verschwinden. Der direkte Bezug der Veränderung einer Meßgröße auf die Ursache der Veränderung ist nicht möglich. Durch die Deutung der reduzierten Daten können daher keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden. Etablierte Meßmethoden können bestätigt, ergänzt oder, im günstigsten Fall, ersetzt werden. Dafür bedarf es jedoch einer oder mehrerer Probekultivierungen zur Kalibration der Modelle, deren Durchführung sehr zeit- und arbeitsaufwendig sein kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren über die Zusammenfassung von Fluoreszenzbereichen aus Differenzspektren ermöglicht dagegen, wie in den einzelnen Kapiteln gezeigt wurde, den direkten Bezug der RFI-Veränderungen zur physikalischen (z. B. der Auflösung von Phenanthrenkristallen), chemischen (z. B. der Konzentration des fluoreszierenden GFPs) oder biologischen Ursache (z. B. der Umstellung des Stoffwechsels von aeroben auf anaerobe Bedingungen).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ermöglicht die 2D-Fluoreszenzspektroskopie einen tiefen Einblick in den Bioprozeß. Durch die Bioprozeßanalytik mit dieser optischen Meßtechnik wurden vielfältige Informationen sichtbar:

### **Sichtbares Zellwachstum**

Zur Abschätzung der Biomasse in der exponentiellen Phase mehrerer Batch-Kultivierungen von *E. coli* war die Fluoreszenz im Bereich von Pyridoxalphosphat sehr gut geeignet (Kap. 4, Abb. 4-7).

Das RFI-Verhältnis ("ox"/"red") verlief im anaeroben Stoffwechsel von *E. coli* parallel zur Biomassebildung (Abb. 4-10 a).

Die RI ("Streulicht 530 nm") konnte teilweise mit dem Zellwachstum von *Aspergillus niger* in Batch- und Fed-Batch-Kultur korreliert werden (Abb. 5-5).

Die RI ("Streulicht") gab das Zellwachstum in mehreren Kultivierungen von *C. purpurea* wieder (Abb. 6-5 und Abb. 6-8).

Im Verlauf eines Zellzyklus konnte die mittlere Größe der Zellen mit den RI ("Streulicht 1", "Streulicht 2") und mit den RFI ("Proteine", "Bereich 6") sichtbar gemacht werden (Abb. 8-6).

### **Sichtbare Änderungen des Stoffwechsels**

Wie das Experiment zur Entkopplung der Atmungskette zeigte (Abb. 4-4), reagiert die Fluoreszenzspektroskopie schnell und empfindlich auf Eingriffe in den Stoffwechsel.

Die RFI ("Pyridoxalphosphat") lieferte in der stationären Phase mehrerer Batch-Kultivierungen von *E. coli* über die ansonsten mögliche Verfolgung des Zellwachstums hinaus noch wertvolle Informationen über den Stoffwechsel. Je mehr Sauerstoff der Kultivierung zugeführt wird, desto steiler ist der Anstieg (Abb. 4-7). Aus der RFI ("Proteine") wurden deutliche Hinweise auf Umstellungen im Metabolismus erhalten. Der Beginn der Säureproduktion (Acetatkonzentration) äußert sich in einem RFI-Anstieg in diesem Bereich (Abb. 4-5).

Zum Zeitpunkt der durch das CO<sub>2</sub>-Maximum angezeigten Stoffwechselumstellung in der Kultivierung von *Aspergillus niger* zeigten die RFI ("Bereich 2") und RFI ("Bereich 3") ebenfalls ein Maximum (Abb. 5-3).

### **Sichtbare Unterscheidung zwischen kurzfristiger und vollständiger**

#### **Sauerstofflimitierung**

In den Fluoreszenzbereichen der an Redoxreaktionen beteiligten Coenzyme (NAD(P)H, FAD und FMN) zeigen sich besonders deutlich die Auswirkungen der Veränderungen durch unterschiedliche Sauerstoffanteile in der Begasung.

Bei kurzfristiger Umstellung von aeroben auf anaerobe Bedingungen sammeln sich die reduzierten Coenzyme an, da der Sauerstoff für eine schnelle Oxidation fehlt und der Stoffwechsel wegen der dafür notwendigen Proteinbiosynthese nicht sofort auf anaerobe Bedingungen umgestellt werden kann.

Demgegenüber liegen im anaeroben Stoffwechsel weniger reduzierte Coenzyme vor. Da diese in der oxidativen Phosphorylierung nicht mehr gebraucht werden, sind Citratcyclus und Pyruvat-Dehydrogenase, die unter aeroben Bedingungen viel NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> liefern, reprimiert. Statt dessen wird NADH bei der Bildung von Stoffwechselnebenprodukten (wie Ethanol oder Lactat) verbraucht.

Durch einen Vergleich der 2D-Fluoreszenzspektren konnte bei Kultivierungen von *E. coli* festgestellt werden, ob die Stoffflüsse vollständig auf anaerobe Bedingungen umgestellt worden waren. Das 2D-Fluoreszenzspektrum mit 0 % Sauerstoffbegasungsanteil nach kurzfristiger Begasungsumstellung auf Stickstoff (Abb. 4-1 b) unterscheidet sich signifikant von dem 2D-Fluoreszenzspektrum unter anaeroben Bedingungen am Ende der anaeroben Batch-Kultivierung (Abb. 1-5 a). Obwohl kein Sauerstoff mehr vorliegt, ähnelt es noch sehr dem 2D-Fluoreszenzspektrum vom Ende der Batch-Kultivierung mit 36,7 % Sauerstoffanteil in der Begasung (Abb. 1-5 d), was darauf hindeutet, daß der Stoffwechsel nach kurzfristiger Begasungsumstellung auf Stickstoff noch nicht vollständig auf anaerobe Bedingungen umgestellt wurde.

#### **Sichtbarer Zeitpunkt einsetzender Sauerstofflimitierung im Kultivierungsverlauf**

Wie in drei verschiedenen Batch-Kultivierungen von *E. coli* gezeigt wurde, beträgt das RFI-Verhältnis ("ox" / "red") konstant 0,55 - 0,65, sofern keine Sauerstofflimitierung, also rein oxidatives Wachstum vorliegt. Steigt das RFI-Verhältnis ("ox" / "red") über 0,7 an, beginnt eine Sauerstofflimitierung (Abb. 4-9 und Abb. 4-10).

Damit ist die Identifizierung des genauen Zeitpunktes einer einsetzenden Sauerstofflimitierung mit Hilfe des RFI-Verhältnisses ("ox" / "red") möglich. Dieses ist von der Biomasse und sich auf das gesamte Spektrum auswirkenden optischen Störeinflüssen weitgehend unabhängig. Durch die Bildung des Verhältnisses werden Informationen über den Redoxstatus der Zellen erhalten, der sich beim Übergang vom oxidativen zum fermentativen Metabolismus signifikant verändert. Da im anaeroben Stoffwechsel im Verhältnis zu den oxidierten Coenzymen weniger reduzierte Coenzyme vorliegen, steigt das RFI-Verhältnis ("ox" / "red") beim Übergang vom aeroben in den fermentativen Stoffwechsel an.

Der Zeitpunkt einer einsetzenden Sauerstofflimitierung wurde in der betrachteten Kultivierung von dem RQ nicht so eindeutig wiedergegeben (Abb. 4-9). Zur Berechnung der spezifischen Sauerstoffaufnahme und der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate ist die Offline-Bestimmung der Biomasse notwendig. Auch zur Bestimmung der Formiatkonzentration waren Offline-Proben notwendig. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie konnte eine einsetzende Sauerstofflimitierung eindeutig und exakt online bestimmt werden.

### **Sichtbare Quantifizierung von Sauerstofflimitierungen**

Da bei den in Kap. 4 betrachteten kontinuierlichen Kultivierungen von *E. coli* Sauerstoff in der Begasung enthalten war, fanden neben anaeroben immer auch aerobe Stoffwechselprozesse statt. Die Veränderung der Anteile zueinander konnte mit dem RFI-Verhältnis ("ox" / "red") quantitativ abgeschätzt werden (Abb. 4-15). Sowohl bei einer Erniedrigung des Sauerstoffgehaltes in der Begasung als auch bei einer Erhöhung der Verdünnungsrate stieg das RFI-Verhältnis ("ox" / "red") mit zunehmender Sauerstofflimitierung der Mikroorganismen an.

### **Sichtbare Morphologieveränderung**

Die Entsporulierung von *Aspergillus niger* konnte mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie durch Zunahme nahezu sämtlicher Fluoreszenz- und Streulichtintensitäten erkannt werden (Abb. 5-3).

### **Sichtbare Induktion**

Die Induktion durch Zugabe von Zufütterungslösung in der Kultivierung von *Aspergillus niger* wurde durch ein Maximum in der RFI ("GFP-Umgebung") und der RFI ("GFP-Maximum") angezeigt (Abb. 5-3).

### **Sichtbarer GFP-Produktionsbeginn**

Der Beginn der GFP-Produktion durch *Aspergillus niger* 5 h nach der Induktion wurde durch einen steilen Anstieg der RFI ("GFP-Umgebung") und der RFI ("GFP-Maximum") angezeigt (Abb. 5-3).

### **Sichtbare GFP-Produktion**

Nach erfolgter Induktion konnte die GFP-Produktion von *Aspergillus niger* durch die RFI ("GFP-Umgebung") bis zum Ende der Kultivierung wiedergegeben werden (Abb. 5-4).

### **Sichtbare Antischaummittelzugabe**

Die Zugabe von Antischaummittel während einer *Aspergillus niger*-Kultivierung wurde durch Abnahme nahezu sämtlicher Fluoreszenz- und Streulichtintensitäten erkannt (Abb. 5-3).

### **Sichtbare Ergotalkaloid-Produktion**

Die Produktion von Ergotalkaloiden durch *Claviceps purpurea* konnte online in den ersten 200 h mit der RFI ("Alkaloide") und der RFI ("Flavine") und offline nach einer Verdünnung

von 1:200 über den gesamten Kultivierungsverlauf mit der RFI ("Flavine") wiedergegeben werden (Abb. 6-4, Abb. 6-6 und Abb. 6-11).

### **Sichtbarer Proteingehalt**

Der Proteingehalt im Medium wurde online in den ersten 200 h von der RFI ("Alkaloide") sichtbar gemacht (Abb. 6-4). Offline wurde eine sehr gute Übereinstimmung nach Verdünnung der Proben mit der RFI ("Proteine") gefunden (Abb. 6-12).

Die RFI ("Protein") eignete sich zur Beschreibung des Proteingehalts im Verlauf einer *S. yanoikuyae*-Kultivierung (Abb. 7-8), der in diesem Fall mit dem Zellwachstum übereinstimmt.

### **Sichtbare apparente Löslichkeit**

Bei Ex 290 / Em 360 nm fluoresziert wässrig gelöstes und auch mizellar gelöstes Phenanthren (Abb. 7-1 a und d, Abb. 7-2 f). Diese Fluoreszenz läßt sich von der Fluoreszenz kristallinen Phenanthrens Ex 350 / Em 405 nm (Abb. 7-1 c) deutlich unterscheiden. Die Gesamtmenge eines hydrophoben Stoffes in wässriger und mizellarer Phase wird als apparente Löslichkeit bezeichnet.

### **Sichtbare Tensidkonzentration**

Unterschiedliche Sophoroselipidgehalte wurden in phenanthrenhaltigem Medium erkannt (Abb. 7-2).

### **Sichtbare Löslichkeitsgleichgewichtseinstellung**

Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde die Gleichgewichtseinstellung der apparenten Löslichkeit von kristallinem Phenanthren online sichtbar gemacht (Abb. 7-6). Die Dauer der Gleichgewichtseinstellung wurde daraufhin bei Kultivierungen von *S. yanoikuyae* als geschwindigkeitsbestimmender Schritt für den Phenanthren-Abbau unter Tensidzusatz erkannt (Kap. 7). Untersuchungen zur Kinetik dieser Löslichkeitsgleichgewichtseinstellung sind mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie einfach durchzuführen.

### **Sichtbare Bioverfügbarkeit**

Aus der steileren Abnahme der RFI von apparent gelöstem Phenanthren im Vergleich zur RFI kristallinen Phenanthrens (Abb. 7-10) konnten Rückschlüsse vom Aggregatzustand auf die Zugänglichkeit (Bioverfügbarkeit) des Schadstoffes gefolgert werden.

### **Sichtbarer Schadstoffaufnahme Mechanismus**

Mit Hilfe der durchgeführten 2D-Fluoreszenzuntersuchungen wird folgender Mechanismus postuliert:

Der Abbau des Phenanthrens verläuft anfangs schnell. Das apparent gelöste Phenanthren wird verstoffwechselt. Danach wird der Eintritt von Phenanthren in die Mizellen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

### **Sichtbare synchrone Kulturen**

Die Oszillationen der Kultivierungsdaten (Abgas-CO<sub>2</sub> und -O<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Flußrate NaOH und RQ) im Verlauf einer synchronen *S. cerevisiae*-Kultur konnten mit den RFI ("NAD(P)H", "Flavine 1", "Flavine 2", "Proteine", "Bereich 6") und den RFI-Verhältnissen ("NAD(P)H" / "Proteine", "Flavine 1" / "NAD(P)H") sichtbar gemacht werden (Abb. 8-5).

### **Sichtbarer Zellzyklus**

Die Veränderungen der Kultivierungsdaten (Abgas-CO<sub>2</sub> und -O<sub>2</sub>, mittlere Zellgröße, Anteile der Zellzyklusphasen, OD<sub>offline</sub> und Ethanolgehalt) im Verlauf eines Zellzyklus einer synchronen *S. cerevisiae*-Kultur zeigten Übereinstimmungen mit den RFI ("NAD(P)H", "Flavine 1", "Flavine 2", "Proteine", "Bereich 6", "Pyridoxin"), den RI ("Streulicht 1", "Streulicht 2") und den RFI-Verhältnissen ("NAD(P)H" / "Proteine", "Flavine 1" / "NAD(P)H").

Um weitere Aufschlüsse über die Theorie der Oszillation zu erhalten, ist die 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine ideale Methode, da sie in der erforderlichen Empfindlichkeit und Schnelligkeit direkte Informationen von intrazellulären Fluorophoren aus der Zelle liefert.

### **Sichtbare Restriktionspunkte**

Aus den Verläufen des RFI-Verhältnisses ("NAD(P)H" / "Proteine") und der zeitlichen Ableitung des RFI-Verhältnisses ("Flavine 1" / "NAD(P)H") sind relevante Zeitpunkte im Zellzyklus von *S. cerevisiae*, die wahrscheinlich den Restriktionspunkten entsprechen, exakt und eindeutig bestimmbar (Abb. 8-6 und Abb. 8-7). Diese sind daher auch für eine Prozeßsteuerung von synchronen Kulturen ideal geeignet.

### **Sichtbarer Gelöstsauerstoffgehalt**

Durch Zusatz der Fluoreszenzfarbstoffe PBA und des Ruthenium-Komplexes wurde der Gelöstsauerstoffgehalt für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie sichtbar (Abb. 9-2 und Abb. 9-3). Eine Online-Detektion des Gelöstsauerstoffgehalts war im Verlauf einer *E. coli*-Kultivierung teilweise möglich (Abb. 9-4).

### **Sichtbarer pH**

Durch Zusatz der Fluoreszenzfarbstoffe DAS und Fluorescein konnte der pH-Wert mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie sichtbar gemacht werden (Abb. 9-5).

Eine Online-Detektion des pH-Wertes war im Verlauf einer *S. cerevisiae*-Kultivierung mit dem RFI-Verhältnis (Ex 480 / Em 520 nm / Ex 440 / Em 520 nm) teilweise möglich (Abb. 9-6).

### **Sichtbare Vitalität**

Unterschiedliche Vitalitäten von *S. cerevisiae* konnten nach Anfärbung mit Propidium-Iodid mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erkannt werden (Abb. 10-1). Es ergab sich ein quantitativer Zusammenhang (Abb. 10-2).

### **Sichtbare Polyhydroxyalkansäuren (PHA)**

Während Nilrot und Polyhydroxyalkansäuren allein in wässriger Lösung nicht fluoreszieren, konnten verschiedene biologische Polyhydroxyalkansäuren offline als Grana nach Nilrotzugabe qualitativ (Abb. 11-1, Tabelle 11.2) und quantitativ (Abb. 11-5, Tabelle 11.4) mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie sichtbar gemacht werden. Auch in vivo konnten verschiedene Polyhydroxyalkansäuren durch Nilrotzugabe fluorimetrisch erkannt werden (Tabelle 11.3). Poly(3HB) angereicherte Zellen wurden deutlich von den Poly(3HB)-negativen Mutanten unterschieden (Abb. 11-2 und Abb. 11-3). Im Vergleich zu den reinen Polymeren in Lösung liegen die Fluoreszenzmaxima bei höheren Exzitations- und Emissionswellenlängen.

### **Sichtbare PHA-Konzentration**

Es wurde eine Methode entwickelt zur fluorimetrischen Bestimmung der Konzentration von Polyhydroxyalkansäuren in Granasuspension innerhalb von etwa 3 min (Abb. 11-5). Herkömmliche analytische Methoden wie Gaschromatographie, NMR oder Massenspektrometrie benötigen dafür etwa 12 Stunden.

Die Datenreduktion erfolgte durch Differenzspektren, in denen die zur Auswertung relevanten Wellenlängen ausgewählt wurden. Im Differenzspektrum werden die Veränderungen der RFI für ein ausgewähltes Zeitintervall auf einfache Weise sichtbar gemacht. Die Alternative hierzu ist die manuelle Betrachtung der RFI-Verläufe von allen mehr als 500 relevanten Meßpunkten (bei den üblichen Einstellungen des F-4500). Wie bei den varianzmaximierenden Methoden der Chemometrie wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, daß die prozeßrelevanten Informationen in den RFI-Veränderungen zu suchen sind. Im Unterschied zu jenen wurde jedoch nicht generell den größten Veränderungen auch der höchste Informationsgehalt zugeordnet. So können auch kleine Veränderungen von nur wenigen RFI in einem Bereich, der kaum äußerer Beeinflussung ausgesetzt ist, von großer Bedeutung für die Auswertung sein.

Das für die Datenreduktion mit Hilfe von chemometrischen Methoden wichtige Kriterium der linearen Abhängigkeit findet seine Berücksichtigung in der sinnvollen Zusammenfassung von Bereichen, in denen die Fluoreszenzintensitäten gemittelt wurden. Dieses Potential der 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die Bioprozeßbeobachtung zur Glättung von RFI-Verläufen ist in dieser Arbeit erstmals konsequent ausgenutzt worden. Gegenüber zeitlicher Mittelung verringert die Bereichsmittelung die zeitliche Auflösung von 2D-Fluoreszenzspektroskopie nicht.

Eine chemometrische Sensitivitätsanalyse [STÖSSEL, 1998] bekräftigt, daß nach der Durchführung von chemometrischen Verfahren das 2D-Fluoreszenzspektrum auf ähnliche Bereiche reduziert wird wie durch Differenzspektren. Die Lage sensibler Bereiche, also Orte im 2D-Fluoreszenzspektrum mit einem hohen Informationsgehalt für die Vorhersage von Prozeßgrößen, korrelierte mit der Lage biogener Fluorophore. Als Methode wurden dafür

einzelne RFI variiert, um zu berechnen, wie stark die Vorhersage eines variierten von der Vorhersage des ursprünglichen Spektrums abweicht.

Die komplexen Ursachen für die Veränderungen der RFI, die im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der Zellen stehen, müssen nicht immer geklärt sein. Für den Anwender reicht es häufig aus, die benötigten Informationen über den Bioprozeß verlässlich berechnet zu bekommen. Für industrielle Anforderungen sind z. B. ideale Zeitpunkte zur Induktion oder zur Zellernte von Interesse. Die Signale anderer Sensoren sollen häufig ersetzt oder zur Sicherheit ergänzt werden. Die physikalische, chemische oder biologische Ursache für die Veränderung des Meßsignals interessiert im etablierten Kultivierungsverlauf im industriellen Maßstab oft nicht. In diesem Fall sind chemometrische „*Black-box-Modelle*“ ideal geeignet, solange die Modelle für den betrachteten Prozeß gültig sind.

Für die wissenschaftliche Forschung dagegen ist der Bezug zur Ursache der Fluoreszenzveränderung wichtig, um aus den Fluoreszenzdaten direkt zu neuen Erkenntnissen zu gelangen. Die Interpretation der Fluoreszenzdaten kann so komplex sein, daß chemometrische Modelle ohne die Kenntnis von Experten versagen. Ohne die Möglichkeiten moderner Auswerteverfahren erhalten diese jedoch kaum Zugang zur weiter anwachsenden Datenmenge.

Ideal ist daher die Kombination von chemometrischen Methoden und interdisziplinärem Expertenwissen. So könnte das Potential chemometrischer Modelle durch eine Vorauswahl der verwendeten Meßwerte mit Differenzspektren verbessert werden. Zeitbereiche wichtiger Veränderungen, in denen die Bildung von Differenzspektren sinnvoll ist, könnten vom Anwender eingegeben werden. Automatisierte Expertensysteme könnten in chemometrische Methoden eingebunden werden. Dadurch wäre auch eine Verbesserung der Übertragung von Modellen einer Kultivierung auf eine vergleichbare zu erwarten.

Erleichtern könnte die Interpretation von 2D-Fluoreszenzdaten eine umfangreiche 2D-Fluoreszenzspektren-Datenbank, die auch die Veränderungen durch die Umgebung (z. B. Temperatur, pH-Wert) erfaßt.

Eine zusätzliche Dimension wäre durch die Kombination von zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie mit 2D-Fluoreszenzmessungen erschlossen. Das Potential zum Erkennen einzelner Komponenten in einer komplexen Mischung könnte dadurch wesentlich erhöht werden.

In der biotechnologischen Industrie kommen neben der reinen Bioprozeßbeobachtung auch Aufarbeitungsprozesse als neue Einsatzgebiete für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie in Betracht. Diese Technik kann zugleich zur Dokumentation sowie zur Sicherung gleichbleibender Qualität eingesetzt werden. Fluoreszenzmessungen könnten ein rechtzeitiges Eingreifen durch ein frühzeitiges Erkennen von Störungen ermöglichen. Mit

dieser Meßtechnik sollte auch eine Steuerung und Regelung des Bioprozesses durch Reaktion auf Informationen direkt aus der Zelle möglich sein.

Eine technische Verbesserung des Meßsystems ließe sich vor allem bei der Anbindung des Lichtleiters an den F-4500 (Hitachi, Japan) erreichen. Tests mit einem Querschnittswandler zur besseren Fokussierung des Exzitationslichts resultierten in Steigerungen der RFI um den Faktor 70. Bei extrem geringer Eindringtiefe könnte es von Vorteil sein, den Sensorkopf etwas von der vom Medium umspülten Quarzglasscheibe zu entfernen, damit Exzitations- und Emissionslicht besser überlappen können. Vorteilhaft könnte auch eine ins Reaktorinnere gewölbte Oberfläche des Quarzglases sein. Effekte des evaneszierenden Feldes könnten durch einen eintauchenden Quarzglasstab ausgenutzt werden.

Die Zahl der angebotenen Fluoreszenzfarbstoffe nimmt rasant zu. Diese könnten das Potential der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erhöhen. Die Fortsetzung der Suche nach geeigneten extrinsischen Fluorophoren als Zusatz zu Kultivierungen und zur Vitalitätsbestimmung erscheint sinnvoll. Durch die sich schnell entwickelnden neuen Möglichkeiten zur selektiven Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe auf genetischer Ebene wird die Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung sicherlich einen weiteren Aufschwung erhalten.

*Thus, the future of optical methods  
appears bright!*

[MAROSE *et al.*, 1999]

## 13 Literatur

- AKERLUND, T.; NORDSTROM, K. und BERNANDER, R., 1995, Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 177 (23), 6791-6797.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. und WATSON, J.D., 1997, Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH.
- AMICI, A.M.; MINGHETTI, A.; SCOTTI, T.; SPALLA, C. und TOGNOLI, L., 1967, Ergotamine production in submerged culture and physiology of *Claviceps purpurea*, *Appl. Microbiol.* 15, 597-602.
- ANDERSON, A. J und DAWES, E. A., 1990, Occurance, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.* 54, 450-472.
- ARONSTEIN, B. N.; CALVILLO, Y. M. und ALEXANDER, M., 1991, Effect of surfactant at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil, *Environ. Sci. Technol.* 25, 1728-1731.
- ASTER, M. und CORRIEU, G., 1987, Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochate chrysosporium* INA-12, *Enzyme Microb. Technol.* 9, 245-249.
- BABIUK, L.A. und PAUL, E.A., 1970, The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil, *Can. J. Microbiol.* 16, 57-62.
- BAILEY, J. E., 1991, Towards a science of metabolic engineering, *Science* 252, 1668-1675.
- BALLISTRERI, A.; GAROZZO, D.; GIUFFRIDA, M.; IMPALLOMENI, G. und MONTAUDO, G., 1989, Sequencing bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by partial methanolysis, high-performance liquid chromatography fractionation, and fast atom bombardment mass spectrometry analysis, *Macromolecules* 22, 2107-2111.
- BAMBOT, S. B.; LAKOWICZ, J. R. und RAO, G., 1995, Potential applications of lifetime-based, phase-modulation fluorimetry in bioprocess and clinical monitoring, *Trends in Biotechnol.* 13, 106-115.
- BECK, P. und HUBER, R., 1997, Detection of cell viability in cultures of hyperthermophiles, *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 11- 14.
- BELLGARDT, K.-H., 1994, Analysis of synchronous growth of baker's yeast, *J. Biotechnol.* 35, 19-49.
- BERLMAN, I.B., 1971, Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules, Academic Press, New York, London.
- BEUSE, M., 1998, Populationsverteilung und Wachstumsmodi bei *Saccharomyces cerevisiae* in synchronen Chemostatkulturen, Dissertation, Universität Hannover.
- BEUTEL, S., 1999, laufende Dissertation, Universität Hannover.
- BEYELER, W.; GSCHWEND, K. und FIECHTER, A., 1983, In-situ Fluorometrie: Eine neue Methode zur Charakterisierung von Bioreaktoren (In-situ fluorometry: A new method for the characterization of bioreactors), *Chem. Ing. Technol.* 55 (5), 869-871.

- BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D.A.; HAMER, G.K.; BLUHM, T.L. und MARCHESSAULT, R.H., 1986, Studies of composition and crystallinity of bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate), *Macromolecules* 19, 2865-2871.
- BOEHL, D., 1998, Grundlegende Untersuchungen zur alternativen Sauerstoffversorgung bei Kultivierungen von *Claviceps purpurea*, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- BRAILSFORD, M., 1997, Einstieg in die mikrobiologische Echtzeit-Prozeßkontrolle, *Pharm. Ind.* 59 (4), 360-362.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B. und LAFFERTY, R.M., 1978, A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 29-37.
- BRUL, S.; NUSSBAUM, J. und DIELBANDHOESING S.K., 1997, Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi, *J. Microbiol. Methods* 28 (3), 169-178.
- BUTCHER, E.C. und WEISSMAN, I.L., 1980, Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate I. Technical aspects, *J. Immunol. Methods* 37 (2), 97-108.
- CAPITÁN-VALLVEY, L.F.; OLMO, M.DEL; AVIDAD, R.; NAVALÓN, A.; DE ORBE, I. und VILCHEZ, J.L., 1995, Close overlapping discrimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by synchronous scanning at variable-angle solid-phase spectrofluorimetry, *Analytica Chimica Acta* 302, 193-200.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W. und PRASHER, D. C., 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263, 802-805.
- CHANG, Y. H.; CHANG, T. C.; KAO, E-F. und CHOU, C., 1996, Detection of protein A produced by *Staphylococcus aureus* with a fiber-optic-based biosensor, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (10), 1571-1574.
- CHEN, C.-I. und McDONALD, K.A., 1990, Oscillatory behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture, II. Analysis of cell synchronisation and metabolism, *Biotechnol. Bioeng.* 36, 28-38.
- CHENINA, R., 1993, Ein Fluoreszenzspektrometer zur On-line-Verfolgung von Fermentationsprozessen, Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- CHUNG H.; ARNOLD M. A.; RHIEL M. und MURHAMMER D. W., 1995, Simultaneous measurements of glucose, glutamine, ammonia, lactate, and glutamate in aqueous solutions by near-infrared spectroscopy, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50 (2), 109-125.
- CHUNG H.; ARNOLD M. A.; RHIEL M. und MURHAMMER D. W., 1996, Simultaneous measurements of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 50, 270-276.
- CLARK, D.P., 1989, The fermentation pathways of *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Reviews* 63, 223-234.
- COTE, J; BOURGET, L; GARNIER, A. und KAMEN, A., 1998, Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring, *Biotechnol. Prog.* 13 (6), 709-714.
- CUBITT, A. B.; HEIM, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A. und TSIEN, R. Y., 1995, Understanding, improving and using green fluorescent proteins, *Trends Biochem. Sci.* 20, 448-455.

- DEERE, D.; PORTER, J.; EDWARDS, C. und PICKUP, R., 1995, Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)) for the flow cytometric assessment of bacterial viability, *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 165-170.
- DEGELAU, A., 1993, Durchflußcytometrie in der Biotechnologie, Dissertation, Universität Hannover.
- DEGELAU, A.; SCHEPER, T.; BAILEY, J.E. und GUSKE, C., 1995, Fluorometric measurement of poly-beta hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 653-657.
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), 1993, Catalogue of Strains.
- DIAPER, J.P.; TITHER, K. und EDWARDS, C., 1992, Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 268- 272.
- DOCHNAHL, A., 1997, Einsatz optischer Methoden bei der On-line-Analytik von Fermentationen, Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y. und SOGA, K., 1986, Nuclear magnetic resonance studies on poly-β-hydroxybutyrate and a copolyester of β-hydroxybutyrate and β-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, *Macromolecules* 19, 2860-2864.
- DUBOC, P.; MARISON, I. und STOCKAR, U., 1996, Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations, *J. Biotechnol.* 51, 57-72.
- DUNN-COLEMAN, N.S.; BLOEBAUM, P.; BERKA, R.M.; BODIE, E.; ROBINSON, N.; ARMASTRONG, G.; WARD, M.; PRZETKA, M.; CARTER, G.L.; LACOST, R.; WILSON, L.J.; KODAMA, K.H.; BALIU, E.F.; BOWER, B.; LAMSA, M. und HEINSOHN, H., 1991, Commercial Levels of Chy-mosin Production by *Aspergillus*, *BioTechnology* 9, 976-980.
- DUYSENS, L.N.M. und AMESZ, J., 1957, Fluorescence spectroscopy of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cell in the near -ultraviolet and visible region, *Biochim. Biophys. Acta* 24, 19-26.
- EDWARDS, D.A.; LUTHY, R.G. und LIU, Z., 1991, Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1), 127-133.
- EFROYMSON, R.A. und ALEXANDER, M., 1991, Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1441-1447.
- EPA, 1979, The Environmental Protection Agency, Polynuclear aromatic hydrocarbons - Method 610. US Federal Register 44 (233), 69514-69517.
- EPPS, D.E.; WOLFE, M.L. und GROPPA, V., 1994, Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)) in model systems and cells, *Chem. Phys. Lip.* 69, 137-150.
- FASMAN, G.D., 1976, Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> ed., CRC Press, Cleveland, vol. 2, 215.
- FINKE, 1998, Grundlegende Untersuchungen zur Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Vitalitätsbestimmung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Diplomarbeit, Universität Hannover.

- FORSTMAIER, I., 1979, Nachweis vitaler Keime in Wasserproben zur Verfahrensüberprüfung der Wasserentkeimung mit anodischer Oxidation durch Vitalfluorochromierung der Keime mit 3',6'-Diacetyl-fluorescein, anschließende Membranfiltration und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, Dissertation, Universität München.
- GANZLIN, M., 1999, laufende Dissertation, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig.
- GEBNER, K., 1997, Untersuchungen zum Phenanthrenabbau durch *Sphingomonas yanoikuyae* in Flüssigkultur und Bodensuspension unter Zusatz von Sophoroslipiden, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- GORDON, R.W. und FLIERMANS, C.B., 1978, Survival and viability of *Escherichia coli* in a thermally altered reservoir, *Water Res.* 12, 343-352.
- GORENFLO, V., 1999, laufende Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- GORENFLO, V.; STEINBÜCHEL, A.; MAROSE, S.; RIESEBERG, M. und SCHEPER, T., 1999, Quantification of bacterial PHA by Nile red staining, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* akzeptiert.
- GOTTSCHALK, G., 1986, Bacterial metabolism, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- GUERIN, W.F. und JONES, G.E., 1988, Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp., *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 937-944.
- GUHA, S. und JAFFÉ, P.R., 1996, Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactant, *Environ. Sci. Technol.* 30, 605-611.
- GUILBAULT, G.G., 1973, Practical Fluorescence: Theory, Methods, and Techniques, Dekker, New York.
- HAUGLAND, R.P., 1996, Handbook of fluorescent probes and research chemicals Molecular Probes, 6<sup>th</sup> ed., Eugene, OR.
- HEIM, R.; CUBITT, A. B. und TSIEN, R. Y., 1995, Improved green fluorescence, *Nature* 373, 663-664.
- HEINZLE, E.; DUNN, I.J.; FURUKAWA, K. und TANNER, R.D., 1982, Modelling of sustained oscillations observed in continuous culture of *S. cerevisiae*, in: Modelling and control of biotechnical processes, New York.
- HESSE, M., 1998, Einfluß der Sauerstoffversorgung auf den Metabolismus von *Escherichia coli* LJ110 und IMW 107 bei Batch- und Chemostat-Kultivierungen unter Einbeziehung der Stoffflußanalyse, Dissertation, Universität Hannover.
- HILMER, J.-M., 1996, In-situ-Bioprozeßkontrolle am Beispiel der In-vivo-Biolumineszenz und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Universität Hannover.
- HITZMANN, B.; PEKELER, T.; LINDEMANN, C.; MAROSE S. und SCHEPER, T., 1998, Chemometric models for the on-line estimation of bioprocess variables from 2-D-Fluorescence spectra, 7<sup>th</sup> International Conference on Computer Applications in Biotechnology -CAB7- International Center for Biotechnology, Japan.
- HOCKING, P. J. und MARCHESSAULT, R. H., 1994, Biopolyesters, in: Chemistry and technology of biodegradable polymers, Hrsg.: GRIFFIN, G.J.L., Blackie Academic & Professional, New York.
- ICHINOSE, N.; SCHWEDT, G.; SCHNEPEL, F. und ADACHI, K., 1987, Fluorometric analysis in biomedical chemistry, J. Wiley and Sons, New York.

- JAKUES, N.A.; JAKUES, V.L.; WOLF, A.C. und WITTENBERGER, C.L., 1985, Does an increase in membrane unsaturated fatty acids account for Tween 80 stimulation of glucosyltransferase secretion by *Streptococcus salivarius*?, *J. Gen. Microbiol.* 131, 67-72.
- JONES, R.P., 1987, Measures of the yeast death and deactivation and their meaning: Part 1, *Proc. Biochem.* 22, 118-128.
- JUNKER, B.H.; WANG, D.I.C. und HATTON, T.A., 1987, Fluorescence Sensing of Fermentation Parameters Using Fiber Optics, *Biotechnol. Bioeng.* 32, 55-63.
- KOBEL, H. und SANGLIER, J. J., 1986, Ergot alkaloids *in*: Biotechnology, Vol. 4, Hrsg.: PAPE, H. und REHM, H.-J., Verlag Chemie, Weinheim.
- KOLLER, E.; QUERENBERGER, O.; JÜRGENS, G.; WOLFBEIS, O.S. und ESTERBAUER, H., 1986, Investigation of human plasma low density lipoprotein by three-dimensional fluorescence spectroscopy, *FEBS Lett.* 198 (2), 229-234.
- KONSTANTINOV, K.; CHUPPA, S.; SAJAN, E.; TSAI, Y.; YOON, S. und GOLINI, F., 1994, Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures, *Trends in Biotechnol.* 12, 324-333.
- KÜENZI, M. und FIECHTER, A., 1969, Changes in carbohydrate composition and trehalase-activity during the budding cycle of *S. cerevisiae*, *Arch. Mikrobiol.* 64, 396-407.
- LAHA, S. und LUTHY, R.G., 1991, Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems, *Environ. Sci. Technol.* 25 (11), 1920-1930.
- LAHA, S. und LUTHY, R.G., 1992, Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems, *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1367-1380.
- Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (LFU, Hrsg.), 1991, Materialien zur Altlastenbearbeitung, Band 7, Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung.
- Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (LUA NRW, Hrsg.), 1997, Gefäßversuche zum mikrobiellen Abbau von PAK (polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen) in belasteten Böden, Essen.
- LANTZ, S.; LIU, J.; MUELLER, J.G. und PRITCHARD, P.H., 1995, Effects of surfactants on fluoranthrene mineralization by strain *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, *in*: Microbial processes for bioremediation, Hrsg.: HINCHEE, R.E.; BROCKMAN, F.J.; VOGEL, C.M., Battelle Press, Columbus.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. und COX, M.M., 1998, Prinzipien der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- LI, J.-K.; ASALI, E. C. und HUMPHREY, A. E., 1991, Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry, *Biotechnol. Prog.* 7, 21-27.
- LIDÉN, G., 1993, In situ fluorescence measurements - clarifying or blurring the picture?, *Pure & Appl. Chem.* 65 (9), 1927-1932.
- LINDEMANN, C., 1994, Grundlegende Untersuchungen über die Anwendbarkeit von 2D-Fluoreszenzmessungen zur Bioprozeßkontrolle, Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- LINDEMANN, C., 1998, Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung, Dissertation, Universität Hannover.
- LIU, Z.; JACOBSON, A.M. und LUTHY, R.G., 1995, Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactants systems, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 145-151.

- LIU, Z.; LAHA, S. und RICHARD, G.L., 1991, Surfactant solubilization of polyaromatic hydrocarbons in soil-water suspensions, *Water Sci. Technol.* 23, 475-485.
- LLOYD, D. und HAYES, A.J., 1995, Vigour, vitality and viability of microorganisms, *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 1-7.
- LOHMEYER, M.; DIERKES, W. und REHM, H.J., 1990, Influence of inorganic phosphate and immobilization on *Claviceps purpurea*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 196-201.
- LONGWORTH, J.W.; RAHN, R.O. und SHULMAN, R.G., 1966, Luminescence of pyrimidines, purines, nucleosides, and nucleotides at 77°K. The effect of ionization and tautomerization, *J. Chem. Phys.* 45 (8), 2930-2939.
- LÓPEZ-AMORÓS, R.; MASON, D.J. und LLOYD, D., 1995, Use of two oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in seawater by flow cytometry, *J. Microbiol. Methods* 22, 165-176.
- LORD, P.G. und WHEALS, A.E., 1980, Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 142, 808-818.
- LOTTSPREICH, F. und ZORBAS, H., 1998, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- MAROSE, S., 1995, Untersuchungen zur Anwendung eines Prozeßspektralfluorometers für die On-line-Bioprobebeobachtung, Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- MAROSE, S.; LINDEMANN, C. und SCHEPER, T., 1998, Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring, *Biotechnol. Prog.* 14 (1), 63-74.
- MAROSE, S.; LINDEMANN, C.; ULBER, R. und SCHEPER, T., 1999, Optical sensor systems for bioprocess monitoring, *Trends in Biotechnol.* 17, 30-34.
- MARTEGANI, E.; PORRO, D.; RANZI, B.M. und ALBERGHINA, L., 1990, Involvement of a cell size control mechanism in the induction and maintenance of oscillations in continuous cultures of budding yeast, *Biotech. Bioeng.* 36, 453-459.
- MASON, D.J.; ALLMANN, R.; STARK, J.M. und LLOYD, D., 1994, Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry, *J. Microscopy* 176 (1), 8-16.
- MATSUNAGA, T.; OKOCHI, M. und NAKASONO, S., 1995, Direct count of bacteria using fluorescent dyes: application to assessment of electrochemical disinfection, *Anal. Chem.* 67 (24), 4487-4490.
- MEINE, D., 1998, Fluoreszenzspektroskopie, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 46 Supplement, S121-S132.
- MENGE, M., 1999, laufende Dissertation, Universität Hannover.
- MISTELI, T. und SPECTOR, D.L., 1997, Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology, *Nat. Biotechnol.* 15 (10), 961-964.
- MÜLLER, S.; LOFFHAGEN, N.; BLEY, T. und BABEL, W., 1996, Membrane-potential-related fluorescence intensity indicates bacterial injury, *Microbiol. Res.* 151 (2), 127-131.
- MÜLLER, T., 1996, Untersuchungen zum Phenanthrenabbau durch *Sphingomonas spec.* DSM 6900 unter Zusatz von Sophoroselipiden, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- MÜNCH, T., 1992, Zellzyklusdynamik von *Saccharomyces cerevisiae* in Bioprozessen, Dissertation ETH Zürich No. 9772.

- MÜNCH, T.; SONNLEITNER, B. und FIECHTER, A., 1992, New insights into the synchronisation mechanism with forced synchronous cultures of *S. cerevisiae*, *J. Biotechnol.* 24, 299-314.
- MURRAY, A.W. und KIRSCHNER, M.W., 1989, Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle, *Science* 246, 614-621.
- NAIMIMOHASSES, R.; BARNETT, D. M.; GREEN, D. A. und SMITH, P. R., 1995, Sensor optimization using neural network sensitivity measures, *Meas. Sci. Technol.* 6, 1291-1300.
- NEU, T.R., 1996, Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces, *Microbiol. Rev.* 60, 151-166.
- PARULEKAR, S. J.; SEMONES, G. B.; ROLF, M. J.; LIEVENSE, J. C. und LIM, H. C., 1986, Induction and elimination of oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotech. Bioeng.*, 28, 700-710.
- PEARLMAN, R.S.; YALKOWSKY, S.H. und BANERJEE, S., 1984, Water solubilities of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 13 (2), 555.
- PEKELER, T., 1999, laufende Dissertation, Universität Hannover.
- PIDDOCK, L.J.V., 1990, Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *J. Appl. Bacteriol.* 68, 307-318.
- PITAL, A.; SHELDON, L.J.; HUDAK, C.E. und LEWIS, E.E., 1966, Direct fluorescent labeling of microorganisms as a possible life-detection technique, *Appl. Microbiol.* 14, 119-123.
- POPENBORG, L.; FRIEHS, K. und FLASCHEL, E., 1997, The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring, *J. Biotechnol.* 58 (2), 79-88.
- PORRO, D.; MARTEGANI, E.; RANZI, B.M. und ALBERGHINA, L., 1988, Oscillations in continuous cultures of budding yeast: A segregated parameter analysis, *Biotech. Bioeng.* 32, 411-417.
- PRAEVE, P.; FAUST, U.; SITTIG, W. und SUKATSCH D. A., 1994, Handbuch der Biotechnologie, 4. Auflage, R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- RANDERS-EICHHORN, L.; ALBANO, C.R.; SIPIOR, J.; BENTLEY, W.E. und RAO, G., 1997, On-line green fluorescent protein sensor with LED excitation, *Biotech. Bioeng.* 55 (6), 921-926.
- RATLEDGE, C., 1991, Yeast physiology - a micro-synopsis, *Bioproc. Eng.* 6, 195-203.
- RIEGLER, R., 1995, Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening, Applications in biotechnology, *J. Biotechnol.* 41, 177-186.
- RIESEBERG, M., 1999, laufende Dissertation, Universität Hannover.
- RIESENBERG, D.; MENZEL, K.; SCHULZ, V.; SCHUHMAN, K.; VEITH, G.; ZUBER, G. und KNORRE, W.A., 1990, High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon  $\alpha 1$ , *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 77-82.
- ROCH, T.M., 1994, Fluoreszenzspektroskopische in-situ Analyse von polycyclischen aromatischen Verbindungen in mineralölkontaminierten Böden, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- RONOT, S.; PAILLASSON, S. und MUIRHEAD, K.A., 1996, Assessment of cell viability in mammalian cell lines *in*: Flow cytometry applications in cell culture, Hrsg.: AL-RUBEAI, M. und EMERY, A.N.
- ROSEN, M.J., 1989, Surfactants and interfacial phenomena, John Wiley & Sons, New York.

- SATROUTDINOV, A.D.; KURIYAMA, H. und KOBAYASHI, H., 1992, Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture, *FEMS Microbiol. Letters* 98, 261-268.
- SCHATZMANN, H., 1975, Anaerobes Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, ETH Zürich No. 5504.
- SCHEPER, T. und SCHÜGERL, K., 1986, Characterization of bioreactors by in-situ-fluorometry, *J. Biotechnol.* 3, 221-229.
- SCHEPER, T., 1985, Messung zellinterner und zellexterner Parameter zur Fermentationskontrolle, Dissertation, Universität Hannover.
- SCHEPER, T., 1991, Bioanalytik, Vieweg, Braunschweig.
- SCHIPPERS, C., 1999, laufende Dissertation, Universität Hannover.
- SCHLEGEL, H.G., 1992, Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- SCHMIDT, W., 1994, Optische Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- SCHÜGERL, K.; HITZMANN, B.; JURGENS, H.; KULLICK, T.; ULBER, R. und WEIGAL, B., 1996, Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control, *Trends in Biotechnol.* 14, 21-31.
- SCHULMAN, S.G., 1976, Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: Physicochemical principles and practice, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- SCHULMAN, S.G., 1985, Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications - Part 1, Chemical Analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York.
- SIEDENBERG, D.; MESTRIC, S.; GANZLIN, M.; SCHMIDT, M.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. und RINAS, U., 1999, *GlaA* promoter controlled production of a mutant green fluorescent protein (S65T) by recombinant *Aspergillus niger* during growth on defined medium in batch and fed-batch cultures, *Biotechnol. Prog.* im Druck.
- SIEGEL, J.A., 1985, Solving crimes with 3D-fluorescence spectroscopy, *Anal. Chem.* 57 (8), 934A-940A.
- SIPIOR, J.; RANDERS-EICHHORN, L.; LAKOWICZ, J. R.; CARTER, G. M. und RAO, G., 1996, Phase fluorometric optical carbon dioxide gas sensor for fermentation off-gas monitoring, *Biotechnol. Prog.* 12, 266-271.
- SONNLEITNER, B. und KÄPPELI, O., 1986, Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis, *Biotechnol. Bioeng.* 28, 927-937.
- SONNLEITNER, B., 1991, Dynamics of yeast metabolism and regulation, *Bioprocess Eng.* 6, 187-193.
- STÄRK, E., 1997, Allgemeine Untersuchungen zur 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die On-line-Bioprobebeobachtung und deren Ergänzung durch Fluorophorzusatz, Diplomarbeit, Universität Hannover.
- STEINBÜCHEL, A., 1991, Polyhydroxyfettsäuren – thermoplastisch verformbare und biologisch abbaubare Polyester aus Bakterien, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 39, 1112-1114.
- Stössel, S., 1998, Sensitivitätsanalyse: Identifizierung und Charakterisierung von Bereichsflächen von 2D-Kulturfluoreszenzspektren mit hohem Informationsgehalt für die Vorhersage von Prozeßgrößen, Diplomarbeit, Universität Hannover.

- STRÄSSLE, C.; SONNLEITNER, B. und FIECHTER, A., 1989, A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. II: Experimental verification, *J. Biotechnol.* 9, 191-208.
- STRYER, L., 1991, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- SUHR, H.; WEHNERT, G.; SCHNEIDER, K.; BITTNER, C.; SCHOLZ, T.; GEISSLER, P.; JÄHNE, B. und SCHEPER, T., 1995, In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus, *Biotechnol. Bioeng.* 47, 106-116.
- SUTER, G.W.; KALLIR, A.J. und WILD, U.P., 1983, Total luminescence spectroscopy, *Chimia* 37 (11), 413-421.
- SZMACINSKI, H. und LAKOWICZ, J. R., 1996, Frequency-domain lifetime measurements and sensing in highly scattering media, *Sens. Actuat. B* 30, 207-215.
- TARTAKOVSKY, B.; SHEINTUCH, M.; HILMER, J.-M. und SCHEPER, T., 1996, Application of Scanning Fluorometry for Observation and Modelling of a Fermentation Process, *Biotechnol. Prog.* 12, 126-131.
- TEUSINK, B.; LARSSON, C.; DIDERICH, J.; RICHARD, P.; VAN DAM, K.; GUSTAFSSON, L. und WESTERHOFF, H.V., 1996, Synchronized heat flux oscillations in yeast cell populations, *J. Biol. Chem.* 271 (40), 24442-24448.
- THIEM, A., 1994, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258-263.
- UDENFRIED, S., 1964, Fluorescence assay in biology and medicine, Academic Press.
- VARMA, A. und PALSSON, B. O., 1994a, Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3724-3731.
- VARMA, A. und PALSSON, B. O., 1994b, Predictions of oxygen supply control to enhance population stability of engineered production strains, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 275-285.
- VARMA, A. und PALSSON, B. O., 1995, Parametric sensitivity of stoichiometric flux balance models applied to wild-type *Escherichia coli* metabolism, *Biotechnol. Bioeng.* 45, 69-79.
- VIGON, B.W. und RUBIN, A.J., 1989, Practical consideration in the surfactant-aided mobilization of contaminants in aquifers, *J. Water Pollut. Control. Fed.* 61, 1233-1240.
- VOGEL, H. J., 1956, A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N), *Microbial Genet. Bull.* 243, 112-119.
- VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; ANDEL, J.G. VAN und RULKENS, W.H., 1995, Influence of non-ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1699-1705.
- VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; SERKENBURG, A. und VAN ANDEL, J.G., 1992, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 548-552.
- WARNER, I.M.; PATONAY, G. und THOMAS, M.P., 1985, Multidimensional luminescence measurements, *Anal. Chem.* 57 (3), 463A-483A.
- WEDLER, G., 1987, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

- WEI, J., 1998, Untersuchungen von Verfahren zur Auswertung der zweidimensionalen Fluoreszenzspektren, Dissertation, Universität Hannover.
- WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. und PRITCHARD, P.H., 1998, Response of fluoranthrene-degrading bacteria to surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 475-483.
- WINTER, R. und NOLL, F., 1998, Methoden der biophysikalischen Chemie, Teubner, Stuttgart.
- WODARCZAK, S., 1997, Grundlegende Aspekte der Bodensanierung: Tensidinduzierte Phenathren-Desorption und Bestimmung der Metabolite des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- WOEHRER, W. und ROEHR, M., 1981, Regulatory aspects of baker's yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 23, 567 ff.
- WOLFBEIS, O.S. und LEINER, M., 1985, Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization, *Anal. Chim. Acta* 167, 203-215.
- WOLFBEIS, O.S., 1985, Fluorescence of organic natural products, *in: Molecular luminescence spectroscopy methods and applications - Part 1*, Hrsg.: SCHULMAN, S.G., Chemical analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York.
- ZANDER, M., 1981, Fluorimetrie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- ZHANG, Y.; WALTER, J. und MILLER, R.M., 1997, Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene, *Environ. Sci. Technol.* 31, 2211-2217.

# 14 Anhang

## 14.1 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A/D	Analog/Digital
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
cmc	kritische Mizellkonzentration ( <i>critical micelle concentration</i> )
CPR	Kohlendioxidbildungsrate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Ex / Em nm	Wellenlängenpaar Exzitationswellenlänge/Emissionswellenlänge
FAD	Flavinadeninucleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadeninucleotid (reduzierte Form)
FMN	Flavinmononucleotid (oxidierte Form)
FMNH <sub>2</sub>	Flavinmononucleotid (reduzierte Form)
g	Gramm
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
gem.	gemessen
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde (meist Kultivierungsstunde)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	bidestilliertes oder demineralisiertes Wasser
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
Hz	Hertz
Kap.	Kapitel
KPP-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
L	Liter
M	molar
min	Minute
mL	Milliliter
N	normal
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadeninucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadeninucleotid (reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadeninucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat (reduzierte Form)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OUR	Sauerstoffaufnahme
PC	Personalcomputer

---

$pO_2$	Gelöstsauerstoffgehalt [%]
Pyr	Pyridoxin
$q_{CO_2}$	spezifische Kohlendioxidbildungsrate
$q_{O_2}$	spezifische Sauerstoffaufnahme
R	Korrelationskoeffizient
rel.	relativ
RFI	relative Fluoreszenzintensität(en)
RI	relative (Streulicht-)Einheiten
RISP	Realtime Integrating Software Platform
RQ	respiratorischer Quotient
s	Sekunde
t	Tonnen
TCI	Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
Trp	Tryptophan
UpM	Umdrehungen pro Minute (Rührerdrehzahl)
var	Varianz
vvm	Volumen Gaszufuhr pro Volumen Kulturlösung und Minute
X	Biomasse
$\sigma$	Streuung, Standardabweichung
$\lambda_{EM}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{EX}$	Exzitationswellenlänge
$\mu L$	Mikroliter
$\mu$	spezifische Wachstumsrate

## 14.2 Kulturmedien

### 14.2.1 *E. coli*-Kultivierung (Kap. 4)

Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 500 mL-Schüttelkolben. Beim Vorkulturmedium wurden die Glucose- und die Magnesiumsulfatlösung separat autoklaviert (25 min bei 121°C) und erst kurz vor dem Animpfen steril hinzugegeben. 150 mL HDF-Medium mit einer Glucosekonzentration von 10 g/L wurden mit 250 µL einer Glycerin-Stammkultur angeimpft. Nach 15 h bei 37°C im Schüttelschrank (130 UpM) wurde diese Kultur zum Animpfen des Reaktors verwendet. Die Vorkulturen mit dem Stamm *E. coli* IMW107 wurden zusätzlich mit 15 µg/mL Tetracyclin versehen.

Die Kultivierungen wurden in einem etwas modifizierten synthetischen Minimalmedium (HDF-Medium) durchgeführt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 14.1 angegeben ist.

Der Phosphatpuffer, Ammoniumsulfat, Antischaummittel und die Spurenelemente wurden zusammengegeben, mit 5 N Natronlauge auf pH 6,4 eingestellt und anschließend autoklaviert. Die Magnesiumsulfat- und Glucoselösungen wurden separat autoklaviert, wobei eine 100fach konzentrierte Magnesiumsulfatlösung und eine 10fach konzentrierte Glucoselösung verwendet wurden.

Tabelle 14.1: HDF-Mediums [RIESENBERG *et al.*, 1990]

Substanz	Massenkonzentration [g L <sup>-1</sup> ]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,0
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,5 · 10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	3,0 · 10 <sup>-3</sup>
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,3 · 10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,6 · 10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,5 · 10 <sup>-3</sup>
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,6 · 10 <sup>-3</sup>
EDTA	1,7 · 10 <sup>-3</sup>
Fe(III)citrat · H <sub>2</sub> O	1,2 · 10 <sup>-2</sup>
Citronensäure · H <sub>2</sub> O	0,35
Antischaummittel SP1	225 µL/L
Glucose	9,0
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,0

### 14.2.2 A. *niger*-Kultivierung (Kap. 5)

Die Sporen für das Inokulum wurden von 3,8 Gewichtsprozent Kartoffel-Dextrose-Agarplatten in 0,9 Gewichtsprozent NaCl-Lösung suspendiert. Die Sporendkonzentration betrug  $10^6$  Sporen pro mL. Dem synthetischen Minimalmedium (Tabelle 14.2 und 14.3) wurden keine Vitamine zugefügt.

Tabelle 14.2: Minimalmedium [VOGEL, 1956]

Substanz	Massenkonzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Na <sub>3</sub> -Citrat · 2 H <sub>2</sub> O	2,85
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
Uridin	2,44
Xylose	10,0

Tabelle 14.3: Spurenelementelösung für das Minimalmedium [VOGEL, 1956]

Substanz	Massenkonzentration [mg L <sup>-1</sup> ]
Citronensäure · H <sub>2</sub> O	5
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	5
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1
CuSO <sub>4</sub>	0,16
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,037
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,05

Die Spurenelementelösung wurde als 10000fache, sterilfiltrierte Stammlösung aufbewahrt. Die Salzlösung (Na<sub>3</sub>-Citrate · 2 H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, und CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) wurde aus der 50fachen sterilfiltrierten Stammlösung hergestellt. Die Kohlenstoffquelle (Xylose), das Uridin und das Antischaummittel (0,1 mL/L Ucolub N115) wurden 30 min bei 121°C sterilisiert. In der Zufütterungslösung ist statt Xylose als Kohlenstoffquelle 170 g/kg Maltose enthalten. Der Uridingehalt beträgt 6 g/L. Die übrigen Salze und Spurenelemente wurden in der doppelten Konzentration des Vogel-Minimalmedium (Tabelle 14.2 und 14.3) hinzugefügt.

### 14.2.3 *C. purpurea*-Kultivierung (Kap. 6)

Das T25N-Medium (Tabelle 14.4) wurde mit 1,8 L Leitungswasser aufgefüllt, mit konzentriertem Ammoniak auf pH 5,2 eingestellt und anschließend bei 105°C 30 min autoklaviert. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte in einem speziellen Inoculum-Medium (Tabelle 14.5).

Tabelle 14.4: T25N-Medium [AMICI *et al.*, 1967]

Substanz	Massenkonzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Saccharose	300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
Citronensäure-1-hydrat	15,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,0
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,12
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,007
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,006
Nicotinsäureamid	0,00075

Tabelle 14.5: Inoculum-Medium [AMICI *et al.*, 1967]

Substanz	Massenkonzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Saccharose	100,0
Citronensäure-1-hydrat	10,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,12
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,007
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,006
Nicotinsäureamid	0,00075

Das Inoculum-Medium wurde mit Leitungswasser angesetzt, mit 32 % (w/v) Ammoniaklösung auf pH 5,2 eingestellt und anschließend bei 105°C für 20 min autoklaviert. Die 1. Vorkultur wurde in einem verdunkelten Rotationsschüttler (Certomat S mit Inkubationshaube HK, B. Braun Biotech International, Melsungen) bei 24°C und 200 rpm 5 Tage in Schüttelkolben kultiviert, überimpft und anschließend wiederum 2 bis 3 Tage geschüttelt. Die

Vorkultur wurde durch Zentrifugation (6000 UpM, 20 min, 4°C) geerntet (Kühlzentrifuge: Sigma 3K20, B. Braun Biotech International, Melsungen). 200 mL einer 10%igen Zellsuspension wurde als Inoculum verwendet [MENGE, 1999].

#### 14.2.4 *S. yanoikuyae*-Kultivierung (Kap. 7)

In Tabelle 14.6 wird die Zusammensetzung des MM-Brunn-Mediums angegeben. Die Lösungen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt. Die Spurenelementelösung SL-4 wurde in 900 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst und mit 100 mL der Spurenelementelösung SL-6 versetzt. Für das MM-Brunn-Medium wurden 100 mL 10fach konzentrierte Mineralsalzlösung und 10 mL Spurenelementelösung SL-4 mit 890 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1 L aufgefüllt.

Tabelle 14.6: MM-Brunn-Medium

	Substanz	Massenkonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]
10fach konzentrierte Mineralsalzlösung	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	24,4
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15,2
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5
Spurenelementelösung SL-6	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,03
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,3
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,2
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01
Spurenelementelösung SL-4	$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,03
	EDTA	0,5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2

#### 14.2.5 *S. cerevisiae*-Kultivierung (Kap. 8, 9 und 10)

Die Zusammensetzung des Schatzmann-Mediums wird in Tabelle 14.7 angegeben.

Es wurden eine Mineralsalzlösung und eine Vitaminlösung mit der jeweils 1000-fachen Konzentration in destilliertem Wasser angesetzt. 2,2 L Leitungswasser wurden mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf pH 2 eingestellt.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  wurden gelöst, bevor die Mineralsalzlösung und die übrigen Komponenten außer der Glucose, die extra autoklaviert wurde, zugegeben wurden. Anschließend wurde der auf pH=5-6 angestiegene pH-Wert mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf pH 4 eingestellt. Die Glucose und die Vitaminlösung wurden vor dem Animpfen

steril injiziert. Na-Citrat wurde nur in der 50-mL-Vorkultur verwendet, die bei 30°C mit 130 UpM für 16 h inkubiert wurde.

Tabelle 14.7: Schatzmann-Medium [SCHATZMANN, 1975]

	Substanz	Massenkonzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Komponenten	Glucose	30,0
	Na-Citrat	5,8
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,9
	KCl	0,9
	Mineralsalzlösung	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		0,42
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O		1,5 · 10 <sup>-2</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		0,9 · 10 <sup>-2</sup>
MnSO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		1,05 · 10 <sup>-2</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O		0,24 · 10 <sup>-2</sup>
Vitaminlösung		m-Inosit
	Ca-Pantothenat	3,0 · 10 <sup>-2</sup>
	Thiamin · HCl	0,6 · 10 <sup>-2</sup>
	Pyridoxol · HCl	0,15 · 10 <sup>-2</sup>
	Biotin	0,3 · 10 <sup>-4</sup>

### 14.3 Analytik

Die Beschreibung der Analytik von Kultivierungsprozessen sind den *standard operation procedures* (SOP) des TCI entnommen worden (Intranet TCI).

#### **Zellzahl (ZZ)**

Die Zellzahl pro mL wird durch Zählen der Zellen unter einem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung mit Hilfe einer Helber-Kammer für Bakterien und einer Neubauer-Kammer für Hefen ermittelt. Die Proben werden mit 0,9 %iger wäßriger NaCl-Lösung so verdünnt, daß sich in einem Großquadrat etwa 50-100 Zellen befinden.

#### **Abgasanalytik (Abgassauerstoff und -kohlendioxid)**

Die Abgasanalyse wird mit dem EGAS 1 (Hartmann & Braun, Frankfurt a. M.) durchgeführt. Der Sauerstoffgehalt wird elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Ein auf Kohlendioxid sensibilisiertes, einstrahliges IR-Photometer nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Die Kalibrierung der Analysegeräte erfolgt automatisch oder manuell mit Eichgas der Zusammensetzung 1,98 % CO<sub>2</sub>, 19,0 % O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>.

#### **Biotrockenmasse (BTM)**

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgt gravimetrisch. Dazu werden je Probe 10 mL Kulturlösung in sogenannte Falcon-Gefäße (50ml, Greiner) mit bekanntem Leergewicht gefüllt, mit 10 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung (aq.) verdünnt, um möglichst alle löslichen Bestandteile in den Überstand zu überführen und in einer Zentrifuge (Modell J2-21, Rotor JA-14, Beckmann) 20 min bei 6000 · g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Nach Trocknung des Zell-Pellets im Trockenschrank bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz (24 h) wird das Falcon-Gefäß erneut ausgewogen. Die Biotrockenmasse ergibt sich aus der Massendifferenz zwischen dem gefüllten und dem leeren Falcon-Gefäß.

Von *Claviceps purpurea* werden 2 ml Kulturprobe mit Hilfe einer Absaugeinrichtung unter Wasserstrahlpumpenvakuum durch einen vorgewogenen Cellulose-Nitratfilter (Ø 0,45 µm Porenweite, Sartorius, Göttingen) gesaugt. Die Filter werden anschließend bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und erneut gewogen. Die BTM wird aus der Massendifferenz bestimmt.

#### **Proteinbestimmung durch BCA-Test**

In Form des wasserlöslichen Na-Salzes ist die Bicinchoninsäure ein sensitives, stabiles und hochspezifisches Nachweisreagenz für Cu<sup>+</sup>, welches in Anwesenheit von Protein durch Reduktion von Cu<sup>2+</sup> entsteht. Die Bicinchoninsäure bildet mit dem einwertigen Cu<sup>+</sup> in alkalischer Lösung einen intensiv purpurfarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der Test wird auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Eichstammlösung wird eine Albuminlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL (Kontrollwert: E<sub>280</sub> = 0,75) hergestellt.

Die Gebrauchslösung wird unmittelbar vor der Messung aus den beiden Standardlösungen A und B (Sigma, Deisenhofen) im Verhältnis A:B wie 50:1 hergestellt. Nach Inkubation der Mikrotiterplatte (ca. 60 min bei 37°C) wird die Extinktion am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm in Doppelbestimmung gemessen. Über die Eichgerade der Standards wird die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

### **Ethanol-Bestimmung**

Die Ethanol-Konzentration wird in einem Bereich von 0-15 g/L mit einem Shimadzu 14B Gaschromatographen bestimmt. Die Alkohole werden über eine Chromosorb 101-Säule getrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor detektiert. Die Daten werden mit der Class-VP-Software von Shimadzu auf einem Rechner aufgenommen und ausgewertet. Es wird mit vier Standards kalibriert. Die Auswertung der Proben erfolgt über eine Kalibration mit einem internen Standard.

Gaschromatograph:	Shimadzu Gas-Chromatograph GC-14B
Datenaufnahme und-auswertung:	ClassVP 4.2
Trägergas:	Stickstoff (Carrier Flow 38 mL/min, 220 kPa)
Brenngas:	Wasserstoff (65kPa), synth. Luft (50 kPa)
Säule:	Chromosorb 101, 80/100, Edelstahlsäule 6' x 1/8"
T <sub>säule</sub> :	160°C
T <sub>injektor</sub> :	180 °C
T <sub>detektor</sub> :	220 °C
Probenvolumen:	1 µL
Interner Standard:	n-Propanol (8 g/L)
Probenvorbereitung:	450 µL Probe (abzentrifugiert) + 50 µL Standard

### **Optische Dichte (OD) (online)**

Die optische Dichte (OD<sub>590</sub>) der Kulturlösung wird während der Kultivierung als Extinktion online bei einer Wellenlänge von 590 nm im Photometer mit Hilfe einer Durchflußküvette der Schichtdicke 0,2 mm gemessen (590 nm, Photometer Pharmacia, Schweden). Die Küvette befindet sich im Bypass.

### **pH-Wert**

Zur Messung des pH-Wertes wird eine sterilisierbare Einstabmeßkette (Mettler-Toledo, Schweiz) verwendet, die mit der Steuereinheit eines Biostaten (B. Braun Biotech International, Melsungen) verbunden ist. In dieser befinden sich eine Glas- und eine Vergleichselektrode, die zusammen eine galvanische Kette bilden. Die eigentliche Meßgröße ist die Spannung (Summe der Grenzflächenpotentiale in der Lösung), die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Der Zusammenhang zwischen der Spannung und dem pH-Wert ist über die Nernst'sche Gleichung gegeben. Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgt vor dem Autoklavieren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0). Zwischen den Messungen wird die Elektrode in 3M Kaliumchloridlösung gelagert. Die Reinigung erfolgt in Pepsin-Lösung.

***pO<sub>2</sub>-Wert (Gelöstsauerstoff)***

Der Gelöstsauerstoff wird mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Mettler-Toledo, Schweiz) als Sauerstoffpartialdruck nach dem polarographischen Prinzip (Clark-Prinzip) gemessen. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, die die Meßlösung von der Ag-Anode und Pt-Kathode trennt und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert.

Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren im Fermenter-System kalibriert (Zwei-Punkt-Kalibration). Dabei wird zunächst durch Begasung mit Stickstoff der 0%-Wert für pO<sub>2</sub> festgelegt. Der 100%-Wert wird durch Begasung mit Druckluft unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl und Begasungsrate) eingestellt.

Die während der Fermentation gemessenen Werte geben die relative Sauerstoffsättigung (%-rel. Sättigung) an und werden in dieser Arbeit als Gelöstsauerstoffgehalt [%] bezeichnet.

***Glucose-Analytik mit dem Glucoseanalysator***

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgt mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select (Yellow Springs Instruments, USA). Der Analyt wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entsteht. Dieses wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelluloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert. Die Kalibrierung des Analysators erfolgt mit Hilfe einer Standardlösung der Glucosekonzentration 2 g/L.

## 14.4 Verwendete Geräte

In Tabelle 14.8 werden die für die einzelnen Kultivierungen verwendeten Meßgeräte aufgeführt.

Tabelle 14.8: Meßgeräte für die Kultivierungen

### ***E. coli*-Kultivierungen (Kap. 4)**

Meßgröße	Meßgerät	Hersteller
Gelöstsauerstoff	pO <sub>2</sub> -Sonde (Kap. 14.3)	Ingold, Schweiz
Optische Dichte	Photometer Novaspec (Kap. 14.3)	Pharmacia, Schweden
Zuflußrate	Waage	Sartorius, Göttingen
Abgas-CO <sub>2</sub>	UNOR 6 N (Kap. 14.3)	Maihak, Hamburg
Abgas-O <sub>2</sub>	OXOR 610 (Kap. 14.3)	Maihak, Hamburg
Glucose	YSI 2700 Select (Kap. 14.3)	Yellow Springs Instruments, USA
Tyrosin, Tryptophan	HPLC (automatisierte Derivatisierung mit ortho-Phtaldialdehyd- Mercaptoethanol)	ERC, Gesellschaft für den Ver- trieb wissenschaftlicher Geräte m.b.H., Regensburg
Acetat, Formiat	HPLC-Säule Shodex Ionpak KC-811 mit der Vorsäule Ionpak KC-810 P	Showa Denko, Japan

**A. niger-Kultivierung (Kap. 5)**

Meßgröße	Meßgerät	Gerät, Hersteller
Abgas-CO <sub>2</sub>	Unor 610 (Kap. 14.3)	Maihak, Hamburg
Trübung	Trübungssonde AS 82, AF 44 S	Institut für Molekulare Analytik GmbH
Biotrockenmasse	10 mL Kulturbrühe filtriert, gewaschen mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> und getrocknet bei 40°C unter Vakuum bis zur Gewichtskonstanz (Kap. 14.3)	Filtration durch einen Rotbandfilter (Schleicher & Schüll, Dassel), Differenzwägung mit Waage, Sartorius analytic, Göttingen
Xylose	HPLC bei 25°C, Schwefelsäure (5 mmol/L) als mobile Phase (Volumenstrom = 0,5 ml/min)	Aminex-Säule HPX-87H (300 x 7,8 mm) (BioRad) Brechungsindex und UV-Detektor (Techlab, USA) zur Detektion
Maltosezufütterung	Waage	Sartorius industry, Göttingen
Antischaumzugabe		
GFP-Konzentration	Fluorometrischer Assay mit reinem S65TGFP zur Kalibration	Clontech Produkt Protokoll: Living Colors™, GFP Application Notes (PT2040-1), Clontech, USA
	Exzitation 488 nm (slit 3 nm), Emission 511 nm (slit 7 nm), Temperatur = 25°C ± 0,1, pH = 8,0	Perkin Elmer Lumineszenz Spektrometer LS 50 B Software FL WinLab Version 2.00 (Perkin Elmer, USA)

**C. purpurea-Kultivierungen (Kap. 6)**

Meßgröße	Meßgerät	Hersteller
Gesamtalkaloidgehalt	modifizierter van-Urk-Test mit dem Photometer UVIKON 922 [MAROSE, 1995]	Kontron Instruments, Neufahrn
Proteingehalt	Proteintest DC Protein Assay® (Kap. 14.3) mit dem Immunoreader NJ-2000 [BOEHL, 1998]	Bio-Rad Laboratories, USA Intermed
Biotrockenmasse	Massendifferenzbestimmung (Kap. 14.3) nach Filtration unter Wasserstrahlpumpenvakuum durch Cellulose-Acetatfilter (Ø 47 mm, 0,45 µm Porenweite) [BOEHL, 1998]	Sartorius, Göttingen

***S. yanoikuyae*-Kultivierungen (Kap. 7)**

Meßgröße	Meßgerät	Hersteller
Proteingehalt	Proteintest <i>DC</i> Protein Assay <sup>®</sup> (Kap. 14.3) mit dem Immunoreader NJ-2000 [SCHIPPERS, 1999]	Bio-Rad Laboratories, USA
Sophoroselipidgehalt	Gemäß der Anthronmethode wurde die Extinktion der Lösungen bei 620 nm mit einem Zweistrahl-Spektrophotometer (UVI-KON 922) gemessen [SCHIPPERS, 1999]	Kontron Instruments, Neufahrn
Phenanthren	Kultivierungsproben mit Dichlormethan ausgeschüttelt und anschließend mit Hilfe einer Kapillarsäule im Gaschromatographen 5890 2 (Chromatographiesäule HP-5MS, 30 m · 0,25 mm) aufgetrennt und mittels Quadrupol-Massenspektrometer 5972 A detektiert, Autosampler 5960, Software HP G1034C MS ChemStation C.02.03 [SCHIPPERS, 1999]	Hewlett-Packard, Waldbronn

***S. cerevisiae* Kultivierung (Kap. 8 und 9) und *E. coli*- Kultivierung (Kap. 9)**

Meßgröße	Meßgerät	Hersteller
Abgas-CO <sub>2</sub>	EGAS 1 (Kap. 14.3)	Hartmann & Braun, Frankfurt a. M.
Abgas-O <sub>2</sub>		
Gelöstsauerstoff	pO <sub>2</sub> -Sonde (Kap. 14.3)	Ingold, Steinbach
Volumenstrom NaOH	Biostat B	B. Braun Biotech International, Melsungen
mittlere Zellgröße, Anteile der Zellzyklusphasen	Durchflußcytometer Coulter Epics XL [RIESEBERG, 1999]	Coulter Corporation, USA
Ethanolgehalt	Gas-Chromatograph GC-14B (Kap. 14.3)	Shimadzu, Japan
pH-Wert	pH-Elektrode	Ingold, Steinbach
Optische Dichte	Zweistrahl-Spektrophotometer UVIKON 922 (Kap. 14.3)	Kontron Instruments, Neufahrn

**Vitalitätsbestimmung (Kap. 10)**

Meßgröße	Meßgerät	Hersteller
Totzellzahl	Lichtmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung, Zählung in Helber-Zählkammer nach Anfärbung mit Trypan Blau [FINKE, 1998]	Olympus, Japan

## 14.5 Technische Zeichnungen

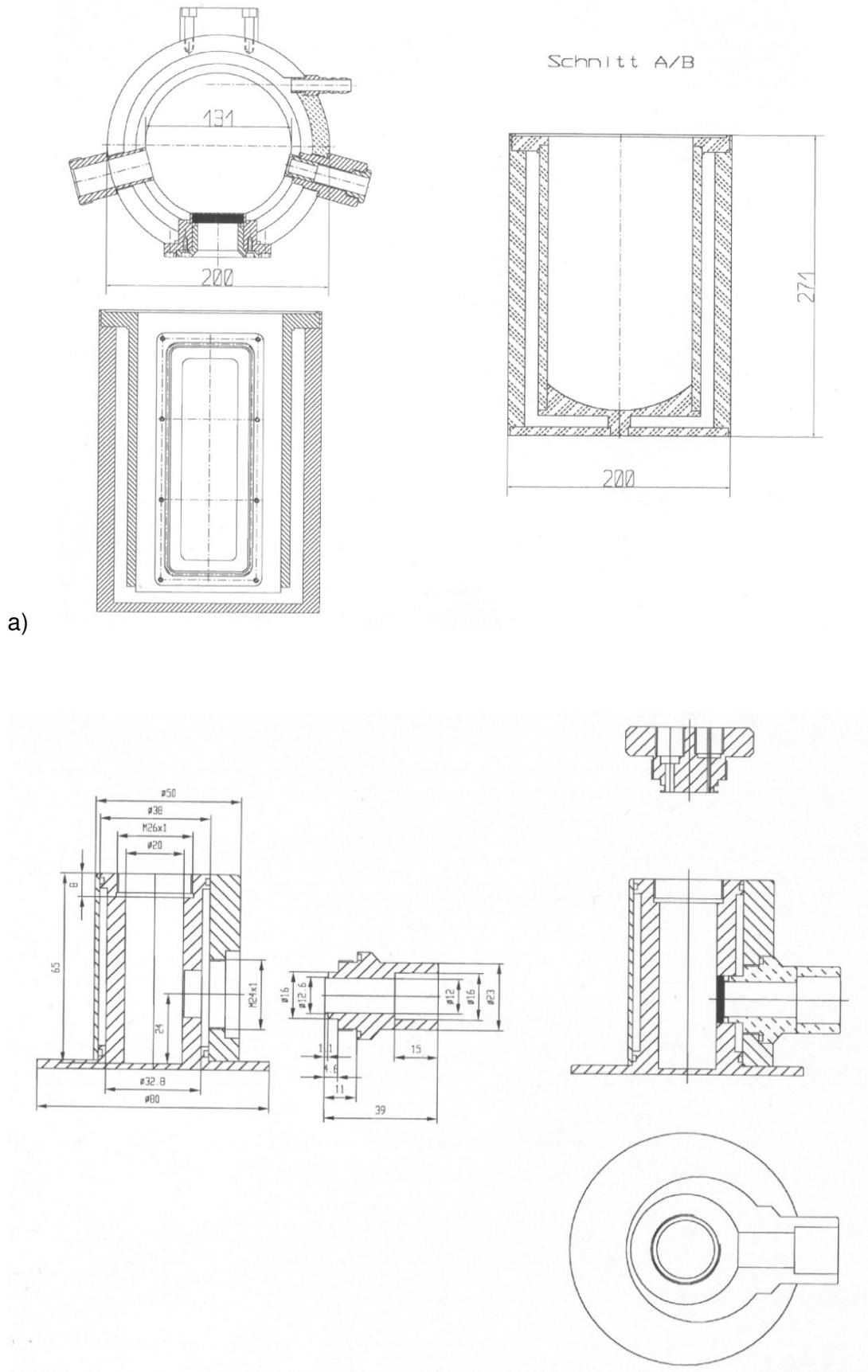


Abb. 14-1 Technische Zeichnungen a) vom 2L-Bioreaktor, b) vom 10-mL-Minireaktor