

**Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie  
in der Nahrungsmittelindustrie  
bei der Aufarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe**

**Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

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

**genehmigte Dissertation**

**von**

**Dipl.-Chem. Christian Harbeck  
geboren am 11.08.1972 in Gehrden**

**Hannover, Juni 2003**

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 12. Juni 2003

# Abstract

Christian Harbeck

## Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in der Nahrungsmittelindustrie bei der Aufarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe

Für eine effiziente Automatisierung von industriellen Produktions- und Aufarbeitungsprozessen ist eine schnelle Online-Analytik notwendig. Häufig erfordern die bislang eingesetzten Methoden eine Entnahme von Proben oder liefern die Ergebnisse erst mit einer erheblichen Zeitverzögerung, wodurch eine schnelle Prozeßkontrolle nicht möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenz- und der nahen Infrarot-Spektroskopie (NIR-Spektroskopie) in der Nahrungsmittelindustrie untersucht. Die in dieser Arbeit beschriebenen Anwendungen gliedern sich in drei Hauptteile.

Im ersten Arbeitsteil wird die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Beobachtung der chromatographischen Melasseentzuckerung eingesetzt. Hierbei konnten die Melasseinhaltsstoffe Tyrosin, Serin, Threonin und Asparagin in Eluatproben aus dem Industrieprozess bestimmt werden. Für die Aminosäure Serin wurde mit Hilfe einer chemometrischen Datenauswertung eine Online-Analytik entwickelt. Die Validierung des Verfahrens erfolgte am Industrieprozess über einen Zeitraum von 18 Monaten.

Ebenfalls für den Prozess der chromatographischen Melasseentzuckerung wurden die Einsatzmöglichkeiten der NIR-Spektroskopie aufgezeigt. Für die Substanz Betain konnte eine charakteristische Bande im NIR-Bereich gefunden werden. Anhand von Standards erfolgte eine Kalibration für Betain, die im Anschluß erfolgreich zur Bestimmung von Betain in Eluatproben aus dem Industrieprozess der Melasseentzuckerung genutzt werden konnte.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Sauerstoffindikator Resazurin in Verbindung mit Fluoreszenzmessungen zur Beobachtung anaerober Prozesse eingesetzt. Bei Kultivierungen des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* konnte ein Anwachsen der Zellen mit Hilfe des Indikators detektiert werden. Bei Verwendung eines Industriemediums auf Lactatbasis konnte sogar eine Diauxie mit anschließender Versporung der Zellen durch Messungen der Fluoreszenz beobachtet werden.

**Stichworte:** 2D-Fluoreszenzspektroskopie, NIR-Spektroskopie, Online-Prozessbeobachtung, Melasseentzuckerung, Serin, Betain, anaerobe Fermentation, Resazurin

## Abstract

Christian Harbeck

Application of the 2D-fluorescence spectroscopy in the food industry  
for the processing of agricultural commodities

The basic requirement for an efficient industrial production control is a fast analytic method. Most of the common analytic methods need sample extraction from the process or provide results only with a significant time delay. For both cases, the implementation of a fast process control is impractically.

The aim of this work is to show the potential application of fluorescence and near infrared (NIR) spectroscopy in the food industry. The applications described in this work are divided into three major parts.

The first part deals with the chromatographic molasses desugarization process. By using 2D-fluorescence measurements, it was possible to determine the compounds tyrosine, serine, threonine and asparagine in molasses samples from the industrial chromatographic process.

Via a chemometric data processing an on-line analytic method was established for the amino acid serine. The system was validated and used directly at the industrial process over a period of 18 months.

Furthermore, for the chromatographic molasses desugarization process the applications of the NIR spectroscopy were demonstrated. For the molasses compound betaine a characteristic bond in the NIR region was found. The system was calibrated with pure betaine solutions. Afterwards, the calibration was successfully applied for the quantification of betaine in molasses desugarization samples.

In the third part, the oxygen indicator resazurine was utilised in combination with fluorescence measurements for the surveillance of anaerobic fermentation processes. At first, the fluorescent properties of resazurine were characterised. Afterwards, the fluorescent dye resazurine was used during batch cultivation of the strict anaerobic bacteria *Clostridium formicoaceticum*. In addition to surveying the growth of the cells, the system was able to monitor changes in the cell metabolism, e.g. a diauxy with a following spore formation.

**Keywords:** 2D-fluorescence spectroscopy, NIR spectroscopy, on-line monitoring, molasses desugarization, serine, betaine, anaerobic fermentation, resazurine

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1999 bis April 2003 am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich für die fachliche Unterstützung und die mir angebotenen Arbeitsmöglichkeiten danken, die das Gelingen der Arbeit ermöglichten.

Herrn PD Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Meinen langjährigen Freunden Torsten Knüttel und Jörg Schaper danke ich für ihr Interesse und ihre motivierende Unterstützung, mit der sie mein Studium und die Arbeit während meiner Promotion bereicherten.

Bei meiner Kollegin Dörte Solle möchte ich mich für ihre Ausdauer und Verständnis bedanken, mit der sie mir die Geheimnisse der Chemometrik jedesmal ein wenig näher brachte.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei ...

- ... den Mitarbeitern der AMINO GmbH für ihre freundliche Unterstützung bei meinen zahlreichen Besuchen im Werk und ihre Hilfe bei Analyse von Melasseproben.
- ... Martina Weiß für ihre stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.
- ... Florian Irtel, der mir immer mit ‚akkumulanten‘ Ratschlägen zur Seite stand.
- ... den Kollegen im Neubau für das angenehme Arbeitsklima mit zahlreichen anregenden Gesprächen.

Für die hilfreichen Korrekturen dieser Arbeit danke ich Michael Fritsche, Kai Muffler, Timo Klewitz und allen weiteren, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, möchte ich für ihre Hilfe und ihr Verständnis bei allen meinen Vorhaben danken.

Zuletzt danke ich Katrin für ihr Verständnis, ihre Zuneigung und ihre Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1	Die chromatographische Melasseentzuckerung .....	3
2.2	Einflüsse auf die Fluoreszenz.....	6
2.3	Infrarot(IR)-Spektroskopie und nahe Infrarot(NIR)-Spektroskopie .....	7
2.4	Multivariate Datenanalyse.....	9
2.4.1	Darstellung von Datenmatrizen.....	9
2.4.2	Faktoren- und Hauptkomponentenanalyse.....	10
2.4.3	Partial Least-Square-Regression (PLS).....	11
2.5	Beschreibung anaerober Fermentationsprozesse .....	13
2.5.1	Clostridien und Endosporen .....	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
3.1	Verwendete Prozeßspektralphotometer.....	16
3.1.1	BioView-Sensor .....	16
3.1.2	Fluoreszenzspektralphotometer F-4500 .....	18
3.1.3	Vergleich der Fluoreszenzspektralphotometer .....	18
3.2	Durchführung der Fluoreszenzmessungen .....	20
3.3	Optimierung der Meßeinstellung .....	21
3.3.1	Optimierung der Photomultiplierspannung (Gain) .....	21
3.3.2	Optimierung der internen Meßwiederholungen .....	22
3.4	Das verwendete NIR-Spektrometer .....	24
<b>4</b>	<b>Übersicht über die Experimente</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Prozeßbeobachtung der chromatographischen Melasseentzuckerung</b> .....	<b>26</b>
5.1	Analytik der chromatographischen Melasseentzuckerung – Stand der Technik .....	26
5.2	Offline-Untersuchungen an Proben aus einem Chromatographiezyklus .....	27
5.2.1	Datenauswertung mittels Hauptkomponentenanalyse .....	27
5.2.2	Detektion von Tyrosin im Trennprozeß .....	30
5.2.3	Vergleich anderer Melasseinhaltsstoffe mit Fluoreszenzdaten .....	32
5.2.3.1	Korrelation von Asparagin und Threonin mit Fluoreszenzdaten .....	32
5.2.3.2	Untersuchungen zur Korrelation von Serin mit Fluoreszenzdaten .....	33
5.2.3.3	Identifikation des Fluorophors (Fluoreszenz Ex270/Em470 nm) .....	34
5.3	Entwicklung eines Modells zur Online-Vorhersage von Serin .....	36
5.3.1	Vorstellung der Modelle zur Vorhersage von Serin im Überblick .....	36

5.3.2	Bestimmung der Modellwahl am Kalibrationsdatensatz .....	37
5.3.3	Experimente zur Unterstützung der Modellwahl .....	38
5.4	Validierung des Modells an weiteren Chromatographiezyklen .....	39
5.4.1	Test über 18 Monate bei Verwendung verschiedener Melassechargen .....	40
5.4.2	Überprüfung des Modells für außergewöhnlich hohe Serinkonzentrationen.....	41
5.5	Vorteile der Online-Fluoreszenz in der Praxis .....	43
5.6	Zusammenfassung .....	45
<b>6</b>	<b>Einsatz der NIR-Spektroskopie bei der chromatographischen Melasseauftrennung</b>	<b>47</b>
6.1	NIR-Spektroskopie in der Zuckerindustrie – Stand der Technik .....	47
6.2	NIR-Spektrum von Wasser und wäßrigen Lösungen .....	48
6.3	NIR-Differenzspektren wichtiger Melasseinhaltsstoffe .....	49
6.4	Erstellung einer Kalibrationsgeraden für Betain .....	51
6.5	Überprüfung der Kalibration nach dem Standardzusatzverfahren .....	53
6.6	Validierung der Methode für einen kompletten Trennzyklus .....	54
6.7	Zusammenfassung .....	55
<b>7</b>	<b>Überwachung anaerober Prozesse.....</b>	<b>57</b>
7.1	Anwendung von Resazurin – Stand der Technik .....	57
7.2	Fluoreszenzeigenschaften des Sauerstoffindikators Resazurin .....	58
7.2.1	Das Fluoreszenzspektrum von Resazurin und seiner Derivate .....	59
7.2.2	Fluoreszenz von Resazurin in Kulturmedien .....	61
7.2.3	Erstellung einer Kalibrationsgeraden für Resazurin .....	63
7.2.4	Reduktion von Resazurin mit Natriumthioglycolat .....	64
7.2.5	Test zur reversiblen Reduktion von Resazurin .....	65
7.3	Anwendung von Resazurin bei Kultivierungen von <i>Clostridium formicoaceticum</i> .....	67
7.3.1	Kultivierungsbedingungen .....	67
7.3.2	Kultivierungsverlauf auf einem Fructose-Medium .....	68
7.3.3	Einfluß der Toxizität von Sauerstoff auf anaerobe Kultivierungen .....	71
7.4	Überprüfung der Ergebnisse bei Verwendung eines Industriemediums .....	73
7.5	Zusammenfassung .....	75
<b>8</b>	<b>Schlußbetrachtungen .....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>81</b>
10.1	Abkürzungsverzeichnis .....	81
10.2	Chemikalien .....	81

---

10.3 Geräte .....	82
10.4 Referenzanalytik.....	82
10.4.1 Bestimmung von Aminosäuren in Eluatproben mit der HPLC.....	83
10.4.2 Bestimmung von Betain und Zuckern mit der HPLC .....	83
10.4.3 D-Glucose- und D-Fructose-Testkit.....	84
10.4.4 Essigsäure-Testkit .....	85
10.5 Kulturmedium Clostridium formicoaceticum .....	87
10.6 Zusammensetzung des Fluorophorengemisches A .....	88
10.7 Geräteeinstellungen.....	88
10.7.1 Meßeinstellungen für Eluatproben aus der Melasseaufreinigung .....	88
10.7.2 Meßeinstellungen für Untersuchungen mit Resazurin.....	89
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Auftrennung von weißem Licht in seine einzelnen Farbbestandteile wurde erstmals im Jahr 1666 von Isaac Newton untersucht. Aus damaliger Sicht schien dieser Effekt geisterhaft zu sein, weshalb Newton das Wort ‚Spektrum‘ verwendete, was aus dem Lateinischen übersetzt Geist oder Erscheinung bedeutet.

Die ersten klassischen spektroskopischen Untersuchungen wurden von Bunsen und Kirchhoff unter Verwendung eines Prismas durchgeführt [1]. Basierend auf diesen ersten Ergebnissen konnte eine Vielzahl spektroskopischer Analysemethoden entwickelt werden. Diese Methoden sind seit langem nicht mehr auf den sichtbaren Bereich beschränkt, inzwischen wird das elektromagnetische Spektrum in einem Bereich von ca.  $10^{12}$  Energieeinheiten genutzt, wobei die Energie direkt proportional zur Frequenz oder reziprok zur Wellenlänge ist.

Für spektroskopische Analysen werden die Wechselwirkungen zwischen Atomen mit elektromagnetischer Strahlung ausgenutzt. Durch die Messungen der Absorption oder der Emission von Strahlung können qualitative sowie quantitative Aussagen über die Struktur von Molekülen getroffen werden. Der entscheidende Vorteil spektroskopischer Methoden liegt in der schnellen nicht-invasiven Meßtechnik, mit der Prozeßdaten ohne Eingriffe in den Prozeß zur Verfügung stehen.

Die ständige Entwicklung und Anwendung neuer analytischer Techniken in der Nahrungsmittelindustrie wird durch ein steigendes Interesse der Verbraucher an der Zusammensetzung und der Sicherheit von Nahrungsmitteln erforderlich. Zusätzlich wird durch neue europäische Gesetze eine immer genauere Qualitätskontrolle im Produktionsprozeß notwendig [2]. Dies führt zu einem steigenden Bedarf an schnelleren, genaueren und kostengünstigen Analysemethoden. Die Methoden sollen zudem möglichst viele Informationen über den Prozeßablauf, Produktionsbedingungen sowie Zusammensetzung und Qualität der Nahrungsmittel liefern. Um alle diese Ziele erreichen zu können, werden viele klassische Analysemethoden durch neue spektroskopische Techniken ersetzt, die den hohen Anforderungen in der Nahrungsmittelindustrie gerecht werden und die ständig steigenden Qualitätskriterien erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Methoden der Fluoreszenz- und der NIR-Spektroskopie zur Prozeßbeobachtung eingesetzt werden. Die Anwendungsbeispiele beider Methoden werden für den Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung aufgezeigt. Zunächst werden die Möglichkeiten zur Bestimmung einzelner Substanzen untersucht. Die Ergebnisse sollen dann im Hinblick auf die Anwendbarkeit bei der industriellen Melasseentzuckerung an Realproben überprüft werden. Für die Aminosäure Serin wird der Aufbau einer Online-Analytik angestrebt, die für einen Einsatz in der Industrie zur direkten Prozeßkontrolle bei

verschiedenen Veränderungen im Trennprozeß validiert werden muß.

Als weiteres Anwendungsgebiet wird der Nachweis von Sauerstoff in Spurenkonzentrationen auf Basis der Fluoreszenz vorgestellt. Der industrielle Nutzen des verwendeten Sauerstoff-indikators soll anhand der Kultivierungen des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* unter Beweis gestellt werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Die chromatographische Melasseentzuckerung

Bei der industriellen Gewinnung von Zucker aus Zuckerrüben fallen große Mengen Melasse an. Etwa 80 % dieses Rohstoffes werden zur Zeit in chromatographischen Verfahren aufgetrennt, um eine gezielte Anreicherung wertvoller Inhaltsstoffe zu ermöglichen [3]. Viele Jahre wurde das Potential der Melasse als Ausgangsstoff für eine Weiterverarbeitung nicht erkannt, so daß die Melasse zur Schweine und Rindermast oder als Grundlage für Fermentationsprozesse [4] verwendet wurde.

Durch die allgemein gültigen Verkaufsbedingungen wird festgelegt, daß Handelsmelasse einen Trockensubstanzgehalt von mindestens 76,3 % bei einem Gesamtzuckergehalt von über 47 % enthalten muß. Der Großteil des Gesamtzuckers besteht aus Saccharose, die anderen Zucker – wie Glucose, Fructose und Raffinose – haben nur einen Anteil von weniger als 2 %. Die Nicht-Zuckerstoffe bestehen aus über 80 verschiedenen Substanzen, die in wechselnden Konzentrationen in der Melasse vorkommen können. Den größten Teil davon stellen die organischen Stickstoffverbindungen dar, die zum Teil einen hohen Marktwert besitzen. Deshalb werden vermehrt auch Verbindungen dieser Substanzklassen abgetrennt und aufgearbeitet.

Die Zuckerrübenmelasse wird bei der AMINO GmbH zunächst in sechs Chromatographiesäulen mit einem Volumen von jeweils 60 m<sup>3</sup> in Fraktionen aufgetrennt. Als Trennmateriale dient dabei ein Ionenaustauscherharz der Firma Finnsugar [5] und als Eluent wird heißes Wasser verwendet (90°C). Dadurch wird beim Trennprozeß die Diffusion erleichtert und möglichen Fäulniseffekten vorgebeugt.

Die Trennung der Zucker- und Nichtzuckerkomponenten auf dem mit Kalium- und Natriumionen beladenen Harz beruht auf dem Ionenausschlußeffekt und der Verteilungschromatographie. Beim Ionenausschluß wird die ionisierte Fraktion, d. h. die Asche, auf Grund der bereits in den Poren vorhandenen Ladungen am Eintreten in die Harzpartikel gehindert. Dadurch wird die Verweilzeit der Aschefraktion in der Trennkolonie verringert. Um ein Austauschen der Na<sup>+</sup>-Kationen im Harz und daraus resultierende Veränderungen der Trenneigenschaften zu verhindern, werden Ionen, die eine sehr hohe Affinität zum Träger besitzen, zuvor aus der Melasse abgetrennt. Dazu wird die Melasse vor der Chromatographie mit Carbonat behandelt, um schädigende Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu entfernen [6].

Die Trennkolonnen werden über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen kontinuierlich betrieben, bis sich zu viele Feststoffe aus der Melasse auf dem Harz ansammeln und die

Trennleistung der Säule somit abnimmt. Im Anschluß erfolgt eine Rückspülung, bei der die Verunreinigungen von der Säule entfernt werden. Zusätzlich wird das Harz bei der Rückspülung neu durchmischt, wodurch die Trennleistung des Harzes wieder verbessert wird [7]. Das Finnsugar-Harz kann dadurch über viele Jahre eingesetzt werden.

Ein vollständiger Chromatographiezyklus von der Aufgabe der Melasse bis zur Elution der einzelnen Fraktionen benötigt einen Zeitraum von etwa sechs Stunden. Auf Grund der Säulenhöhe ist es möglich, schon nach zwei Stunden die nächste Melassecharge auf die Säule aufzutragen. Durch diese Prozeßführung können gleichzeitig insgesamt drei Trennläufe hintereinander auf einer Säule durchgeführt werden. Neben der besseren zeitlichen Nutzung des gesamten Säulenvolumens kann die Dauer für einen Chromatographiezyklus auf etwa zwei Stunden reduziert werden. Das Elutionsprofil einer Trennkolonne ist in vereinfachter Form in Abbildung 2.1 dargestellt.

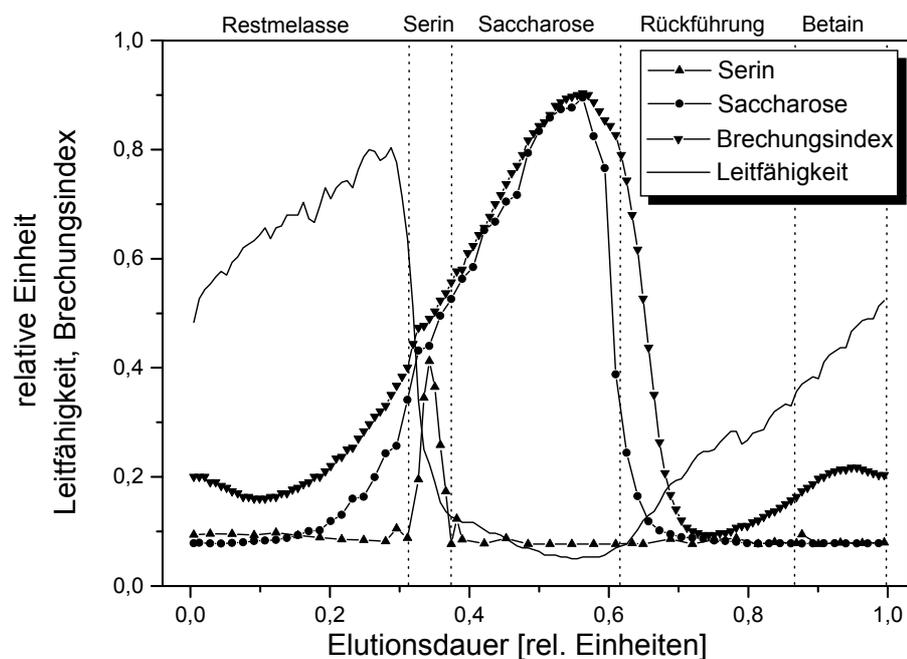


Abbildung 2.1: Elutionsprofil einer Trennkolonne, Melasseaufreinigung AMINO GmbH, Frellstedt, mit Schnittführung der industriellen Anlage: Restmelasse, Serin, Saccharose, Rückführung, Betain [8]

Abbildung 2.1 zeigt die verschiedenen Fraktionen der chromatographischen Melasseentzuckerung mit den zugehörigen Schnittgrenzen. Die Fraktionen werden in einem vollautomatischen Prozeß der anschließenden Aufarbeitung zugeführt. Durch die Prozeßsteuerung wird der erste Schnitt nach etwa 40 Minuten vorgenommen. Die so erhaltene Fraktion wird als

Restmelasse bezeichnet und besteht vorwiegend aus Salzen anorganischer Säuren und Asche. Durch den hohen Anteil an Kalium kann diese Fraktion in der Landwirtschaft als Dünger eingesetzt werden.

Die zweite Fraktion wird als Serinfraktion bezeichnet, da hier innerhalb eines kurzen Zeitraums von 4 Minuten die Aminosäure Serin gewonnen wird. Bisher werden zur Festlegung der Schnittgrenzen dieser Fraktion physikalische Größen wie Leitfähigkeit oder Brechungsindex genutzt. Die Serinelution beginnt einige Zeit nach einer Abnahme der Leitfähigkeit, wobei der zeitliche Abstand zwischen Leitfähigkeitsänderung und Auftreten der Serinfraktion nicht immer gleich ist. Eine sichere Festlegung der Schnittgrenzen für die Serinfraktion ist somit nicht möglich. Um durch eine mögliche falsche Wahl der Schnittgrenzen Serinverluste zu vermeiden, werden die Fraktionen ca. 6 Minuten vor und nach den berechneten Schnittgrenzen aufgefangen und eingedampft. Das dabei erhaltene Produkt wird im Anschluß einer neuen Melassecharge zugesetzt und mit dieser zusammen erneut chromatographisch aufgetrennt. Der Nachteil dieser Methode sind zusätzliche Kosten, ein höherer Energieverbrauch und eine Belastung der Umwelt durch höhere Abwassermengen.

Nach der Serinfraktion folgt die sogenannte Produktfraktion, die den Großteil der Saccharose enthält. Von der Saccharose werden noch verbliebene Farbstoffe in einem weiteren Prozeßschritt abgetrennt. Die gereinigte Saccharosefraktion wird danach als Flüssigzucker vermarktet. Die gewünschte Süße des Flüssigzuckers wird durch Invertieren der Saccharose eingestellt. Bei dieser Reaktion wird die Saccharose durch saure Hydrolyse zu Glucose und Fructose gespalten.

Nach der Produktfraktion wird durch die Prozeßsteuerung die Rückführungsfraction abgetrennt, die wieder oben auf der Säule aufgegeben wird. Bevor der nächste Chromatographiezyklus beginnt, wird die Betainfraktion gewonnen. Betain kann direkt als Nahrungsmittelzusatz verwendet oder nach einer weiteren Aufreinigung für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden.

Um eine möglichst hohe Produktreinheit der einzelnen Fraktionen erzielen zu können, ist eine schnelle und genaue Online-Analytik notwendig. Für den Zucker Saccharose ist eine sehr gute spezifische Detektion mit Hilfe der bisher verwendeten physikalischen Parameter möglich. Bei den anderen Fraktionen ließe sich durch effizientere Online-Meßsysteme die Prozeßführung verbessern. Durch die höhere Produktreinheit könnten weniger Ressourcen eingesetzt werden, wodurch eine Optimierung durch Verbesserung der Prozeßanalytik aus ökonomischer sowie ökologischer Sicht sinnvoll ist.

## 2.2 Einflüsse auf die Fluoreszenz

Fluoreszenz wird als spontane, ungerichtete Emission von Licht bezeichnet, die von fluoreszierenden Molekülen nach einer elektronischen Anregung ausgestrahlt wird. Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, die allgemein als Abgabe von Energie unter Emission eines Lichtquants definiert ist [9].

Fluoreszierende Moleküle (Fluorophore) stehen in ständiger Wechselwirkung mit ihrer Umgebung und können daher durch lokale Veränderungen beeinflusst werden. In der folgenden Tabelle 2.1 sind die wichtigsten physikalischen und chemischen Einflußgrößen dargestellt, die sowohl zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität als auch zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums eines Fluorophors führen können.

Tabelle 2.1: Einflüsse auf die Fluoreszenz

Art der Beeinflussung	Einflußgröße
Chemisch	pH-Wert Lösungsmittel
Physikalisch	Temperatur Quenching „Inner-filter“-Effekt Kaskaden-Effekt Photobleaching

Sowohl der pH-Wert als auch die Wahl des Lösungsmittels üben einen wesentlichen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität und die Lage des Fluoreszenzpeaks eines Fluorophors aus. Durch den pH-Wert oder das Lösungsmittel kann das  $\pi$ -Elektronensystem fluoreszierender Moleküle unterschiedlich stabilisiert werden, woraus eine Veränderung der elektronischen Anregbarkeit der Moleküle und damit der Fluoreszeigenschaften resultiert [10-12].

Mit zunehmender Temperatur ist auch eine Zunahme der Molekülbewegung verbunden. Dadurch steigt auch die Zahl der deaktivierenden Stöße angeregter Moleküle und die Fluoreszenzintensität nimmt ab, weil die Energieabgabe durch Stöße mit anderen Molekülen auf Kosten der Energieabgabe durch Lichtstrahlung zunimmt. Deswegen ist im allgemeinen mit steigender Temperatur eine Abnahme der Fluoreszenzintensität verbunden [13]. Aus diesem Grund sollte die Temperatur während der Fluoreszenzmessung konstant gehalten werden.

Befinden sich neben dem Fluorophor noch weitere Substanzen in einer Lösung, so kann eine strahlungslose Energieabgabe durch inaktivierende Stöße auftreten. Dabei kommt es durch Fremdlöschung (Quenching) zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität [14].

Bei sehr hohen Konzentrationen einer fluoreszierenden Substanz kann das emittierte Fluoreszenzlicht in der Küvette durch andere Moleküle der selben Substanz erneut absorbiert werden. Dieser Vorgang wird als „Inner-filter“-Effekt bezeichnet und übt einen störenden Einfluß auf quantitative Fluoreszenzmessungen aus [14]. Deshalb ist es notwendig, vor einer quantitativen Bestimmung einer Substanz mittels Fluoreszenz den linearen Konzentrationsbereich zu ermitteln, bei dem dieser Effekt noch nicht auftritt. Durch Fluoreszenzmessungen im  $180^\circ$ -Winkel ("open-end" Anordnung) kann dieser Effekt minimiert werden.

Liegen mehrere, unterschiedliche Fluorophore nebeneinander vor, können Kaskaden-Effekte auftreten. Liegt das Anregungsmaximum eines Fluorophors bei einer ähnlichen Wellenlänge wie das Emissionsmaximum eines weiteren Fluorophors, so kann das Emissionslicht des letzteren zur Anregung des ersten Fluorophors verwendet werden. Besonders bei hohen Fluorophorkonzentrationen kann dies zu einer erheblichen Verringerung der meßbaren Fluoreszenzintensität führen.

### 2.3 Infrarot(IR)-Spektroskopie und nahe Infrarot(NIR)-Spektroskopie

Molekülschwingungen und -rotationen werden durch Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums angeregt. Dieser schließt sich an den sichtbaren Bereich bei längeren Wellenlängen an und wird auch als Wärmestrahlung bezeichnet, da sie von der Haut als Wärme empfunden wird. Eine schematische Übersicht der Einteilung des infraroten Lichtes ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

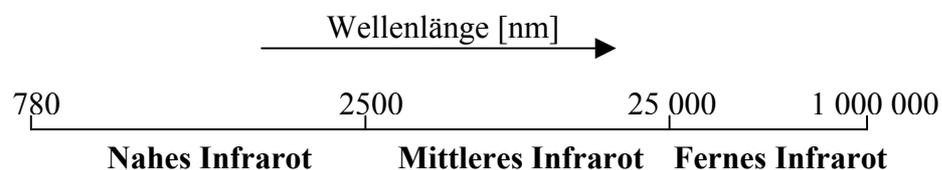


Abbildung 2.2: Unterteilung des infraroten Spektralbereiches

Um die Entstehung von NIR-Strahlung verdeutlichen zu können, läßt sich ein einfaches Modell aus der klassischen Mechanik heranziehen. Wenn Atome wie eine Punktmasse betrachtet werden, kann die Schwingung in einem Molekül aus zwei Atomen durch eine elastische Feder

beschrieben werden, durch die beide Atome miteinander verbunden sind. Die Energie dieser Schwingung wird mit dem Modell des harmonischen Oszillators beschrieben, dessen Energieniveaus in Abbildung 2.3 a dargestellt sind.

Bei der Übertragung dieses mechanischen Modells auf ein zweiatomiges Molekül sind einige Phänomene nicht erklärbar, wie beispielsweise die Dissoziation des Moleküls bei Einstrahlung genügend hoher Energie. Eine bessere Beschreibung bietet das Modell des anharmonischen Oszillators (s. Abbildung 2.3 b). Diese Potentialkurve hat einen asymmetrischen Verlauf und die Energieniveaus haben nicht mehr die gleichen Abstände. Durch dieses Modell ist eine Dissoziation des Moleküls erklärbar.

Unter Berücksichtigung der Quantentheorie gibt es nur diskrete Energie- und Schwingungszustände. Die Anregung einer Schwingung läßt sich anschaulich so vorstellen, daß das Molekül unter Absorption eines Lichtquants vom Schwingungszustand mit der Quantenzahl  $n$  in einen höheren Quantenzustand, z. B.  $n+1$ , übergeht. Die Energiedifferenz beider Zustände entspricht dabei der Energie des Lichtquants, die durch Absorption im IR-Spektrum detektiert werden kann. Die Wahrscheinlichkeit einer Anregung des Überganges von  $n = 0$  nach  $n = 1$  ist am größten und wird als Grundschiwingung bezeichnet. Diese Grundschiwingungen liegen im mittleren Infrarotbereich und werden von der klassischen IR-Spektroskopie erfaßt. Eine ausführliche Übersicht zu den Grundlagen der IR-Spektroskopie ist den Fach- und Lehrbüchern zu entnehmen [15-17].

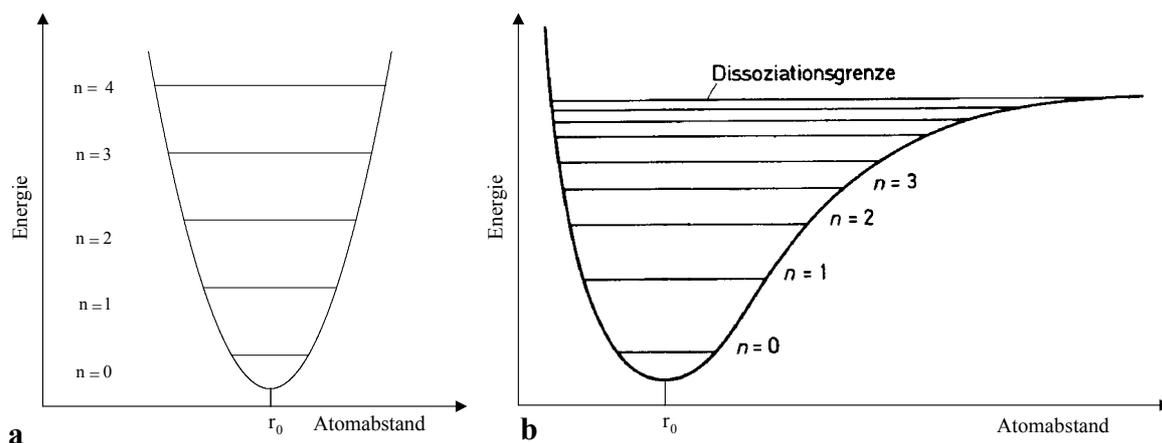


Abbildung 2.3: Potentialkurven des **a** harmonischen Oszillators und des **b** anharmonischen Oszillators

Ein NIR-Spektrum wird im Bereich von 780 nm bis 2500 nm aufgenommen. In diesem Bereich werden die Oberschwingungen detektiert, bei denen Übergänge aus dem Energieniveau

$n = 0$  in höhere Energieniveaus mit  $n > 1$  angeregt werden. Die Wahrscheinlichkeit für eine Anregung in diese hohen Energieniveaus ist viel geringer, deshalb beträgt die gemessene Absorption im NIR-Spektrum meist nur einen Bruchteil der Absorption im mittleren Infrarotbereich. Weiterhin können im NIR-Bereich Kombinationen unterschiedlicher Schwingungen auftreten, die sich durch die Quantenmechanik erklären lassen. So können beispielsweise eine Streck- und eine Pendelschwingung gemeinsam durch Absorption eines Lichtquants angeregt werden [18].

In der Praxis sind jedoch nur wenige Teile eines Moleküls NIR aktiv. Nur Schwingungen, an denen Wasserstoffatome beteiligt sind, weisen eine so hohe Energie und damit geringe Wellenlängen auf, daß die Oberschwingungen im NIR-Bereich auftreten. Damit ist der Wasserstoff das wichtigste Element in der NIR-Analyse. In organischen Molekülen werden mit dieser Methode hauptsächlich C-H, O-H und N-H Bindungen detektiert.

## 2.4 Multivariate Datenanalyse

Durch den Einsatz von Computern und durch Kopplungen von Meßmethoden wurde die Leistungsfähigkeit der Analytik wesentlich erhöht. Durch diesen Fortschritt liefern analytische Messungen zunehmend größere Datenmengen. Die Chemometrik befaßt sich mit der Erfassung und Verarbeitung dieser Daten, um eine sinnvolle Interpretation der Meßdaten zu ermöglichen.

### 2.4.1 Darstellung von Datenmatrizen

Analytische Daten können für eine statistische Auswertung in besonderer Weise geordnet, bzw. in Datenlisten oder Tabellen zusammengefaßt werden. Aus mathematischer Sicht handelt es sich hierbei um einen Vektor oder eine Matrix. Für eine Meßreihe  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , die zum Beispiel die Gehalte eines bestimmten Elements von  $n$  Proben angibt, läßt sich schreiben:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{bmatrix} \quad (2.1)$$

Werden dagegen  $m$  verschiedene Elementgehalte  $x_1, x_2, \dots, x_m$  einer Probe beschrieben, dann werden sie in der Regel durch einen Zeilenvektor charakterisiert.

$$\mathbf{x} = [x_1 \quad x_2 \quad \cdots \quad x_m] \quad (2.2)$$

Solche Datenvektoren werden für Sensorarrays und Analysenmethoden mit einer hohen Anzahl an Meßdaten erhalten, wie sie z. B. in der Chromatographie und Spektroskopie verwendet werden.

Werden nun die Daten für mehrere Analysen- bzw. Meßgrößen ( $m$  Merkmale) und verschiedene Proben ( $n$  Objekte) erfaßt, so lassen sich die Daten der Messungen in einer Matrix der Größe  $n \times m$  darstellen:

$$\mathbf{X} = \begin{matrix} & \xrightarrow{j=1 \dots m} & & & \\ \begin{matrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{matrix} & & \downarrow & i=1 \dots n & \end{matrix} \quad (2.3)$$

Die Zeilen der Datenmatrix  $\mathbf{X}$  entsprechen hierbei den Objekten oder Meßzeitpunkten, die Spalten den Variablen oder Meßgrößen. Die Zeilen bilden die Merkmalsvektoren der Dimension  $m$ , die Spalten Meßreihen eines Merkmals an  $n$  Proben.

#### 2.4.2 Faktoren- und Hauptkomponentenanalyse

Ziel der Hauptkomponentenanalyse (PCA, principle component analysis) ist es, die  $m$  Variablen der Datenmatrix durch eine geringere Zahl  $h < m$  von untereinander unabhängigen Hauptkomponenten (PC, principle component) so darzustellen, daß die ursprünglichen Informationen der Variablen erhalten bleiben. Voraussetzung hierfür ist, daß die Variablen der Matrix zu einem gewissen Grade redundant (kolinear) sind, also Zusammenhänge zwischen den Variablen der Datenmatrix bestehen. Für diese Beziehungen können zwei Extremfälle auftreten:

1. Einerseits können die Variablen untereinander völlig unkorreliert (orthogonal) sein. Die Korrelationsmatrix der standardisierten Variablen ist in diesem Fall eine Einheitsmatrix, das heißt alle Elemente bis auf die Diagonalelemente nehmen den Wert Null an. Eine Dimensionsreduzierung unter Erhalt der ursprünglichen Informationen ist für diesen Fall nicht möglich.
2. Andererseits können die  $m$  Variablen untereinander vollständig korrelieren, also als Linearkombinationen dargestellt werden. Wird das Rauschen dabei vernachlässigt, so besitzt jede Variable den gesamten Informationsgehalt der Datenmatrix und der Variablenraum kann bis auf eine Dimension reduziert werden.

In der Praxis kann häufig der größte Teil der Informationen der ursprünglichen Datenmatrix durch die ersten Hauptkomponenten reproduziert werden. Damit bietet die Hauptkomponentenanalyse die Möglichkeit, Strukturen hochdimensionaler Datensätze auf zwei oder drei Dimensionen zu reduzieren und damit graphisch z.B. als Scoreplots darzustellen.

Die Hauptkomponentenanalyse geht davon aus, daß die Variablen als Linearkombinationen der orthogonalen Hauptkomponenten darstellbar sind. In der Matrixschreibweise ergibt sich durch lineare Transformation:

$$\mathbf{X} = \mathbf{P}\mathbf{A}^T \quad (2.4)$$

bei der die zentrierte  $n \times m$  Datenmatrix  $\mathbf{X}$  durch das Produkt der  $n \times h$  Scorematrix  $\mathbf{P}$  der  $h$  orthogonalen Hauptkomponenten und der  $m \times h$  Loadingmatrix  $\mathbf{A}$  dargestellt wird. Die Loadings sind ein Maß für die Korrelation zwischen den jeweiligen Hauptkomponenten und den einzelnen Variablen.

Geometrisch kann die Hauptkomponentenanalyse als Rotation des  $m$ -dimensionalen Datenraumes der Originalvariablen in das neue Koordinatensystem der Hauptkomponenten interpretiert werden. Damit die Rotation auf einem Kreis oder einer Kugel stattfinden kann, wird die Rotation im Polarkoordinatensystem durchgeführt. Die neuen Achsen werden dabei so aufgespannt, daß die erste Hauptkomponente  $p_1$  in Richtung der maximalen Varianz  $p$  der Daten zeigt. Alle weiteren Hauptkomponenten  $p_2, p_3 \dots$  stehen jeweils senkrecht (orthogonal) dazu und weisen in Richtung der verbleibenden maximalen Varianz. Die Achsen mit einem geringen Varianzanteil werden normalerweise nicht berücksichtigt, wodurch ein Subraum der Originaldaten gebildet wird. Dadurch werden die Daten mit dem höchsten Informationsgehalt herausgefiltert, was den entscheidenden Teil der Datenreduktion bei der Hauptkomponentenanalyse darstellt.

### 2.4.3 Partial Least-Square-Regression (PLS)

Bei der multivariaten Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse wird als Optimierungskriterium eine Varianzmaximierung der Datenmatrix durchgeführt. Für die Vorhersage einer gesuchten Substanz ist diese Basis nicht ausreichend, da direkte Zusammenhänge zwischen dem Verlauf der Konzentration einer Substanz und dem Verlauf eines Meßsignals mit geringer Varianz nicht berücksichtigt werden. In diesen Fällen ist die Verwendung von PLS-Modellen

von Vorteil, da bei dieser Methode Zusammenhänge zwischen Meßdaten und den gesuchten Vorhersagegrößen berücksichtigt werden.

Zur Entwicklung des Modells werden sowohl die Matrix der Meßdaten  $X$  als auch die Matrix der Vorhersagegrößen  $Y$  eingesetzt, wie der Übersicht in Abbildung 2.4 zu entnehmen ist. Hierfür werden beide Matrizen wie bei der Hauptkomponentenanalyse in die Anteile der Scores und Loadings aufgeteilt. Entgegen der normalen Hauptkomponentenanalyse werden

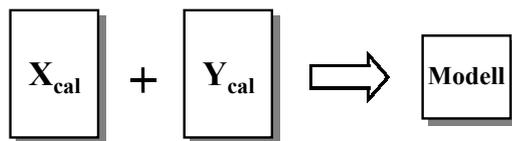


Abbildung 2.4: Entwicklung eines PLS-Modells durch Kombination der Meßdatenmatrix  $X$  und der Matrix der Vorhersagegrößen  $Y$

die Scores jedoch nicht nur nach der maximalen Varianz der Meßdaten  $X$  bestimmt, sondern zusätzlich nach der maximalen Varianz der Vorhersagegrößen  $Y$ . Damit kann die PLS-Regression als gewichtete Hauptkomponentenanalyse verstanden werden, bei der die Meßdaten zur Erstellung des Modells berücksichtigt werden.

$$X = PA^T \quad (2.5)$$

$$Y = UQ^T \quad (2.6)$$

Dabei ist  $X$  die Matrix der Meßdaten,  $Y$  die Matrix der Vorhersagegrößen,  $P$  und  $U$  sind die Score-Matrizen und  $A$  und  $Q$  die Loading-Matrizen. Durch den Einsatz von PLS-Modellen kann eine Optimierung der Vorhersage erreicht werden, bei der auch sehr kleine Beiträge in den Meßgrößen für die Vorhersage berücksichtigt werden [19].

Zur Bestimmung der Qualität der Modelle werden üblicherweise Testdatensätze verwendet, die nicht für die Kalibration eingesetzt wurden. Als Gütemaß wird häufig die Summe der Fehlerquadrate zwischen den vorhergesagten und den beobachteten Werten PRESS (predictive residual sum of squares) beziehungsweise der RMSEP (root mean square error of prediction) angegeben.

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (c_{i,vor} - c_{i,ref})^2 \quad (2.7)$$

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}} \quad (2.8)$$

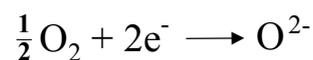
Hierbei ist  $c_{i,\text{ref}}$  die Referenzkonzentration und  $c_{i,\text{vor}}$  die vorhergesagte Konzentration. Die Güte der Vorhersage kann graphisch durch die Auftragung von  $c_{i,\text{vor}}$  gegen  $c_{i,\text{ref}}$  beurteilt werden.

## 2.5 Beschreibung anaerober Fermentationsprozesse

Die Fermentationen strikt anaerober Bakterien werden unter Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt, da diese Mikroorganismen die toxischen Produkte des molekularen Sauerstoffs – wie Peroxide oder Superoxide – nicht beseitigen können [20]. Unter Fermentation wird in dieser Arbeit allgemein die Kultivierung von Mikroorganismen bezeichnet.

Um für strikte Anaerobier gute Wachstumsbedingungen zu schaffen, wird ein niedriges Redoxpotential benötigt. Als Redoxpotential wird das elektrische Potential eines Redoxpaares bezeichnet, wobei das Potential einer Standard-Wasserstoffelektrode als Nullpunkt festgelegt ist. Das Redoxpotential ist ein Maß für die reduzierende bzw. oxidierende Kraft eines Systems, was seiner Neigung Elektronen aufzunehmen oder abzugeben entspricht. Für biologische Redoxsysteme wird das Potential nicht auf einen pH-Wert von 0 bezogen, sondern das physiologische Potential  $E_0'$  verwendet, das auf einen pH-Wert von 7 bezogen wird. Die Wasserstoffelektrode hat bei pH 7 gegenüber der Wasserstoffelektrode bei pH 0 ein Potential  $E_0'$  von  $-420$  mV.

In einer unbeimpften, komplexen Nährlösung, die mit Luft unter Atmosphärendruck im Gleichgewicht steht, wird in der Regel ein Redoxpotential  $E_0'$  von etwa  $+400$  mV gemessen. Dieser Wert ist in erster Linie auf das Redoxsystem



zurückzuführen. Anaerobe Bakterien wie Clostridien beginnen jedoch erst bei einem Redoxpotential  $E_0' < +150$  mV zu wachsen. Viele andere strikt anaerobe Bakterien benötigen für ihr Wachstum ein Redoxpotential  $E_0' < -100$  mV, extreme Anaerobier wie methanogene Bakterien sogar ein Potential von  $E_0' < -300$  mV. Um  $E_0'$  auf solche Werte senken zu können und die Bildung toxischer Sauerstoffprodukte zu verhindern, muß vor dem Beimpfen zunächst der gesamte gelöste Sauerstoff aus der Nährlösung ausgetrieben werden. Ein weiteres Absinken des Potentials  $E_0'$  im Nährboden kann durch den Zusatz reduzierender Stoffe erreicht werden. Durch Verwendung eines großen Inokulums aus der exponentiellen Wachstumsphase kann bei mäßig anaeroben Bakterien auf den Zusatz reduzierender Substanzen verzichtet werden, da die Zellen selber innerhalb kurzer Zeit Sauerstoffreste im Medium reduzieren und damit ein niedriges Redoxpotential erzeugen [21].

### 2.5.1 Clostridien und Endosporen

Die unter der Gattung Clostridien zusammengefaßten Arten gehören zu der Gruppe der anaeroben Endosporenbildner. Durch den sehr geringen Wasseranteil in den Endosporen weisen diese Keime eine große Hitzeresistenz auf, wodurch unerwünschte Sporen nur schwer zu beseitigen sind. Während alle übrigen Bakterien und auch die vegetativen Zellen der Sporenbildner durch 10 Minuten langes Erhitzen auf 80° C abgetötet werden, halten die thermoresistenten Endosporen wesentlich höhere Temperaturen aus. Einige Sporen vertragen sogar stundenlanges Kochen. Die kosten- und arbeitsaufwendige Steriltechnik ist somit auf die Abtötung oder Entfernung von Endosporen ausgerichtet.

Die Sporenbildung erfolgt im Inneren der Bakterienzelle und beginnt mit einer speziellen inäqualen Zellteilung. Durch Einschnüren der Cytoplasmamembran wird ein Teil des Protoplasten der Mutterzelle abgetrennt. Dieser Sporenprotoplast enthält einen Teil des Kernmaterials. Zwischen den beiden Protoplasten erfolgt nun nicht wie bei der normalen Zellteilung eine Zellwandbildung, der Sporenprotoplast wird vielmehr von der Cytoplasmamembran der Mutterzelle umwachsen und eingehüllt. Dies hat zur Folge, daß der Sporenprotoplast von zwei Cytoplasmamembranen umgeben ist, die beide am Aufbau der Sporenwand beteiligt sind. Die Membran des Sporenprotoplasten synthetisiert nach außen die Zellwand, während die Mutterzelle die äußere Sporenrinde (Cortex) herstellt.

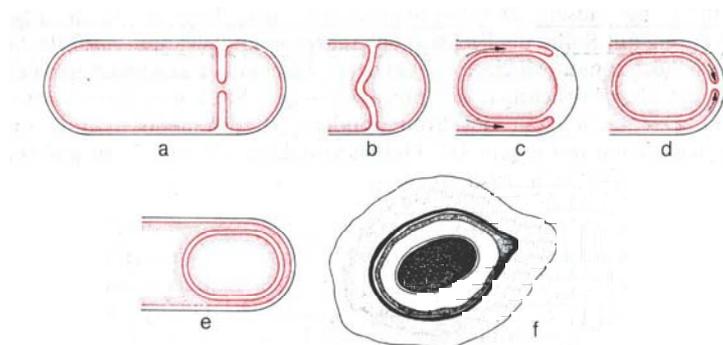


Abbildung 2.5: Schema der Versporung

- a-b** Abschnürung des Sporenprotoplasten
- c-e** Bildung der Vorspore
- f** fertig Spore

Die Sporen werden durch Autolyse aus der Mutterzelle freigesetzt und lassen keine Stoffwechselaktivität erkennen. Sie besitzen einen extrem geringen Wassergehalt (ca. 15 %), wodurch die Sporen eine hohe Resistenz gegenüber Hitze, Strahlung und chemischen Behandlung aufweisen.

In Sporenform können die Bakterien lange Zeit im Zustand latenten Lebens überdauern. Untersuchungen der Erde aus dem Herbarium des Kew Gardens (England) zeigten, daß nach 50 Jahren noch 20 % der Sporen lebensfähig sind.

Die Bildung der Endosporen stellt kein obligat zu durchlaufendes Stadium in dem Lebenszyklus des Bakteriums dar. Unter günstigen Umständen vermehren sich die Bakterien über einen sehr langen Zeitraum durch Teilung der vegetativen Zellen. Die Bildung von Sporen wird erst ausgelöst, wenn Nährstoffe fehlen oder sich Stoffwechselprodukte anhäufen. Die Induktion der Sporenbildung manifestiert sich im Laufe mehrerer Stunden. Wird beispielsweise einer Suspension von vegetativen Zellen nach Übertragung in Wasser binnen fünf Stunden Glucose zugeführt, so unterbleibt die Sporenbildung. Erfolgt die Zugabe der Glucose erst nach sechs Stunden, so bleibt die Induktion der Sporenbildung bestehen und nach der 13. Stunde sporulieren etwa 90 % der Zellen. Die Sporen können jedoch nur gebildet werden, wenn die äußeren Bedingungen es zulassen. So bewirkt eine Überführung anaerober Bakterien in ein sauerstoffhaltiges Medium ein Absterben der Zellen, ohne daß eine Versporung eingeleitet werden kann.

In geeigneten Nährböden kommen die meisten Sporen zur Keimung, wobei vor der Keimung der Sporen eine Wasseraufnahme und Quellung erfolgt. Die Atmung und Enzymaktivität der Sporen nehmen hiernach rasch zu und Aminosäuren, Peptide und andere Stoffe werden ausgeschieden. Der Trockenmasseverlust der Sporen während der Keimung beträgt 25-30 % und die Sporen verlieren dabei ihre Hitzeresistenz. Die aus der Spore austretende Zelle ist von einer sehr dünnen, unvollständigen Zellwand umgeben. Die Sporenhülle kann dabei vom Keimschlauch aufgerissen oder langsam durchdrungen werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Prozeßspektralphotometer

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzuntersuchungen wurden zwei verschiedene Prozeßspektralphotometer verwendet: Ein Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500 (Hitachi, Japan) und ein im Rahmen eines EU-BriteEuram-Programms BE-7991 in interdisziplinärer Zusammenarbeit entwickelter 2D-Fluoreszenzsensor (BioView). Diese Geräte, die über einen Lichtleiter an verschiedenen Reaktoren angekoppelt werden können, werden im folgenden detailliert beschrieben.

#### Lichtleiter

Für die Fluoreszenzmessungen werden das Anregungslicht und das Fluoreszenzlicht beider verwendeter Prozeßspektralphotometer über einen 1 m langen Flüssiglichtleiter (Typ 300, Lumatec, Denzlingen) zu der außerhalb des Spektrometers befindlichen Durchflußzelle oder zum Meßreaktor geführt. Die Detektion der Fluoreszenz durch den Lichtleiter erfolgt immer im  $180^\circ$ -Winkel ("open-end" Anordnung). Bei einem Öffnungswinkel von  $2\alpha = 72^\circ$  kommt es nach wenigen Millimetern hinter dem Lichtleiterkopf zu einem ausgeprägten Überlappungsbereich, wie der Abbildung 3.1 zu entnehmen ist.

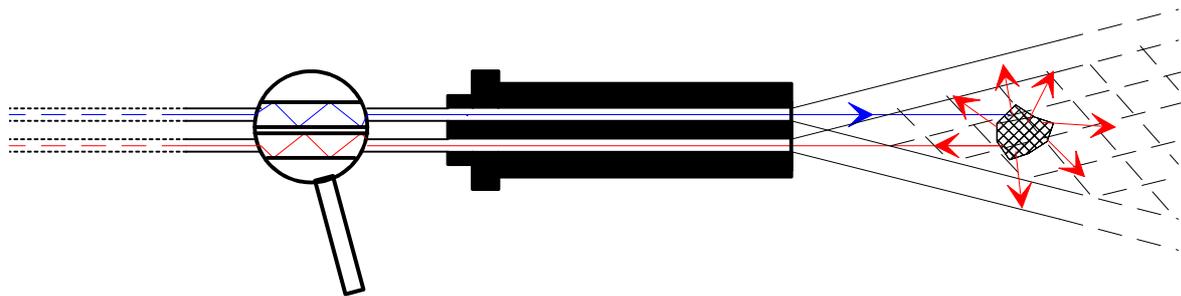


Abbildung 3.1: Strahlengang im Lichtleiter [22]

#### 3.1.1 BioView-Sensor

Der BioView wurde im Rahmen eines EU-BriteEuram-Projektes speziell für den Einsatz in der industriellen Bioprozeßbeobachtung entwickelt. Eine wasserdichte Edelstahlbox schützt den BioView vor Temperatureinflüssen, Feuchtigkeit und mechanischer Belastung speziell im

industriellen Einsatz. Gegenüber elektromagnetischen Störungen ist er zusätzlich durch eine optische Datenübertragung zu dem steuernden PC abgeschirmt. Dadurch ist eine Übertragung der Daten über einige hundert Meter möglich.

Der BioView verwendet zwei unabhängig rotierende Filterräder mit je 16 verschiedenen Filtern für Exzitations- und Emissionslicht. Durch Variation der Exzitations- (270-550 nm) und der Emissionswellenlänge (310-590 nm) wird ein weiter Spektralbereich detektiert und in einem 2D-Fluoreszenzspektrum erfaßt. Als Filter werden Schmalband-Interferenzfilter (DELTA Light&Optics, Dänemark) mit 20 nm Bandbreite verwendet, so daß alle 20 nm eine Messung möglich ist. Zusätzlich ist auf jedem Filterrad ein Neutralsdichte-Filter (ND-Filter) eingebaut, um Streulichtmessungen zu ermöglichen. Mit dem BioView ist eine Auswahl der für Fluoreszenzmessungen vorgesehenen Ex/Em-Wellenlängenpaare möglich. Damit kann eine Verkürzung der Meßdauer erreicht werden. Die Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus, wobei zur besseren Übersicht nur acht Filter je Filterrad abgebildet sind.

Eine hohe Lichtintensität bei langer Lebensdauer wird durch Verwendung einer gepulsten Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan) gewährleistet. Die Spannung des Photomultipliers kann für jede Filterkombination individuell eingestellt werden.

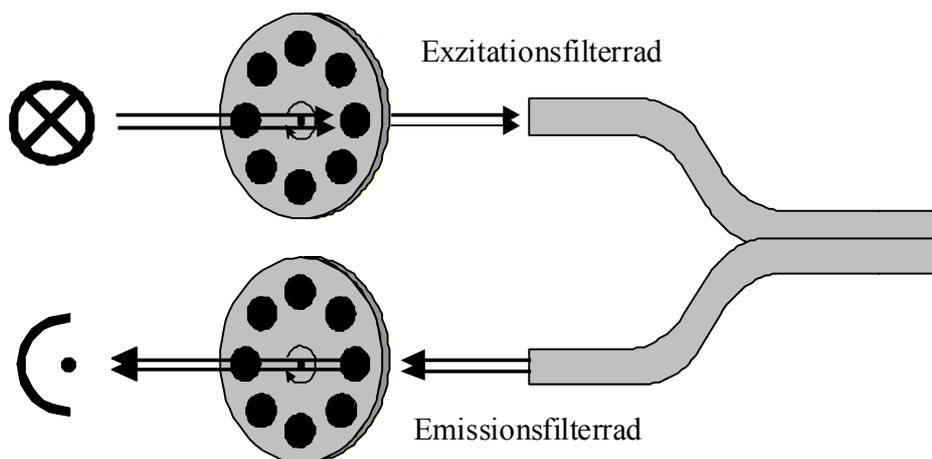


Abbildung 3.2: Meßprinzip des BioView

### 3.1.2 Fluoreszenzspektralphotometer F-4500

Das Fluoreszenzspektralphotometer F-4500 ist ein kommerziell erhältliches Fluoreszenzspektrophotometer, das für Küvettenmessungen ausgelegt ist. Durch Umbau der Meßkammer können mittels eines zweiarmigen Lichtleiters Messungen in externen Reaktoren in einer "open-end" Anordnung durchgeführt werden [23].

Als Lichtquelle dient eine 150 Watt Xenonlampe (Hamamatsu, Japan), die in dem verwendeten Wellenlängenbereich ein kontinuierliches Spektrum liefert. Die Wellenlänge des Exzitations- und des Emissionslichtes wird mit Hilfe eines Gittermonochromators mit wählbarer Spaltbreite („Slit“) eingestellt. Um Schwankungen in der Lampenintensität kompensieren zu können, wird ein Teil des Exzitationslichtes auf einen Referenzphotomultiplier gelenkt. Der andere Teil des Lichtes gelangt über einen Lichtleiter zur Meßzelle. Als Detektionssystem dient ein zweiter Gittermonochromator mit Photomultiplier.

Die Gerätesteuerung und die Datenaufnahme erfolgen über einen Computer. Für die kontinuierliche Datenaufnahme von Fluoreszenzspektren wurde das Quick-Basic-Programm "BioView" [23] verwendet.

### 3.1.3 Vergleich der Fluoreszenzspektralphotometer

Der BioView verwendet zur Einstellung der Exzitations- und Emissionswellenlänge unabhängige, rotierende Filterräder. Um den Meßbereich voll auszunutzen, sind die verwendeten Schmalband-Interferenzfilter mit 20 nm Bandbreite so gewählt, daß alle 20 nm eine Messung möglich ist. Jede neue Filterkombination führt zu neuen Meßbedingungen, die nicht direkt miteinander vergleichbar sind, da die durchgelassene Lichtintensität für jede Filterkombination individuell ist.

Da der BioView für Online-Fluoreszenzmessungen eingesetzt werden soll, ist ein Vergleich der Fluoreszenzspektren mit dem F-4500 zur Beurteilung der aufgenommenen Daten notwendig.

Dazu wurden Fluoreszenzspektren mit dem BioView und dem F-4500 von einem Fluorophorengemisch aus Flavinmononucleotid (FMN), Tryptophan, Pyridoxin und NADH aufgenommen (Zusammensetzung s. Anhang 10.6). Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur mit dem gleichen Lichtleiter in einem 10 mL Meßreaktor (Werkstatt TCI, Universität Hannover). Für den F-4500 wurden folgende Meßeinstellungen verwendet:

- ◆ Exzitationswellenlängenbereich: 250-550 nm
- ◆ Emissionswellenlängenbereich: 260-600 nm
- ◆ Schrittweite der Exzitationswellenlänge: 10 nm
- ◆ Schrittweite der Emissionswellenlänge: 20 nm
- ◆ Photomultiplierspannung: 700 Volt
- ◆ Scangeschwindigkeit: 12000 nm/sec

In Abbildung 3.3 sind die mit dem F-4500 und dem BioView aufgenommenen Fluoreszenzspektren des biogenen Fluorophorengemisches abgebildet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der abgebildete Wellenlängenbereich des F-4500 dem des BioView angepaßt.

Wie zu erkennen ist, treten auf Grund des unterschiedlichen Aufbaus deutliche Unterschiede im Meßbereich beider Prozeßspektralphotometer auf. Der BioView verwendet für die Messungen keine Filterkombinationen, die eine größere Exzitations- als Emissionswellenlänge aufweisen. Dieses ist bei dem BioView automatisch eingestellt, da in diesem Bereich keine Fluoreszenz auftreten kann. Der F-4500 detektiert in dem gleichen Bereich eine scheinbare Fluoreszenzintensität, die durch Spiegelungen am Gitter hervorgerufen wird.

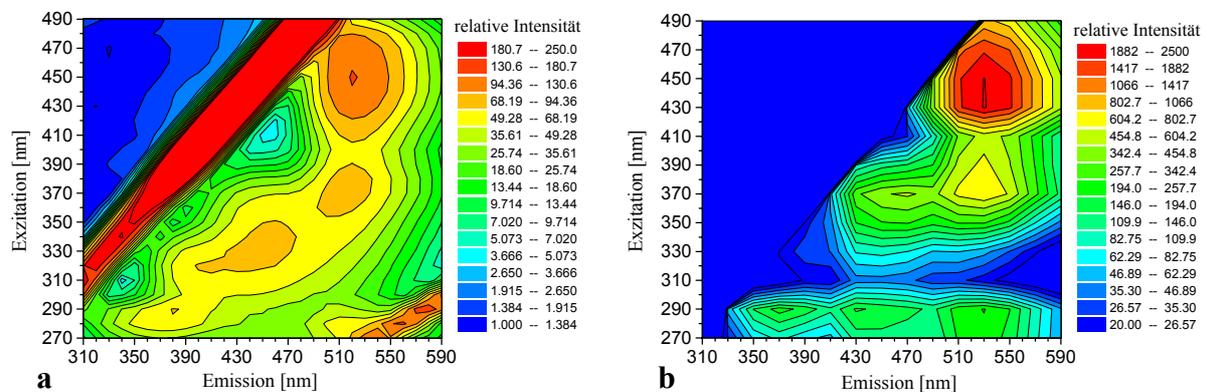


Abbildung 3.3: Fluoreszenzspektren eines Fluorophorengemisches aufgenommen mit dem  
**a** F-4500 **b** BioView

Es sind jedoch auch Unterschiede innerhalb der 2D-Fluoreszenzspektren beider Prozeßspektralphotometer zu erkennen.

Während in den Spektren des BioView und des F-4500 die Fluoreszenzmaxima von Tryptophan (Ex287/Em348 nm [24]) und FMN (Ex450/Em530 nm) gut zu erkennen sind, sind die Maxima von NADH (Ex340/Em460 nm) und Pyridoxin (Ex324/Em390 nm) nicht aus dem Fluoreszenzspektrum des BioView ersichtlich. Da jede Filterkombination beim BioView eine

unterschiedliche Lichtdurchlässigkeit besitzt, treten im Spektrum des BioView neue Bereiche erhöhter Fluoreszenz (Ex290/Em430 nm sowie Ex370/Em470 nm) auf, die keinem Fluorophor zugeordnet werden können.

Im 2D-Fluoreszenzspektrum des F-4500 sind alle Fluoreszenzmaxima der einzelnen Fluorophore gut zu erkennen. Auf Grund der Verwendung von Gittern als dispersives Element ist der F-4500 in der Lage, mehr Meßpunkte im gewählten Bereich zu detektieren und somit eine bessere Auflösung des Fluoreszenzspektrums zu ermöglichen.

Deshalb wird in Kapitel 7 zur Charakterisierung von Resazurin und zur gleichzeitigen Detektion von Resazurin neben Resorufin der F-4500 genutzt, da dieses Gerät die Lage der Fluoreszenzmaxima besser darstellt und nahe beieinander liegende Fluoreszenzmaxima gut unterscheiden kann. Für alle anderen Messungen wurde der BioView eingesetzt, da dieser auf Grund des robusten Aufbaus für die später geplanten industriellen Einsätze besser geeignet ist.

### 3.2 Durchführung der Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen werden in verschiedenen Meßanordnungen durchgeführt:

- ◆ Küvette (Quarzglasküvette)
- ◆ 10 mL Meßreaktor mit Lichtleiter (Werkstatt TCI, Universität Hannover)
- ◆ Durchflußzelle mit Lichtleiter (Werkstatt TCI, Universität Hannover)
- ◆ Bioreaktor mit Lichtleiter (Werkstatt TCI, Universität Hannover)

Die Küvettenmessungen erfolgen mit dem Fluoreszenzspektrometer F-4500 in einer 1 mL Quarzglasküvette mit Schichtdicke 2 mm. Die Messungen im 10 mL Meßreaktor, der Durchflußzelle und dem Bioreaktor werden mit einem Lichtleiter durchgeführt. Der Lichtleiter wird unter Verwendung eines Stutzens an den Reaktor oder an die Durchflußzelle angeschlossen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgen durch ein Quarzglasfenster an der Reaktorwand.

Mit der Durchflußzelle sind Online-Fluoreszenzmessungen in einem kontinuierlich strömenden Medium möglich. Die Online-Messungen mit der Durchflußzelle werden direkt am chromatographischen Trennprozeß durchgeführt, wie in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Dazu wird die Zelle an den Ablauf der Trennkolonnen angeschlossen.

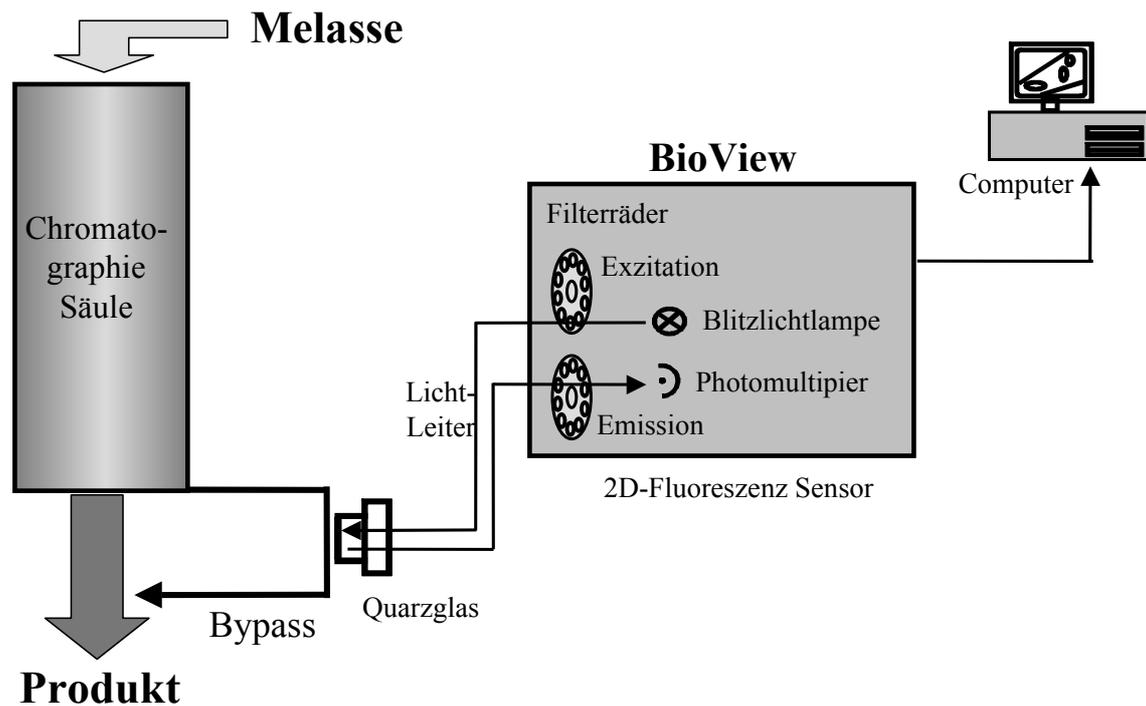


Abbildung 3.4: Aufbau der Online-Fluoreszenzmessungen am industriellen Chromatographieprozeß

### 3.3 Optimierung der Meßeinstellung

Mit dem BioView bestehen die beiden Möglichkeiten, sowohl die Spannung am Photomultiplier zu variieren (Gain Matrix) als auch bis zu 16 Mehrfachmessungen (Repetition Matrix) bei jeder Filterradeinstellung durchzuführen. Beide Parameter sollen variiert und untersucht werden, um die optimalen Meßeinstellungen für den BioView zu ermitteln.

#### 3.3.1 Optimierung der Photomultiplierspannung (Gain)

Für die Optimierung der Photomultiplierspannung wurden Fluoreszenzmessungen mit dem BioView bei Raumtemperatur (RT) in einem 10 ml Minireaktor durchgeführt, als Meßsubstanz wurde eine  $10^{-6}$  M Lösung Tryptophan eingesetzt.

Die Spannung am Photomultiplier wurde durch die Einstellung des Gains zwischen 100 und 1400 Einheiten variiert. Für jede Einstellung wurden 10 Messungen durchgeführt und der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten sowie die Standardabweichung berechnet. Um eine optimale Einstellung des Gains ermitteln zu können, ist in Abbildung 3.5 die gemessene

relative Fluoreszenzintensität (RFI) jeder Messung gegen die zugehörige Standardabweichung aufgetragen.

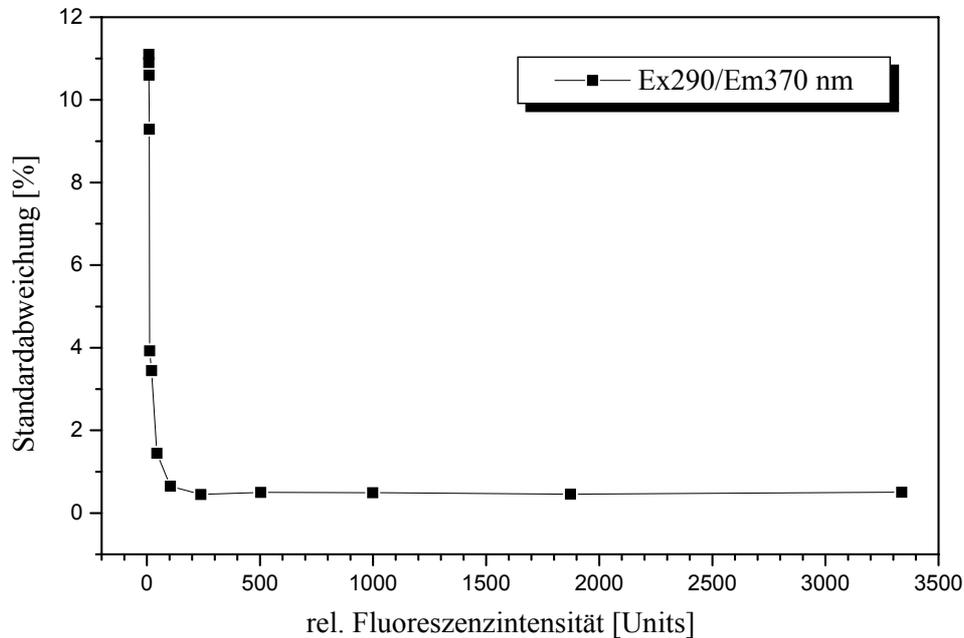


Abbildung 3.5: Standardabweichung und Fluoreszenzintensität bei Variation der Photomultiplier-Spannung

Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, führt eine Erhöhung der Photomultiplier-Spannung und damit der gemessenen Fluoreszenzintensität zu einer Abnahme des Fehlers als Reststandardabweichung. Ab einer gemessenen Fluoreszenzintensität von 300 relativen Einheiten ist jedoch ein Optimum erreicht. Weitere Erhöhungen des Gains führen zwar zu einer weiteren Zunahme des Meßsignals, der Fehler wird jedoch kaum mehr verringert.

Aus diesem Versuch kann gefolgert werden, daß für eine Lösung mit gegebener Fluorophorkonzentration die Photomultiplier-Spannung durch Einstellung des Gains so gewählt werden sollte, daß im gemessenen Bereich die Fluoreszenzintensität möglichst über 300 RFI liegt. Damit ist eine Minimierung des Fehler der Messungen zu erreichen.

### 3.3.2 Optimierung der internen Meßwiederholungen

Mit dem BioView besteht die Möglichkeit, bis zu 16 Mehrfachmessungen (Repetition Matrix) bei jeder Filtereinstellung durchzuführen. Mit Hilfe der Software des Gerätes wird dann

eine interne Bildung des Mittelwertes der Fluoreszenzintensität durchgeführt, wodurch ein besseres Signal-/Rauschverhältnis bei einer längeren Meßdauer erreicht werden kann.

Zur Optimierung dieser Repetition Matrix soll die Streuung bei unterschiedlichen Meßwiederholungen untersucht werden. Dazu wurde die Fluoreszenz einer  $10^{-6}$  M Lösung Tryptophan bei verschiedenen Einstellungen der Repetitions-Matrix mit dem BioView jeweils zehnmal aufgezeichnet und die Standardabweichung bestimmt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Lichtleiter im 10 mL Meßreaktor durchgeführt.

In Abbildung 3.6 ist zu erkennen, daß eine größere Zahl an internen Meßwiederholungen zu einer Verringerung der Standardabweichung führt. Hierbei wird die vom Hersteller verwendete Einheit Repetition angegeben, wobei eine Repetition von eins der einmaligen Aufnahme eines 2D-Fluoreszenzspektrums entspricht. Die Standardabweichung für eine Repetition Matrix von eins beträgt 0,79 % und bei einer Repetitions-Matrix von sechzehn 0,15 %.

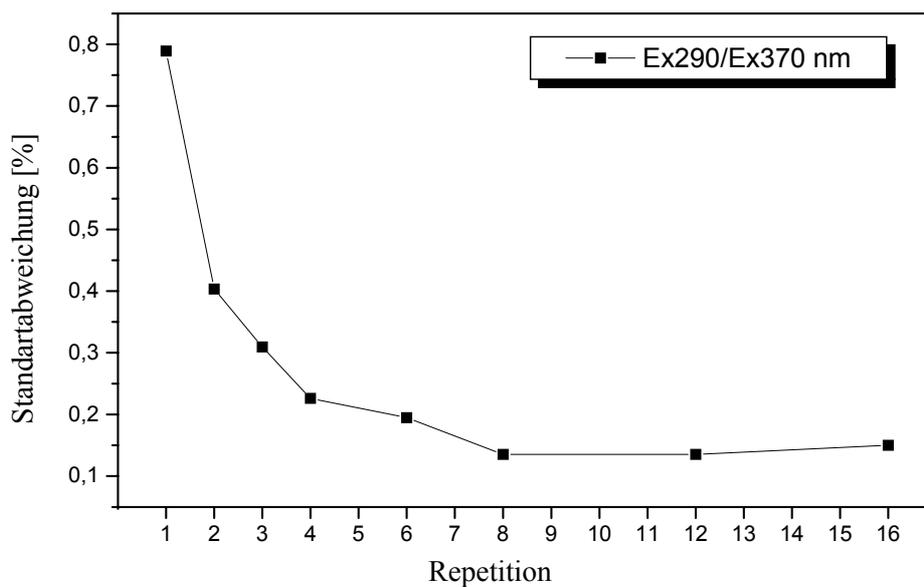


Abbildung 3.6: Standardabweichungen der Fluoreszenzintensität bei zehn Messungen mit verschiedenen internen Meßwiederholungen

Da eine größere Anzahl an Meßwiederholungen auch zu einer Verlängerung der Meßdauer führt, muß zwischen einer kürzeren Meßdauer oder einer geringeren Streuung der Meßwerte entschieden werden. Da für industrielle Einsätze meist eine kurze Meßdauer entscheidend ist und bei einer einzigen Meßwiederholung der Fehler bereits unter 1 % beträgt, kann mit einer internen Meßwiederholung ein geringer Fehler bei kurzer Meßdauer erreicht werden. In allen weiteren Versuchen wird deshalb eine Repetitions-Matrix von eins eingesetzt.

### 3.4 Das verwendete NIR-Spektrometer

In dieser Arbeit wurde das NIR-Spektrometer NIR 256E, Serie X-Dap, der Firma IKS Optoelektronik Messgeräte GmbH, Duisburg eingesetzt. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Diodenarray-Spektralphotometer mit einem sequentiell gescannten InGaAs-Diodenarray. Der gescannte Spektralbereich erfasst einen Bereich von 1100 nm bis 2300 nm. Die Funktionsweise des Diodenarray-Photometers ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

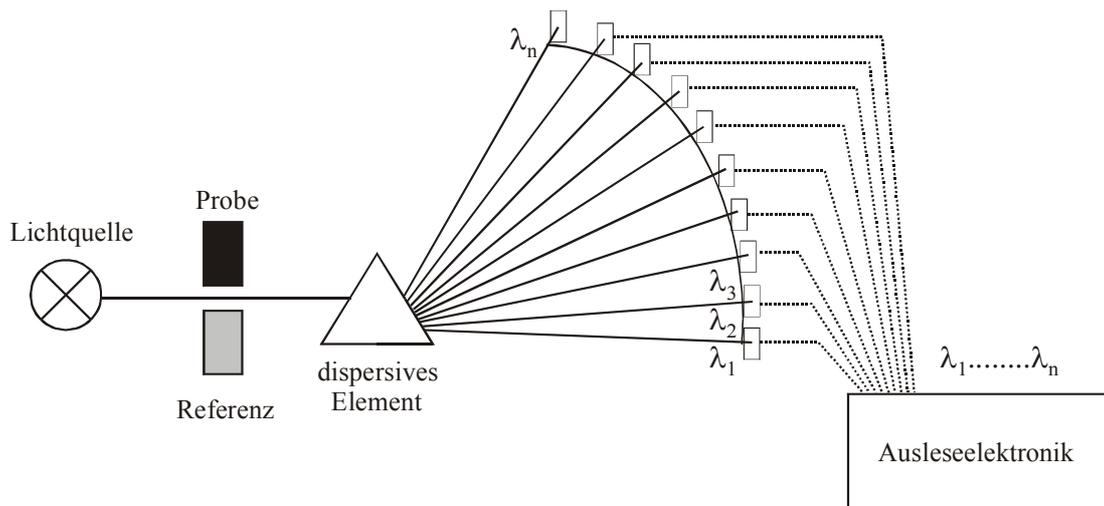


Abbildung 3.7: Funktionsprinzip des Diodenarray-Photometers [25]

Durch die Anordnung (Array) von mehreren nebeneinander angeordneten Detektoren (Dioden) ist es möglich, verschiedene Spektralelemente gleichzeitig zu registrieren. Dadurch wird die Messzeit im Vergleich zu Ein- und Zweistrahlphotometern, bei denen durch Drehen des dispersiven Elements, zumeist ein Reflexionsgitter, sukzessive alle Spektralelemente durchlaufen werden, erheblich verkürzt. Das Vielkanalspektrometer nutzt die Simultanmessung vieler Spektralelemente zur schnellen Aufnahme von Spektren. Der Aufbau des Diodenarray-Spektralphotometers entspricht einem Einstrahlphotometer, d. h. die Spektren der Referenz und der Probe werden nacheinander vermessen [25].

## 4 Übersicht über die Experimente

In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in der Nahrungsmittelindustrie untersucht. Hierbei wird als Schwerpunkt die Aufarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe gewählt, da diese eine Lösungsstrategie bei der begrenzten Rohstoffversorgung bieten könnten [26]. Die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie wird anhand der praktischen Beispiele der chromatographischen Melasseentzuckerung sowie des Spurennachweises von Sauerstoff in anaeroben Prozessen verdeutlicht.

- Einsatz der 2D-Fluoreszenz bei der chromatographischen Melasseentzuckerung

Das Ziel der Untersuchungen ist es, eine Online-Prozeßkontrolle der chromatographischen Melasseentzuckerung zu etablieren. Durch eine Optimierung des Prozesses könnten höhere Produktausbeuten erzielt und damit Energie und Ressourcen eingespart werden. Zu diesem Zweck wird in Offline-Experimenten zunächst die Möglichkeit der Fluoreszenz zur Prozeßbeobachtung und Detektion verschiedener Melasseinhaltsstoffe getestet. Für die Aminosäure Serin, die in der bisherigen Prozeßführung nicht richtig erfaßt wird, soll eine Zuordnung eingehender untersucht werden. Die Erkenntnisse aus den Offline-Untersuchungen werden dann in der Entwicklung eines Online-Modells genutzt, das über einen Zeitraum von 18 Monaten bei verschiedenen Prozeßänderungen validiert werden soll.

- Einsatz der NIR-Spektroskopie bei der chromatographischen Melasseentzuckerung

In den anschließenden Versuchen sollen die Anwendungsmöglichkeiten der in der Zuckerindustrie etablierten Methode der NIR-Spektroskopie für den Prozeß der chromatographischen Melasseauftrennung aufgezeigt werden. Möglichkeiten zur Bestimmung von Betain, Serin und Saccharose werden dabei überprüft. Im Fall von Betain soll mit Hilfe der NIR-Spektroskopie eine einfache Methode zur Detektion dieser Substanz im Chromatographieprozeß vorgestellt werden.

- Nachweis von Sauerstoff in Spurenkonzentrationen

Im dritten Teil wird die Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Detektion von Sauerstoffkonzentration bei anaeroben Prozessen vorgestellt. Dazu werden die Fluoreszenzeigenschaften des Sauerstoffindikators Resazurin genutzt und die Charakteristiken dieser Substanz in Hinblick auf eine Anwendung bei anaeroben Fermentationen ermittelt. Die technische Anwendbarkeit der Methode soll danach bei einer Kultivierung des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* unter Beweis gestellt werden.

## 5 Prozeßbeobachtung der chromatographischen Melasseentzuckerung

Um eine bessere Prozeßführung der chromatographischen Melasseentzuckerung erreichen zu können, sollen in diesem Kapitel Möglichkeiten der Prozeßbeobachtung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie vorgestellt werden.

Zunächst werden Untersuchungen an Offline-Proben diskutiert, um Möglichkeiten zur Elutionsbestimmung von Melasseinhaltsstoffen aus Fluoreszenzdaten aufzuzeigen. Ein besonderes Augenmerk gilt der Aminosäure Serin, da für diesen Inhaltsstoff noch keine Online-Analytik bekannt ist. Für diese Substanz soll eine Auswertung mittels Chemometrie erfolgen.

Die in den ersten Offline-Versuchen gewonnenen Erkenntnisse werden für eine Online-Beobachtung der Elution von Serin genutzt, wobei unterschiedliche chemometrische Modelle entwickelt und miteinander verglichen werden. Die Auswahl des Modells wird durch weitere Versuche verifiziert und im Anschluß daran das Modell auf die Stabilität bei der Vorhersage von Serin getestet. Dazu wird die Qualität der Vorhersage bei verschiedenen Änderungen im Trennprozeß überprüft. Zum Abschluß wird ein Vergleich mit den bisher zur Prozeßführung verwendeten Parametern durchgeführt und Vorteile und Nachteile beider Methoden herausgestellt.

### 5.1 Analytik der chromatographischen Melasseentzuckerung – Stand der Technik

Die Prozeßführung der chromatographischen Melasseentzuckerung basiert auf Messungen der physikalischen Parameter Dichte, Leitfähigkeit, Brechungsindex (Bx) und Drehwinkel. Durch densitometrische Messungen des Trockensubstanzgehaltes (TS) ( $1^\circ\text{Bx} \cong 1\% \text{ TS}$ ) und durch die Bestimmung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht im Polarimeter ( $1^\circ\text{S} \cong 1\% \text{ Saccharose}$ ) läßt sich durch Bildung des Quotienten  $Q_z = \frac{^\circ\text{S}}{^\circ\text{Bx}}$  die Reinheit der Saccharoselösung bestimmen [27]. Da dieser Quotient  $Q_z$  aus Online-Daten bestimmt wird und mit dem Konzentrationsverlauf der Saccharose korreliert, stellt die Methode eine schnelle Analytik für Saccharose dar.

Für den Zucker Raffinose wurde ein Nachweis mit einem Biosensor auf Basis des Enzyms Galactose-Oxidase vorgestellt [28,29]. Die Analysenzeit konnte jedoch nicht unter vier Minuten gesenkt werden und die Messungen wurden durch störende Matrixeinflüsse in der

Melasse behindert [30]. Deshalb konnte der entwickelte Sensor nicht am Chromatographieprozeß eingesetzt werden.

Für die Aminosäure Serin wurde ebenfalls ein Biosensor-System beschrieben [31]. Hierbei konnte die Analysenzeit bis auf 125 Sekunden gesenkt werden, eine Online-Detektion und Regelung des Prozesses war damit jedoch noch nicht gegeben [32]. Ein Biosensor hat zudem den Nachteil, eine hohe Störanfälligkeit zu besitzen, weshalb ein Einsatz dieser Methode in einem Produktionsprozeß nicht sinnvoll erscheint.

## **5.2 Offline-Untersuchungen an Proben aus einem Chromatographiezyklus**

Um eine gezielte Online-Prozeßüberwachung und dadurch eine bessere Anreicherung wertvoller Melasseinhaltsstoffe zu erreichen, sollen zunächst in einem Offline-Versuch Änderungen der Fluoreszenzintensität im Laufe eines kompletten Chromatographiezyklus untersucht werden. Die bei den Offline-Untersuchungen gefundenen Ergebnisse sollen im Anschluß auf ihre Möglichkeiten zur Entwicklung einer Online-Vorhersage der Serinelution untersucht werden.

Dazu wurden während eines vollständigen Trennprozesses insgesamt 104 Proben im Abstand von jeweils einer Minute am Ausgang der Trennkolonne entnommen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im Anschluß offline in einem 10 mL Minireaktor. Für die Referenzanalytik der verschiedenen Zucker, Aminosäuren sowie Betain wurde eine HPLC verwendet. Die Einstellungen des Fluoreszenzensors BioView wurden für alle Offline- sowie folgenden Online-Messungen am Chromatographieprozeß gleich gewählt und sind im Anhang (s. Kapitel 10.7.1) aufgeführt. Im folgenden wird die Auswertung der Fluoreszenzdaten für die Offline-Eluatproben des Chromatographiezyklus vorgestellt.

### **5.2.1 Datenauswertung mittels Hauptkomponentenanalyse**

Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse können aus 2D-Fluoreszenzspektren wesentliche charakteristische Prozeßänderungen ermittelt werden [33]. In diesem Kapitel soll zunächst die Hauptkomponentenanalyse zur Ermittlung wichtiger Fluoreszenzwellenlängen genutzt werden, um einen Überblick über die verschiedenen in der Melasse auftretenden Fluorophore und deren Elutionsverhalten zu gewinnen.

In Abbildung 5.1 ist die beschriebene Gesamtvarianz für zehn Hauptkomponenten (PCs) dargestellt. Durch die Gesamtvarianz wird beschrieben, wieviel der gesamten Änderungen in der Fluoreszenz bis zur betrachteten Hauptkomponente erfaßt werden. Eine hohe

Gesamtvarianz berücksichtigt somit einen großen Teil der wichtigen Informationen in einem 2D-Fluoreszenzspektrum. Die ersten vier Hauptkomponenten beinhalten bereits 99,2 % der gesamten auftretenden Varianz während des kompletten Chromatographiezyklus. Es werden in den weiteren Versuchen nur noch diese vier PCs genutzt, da sie bereits alle relevanten Informationen aus den 2D-Fluoreszenzspektren enthalten. Die ersten beiden Hauptkomponenten beschreiben jeweils über 40 % der Varianz und berücksichtigen somit einen sehr hohen Anteil der auftretenden Änderungen in den Fluoreszenzspektren.

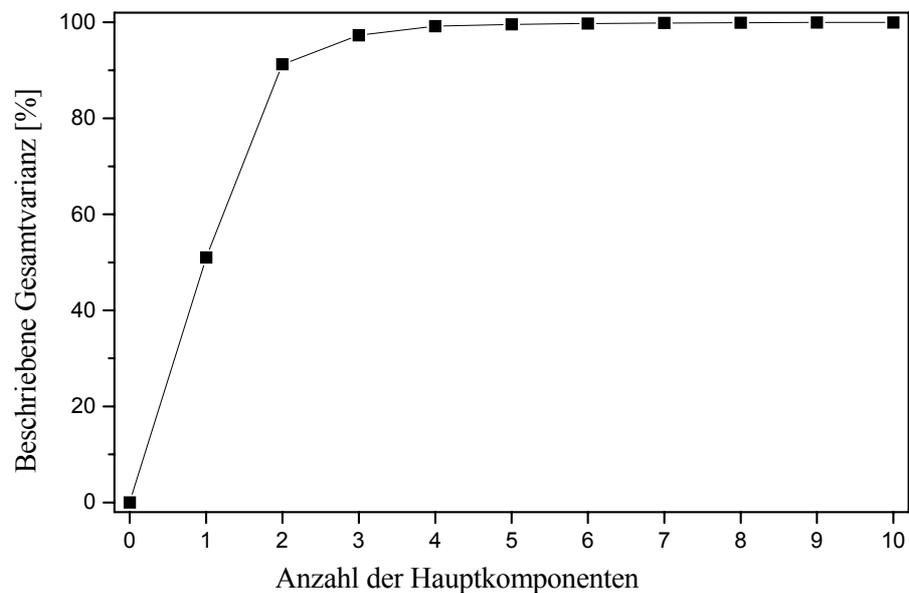


Abbildung 5.1: Summe der erklärten Varianz für die ersten zehn Hauptkomponenten

Die Loadings der ersten vier Hauptkomponenten sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Durch die Loadings wird der Einfluß der jeweiligen Wellenlängen auf die einzelnen Hauptkomponenten beschrieben. Weiterhin lassen sich mit den Loadings die Wellenlängen bestimmen, die unterschiedliche, charakteristische Fluoreszenzverläufe aufweisen. Diese sollen später genutzt werden, um auf Basis der Fluoreszenz eine Online-Prozeßbeobachtung zu ermöglichen.

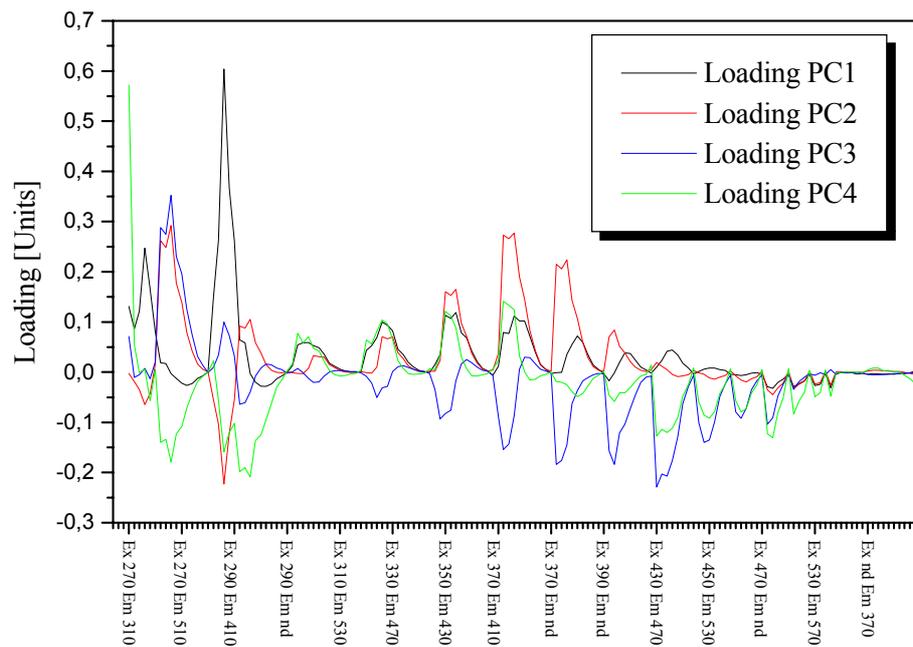


Abbildung 5.2: Darstellung der Loadings für die ersten vier Hauptkomponenten

Für die erste Hauptkomponente läßt sich in dem Bereich der Fluoreszenz von Tryptophan [34] ein sehr starker Einfluß der Wellenlängenkombination Ex290/Em370 nm feststellen. Da Tryptophan in freier Form nicht in Melasse vorkommt, dagegen jedoch große Mengen Oligo- und Polypeptide vorhanden sind [35], handelt es sich bei der Fluoreszenz Ex290/Em370 nm wahrscheinlich um in Peptiden gebundenes Tryptophan.

Durch die weiteren Hauptkomponenten lassen sich andere, charakteristische Fluoreszenzverläufe finden:

- Ex270/Em470 nm      siehe Loading PC 2
- Ex370/Em470 nm      siehe Loading PC 2
- Ex430/Em470 nm      siehe Loading PC 3
- Ex270/Em310 nm      siehe Loading PC 4

Die Fluoreszenzverläufe der Ex/Em-Wellenlängenpaare, die durch Interpretation der Hauptkomponentenanalyse gefunden wurden, sind in der Abbildung 5.3 dargestellt. Darin sind deutlich die unterschiedlichen Elutionsverläufe der verschiedenen in der Melasse vorkommenden Fluorophore zu erkennen. Übereinstimmungen in den Fluoreszenzverläufen treten dennoch auf, wenn zwei Wellenlängen aus der selben Hauptkomponente stammen

(Ex270/Em470 nm sowie Ex370/Em470 nm) oder die Bereiche sehr eng zusammen liegen und sich somit überlagern (Ex370/Em470 nm sowie Ex430/Em470 nm).

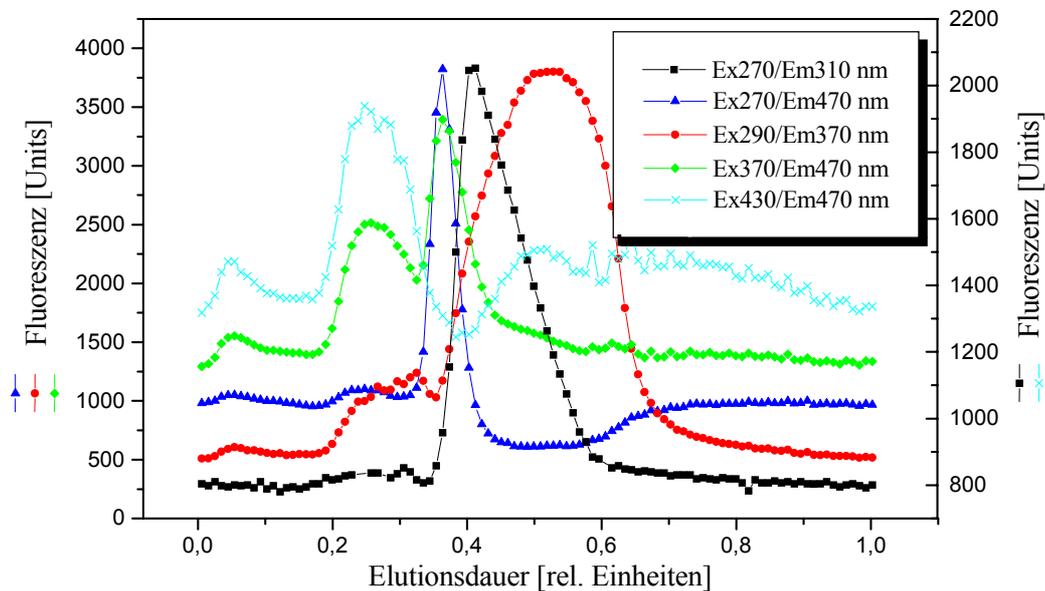


Abbildung 5.3: Fluoreszenzverläufe für signifikante Ex/Em-Wellenlängenkombinationen während der chromatographischen Melasseentzuckerung. Die Wellenlängen wurden durch Hauptkomponentenanalyse ermittelt.

Durch Verwendung der Hauptkomponentenanalyse konnten somit aus den 2D-Fluoreszenzspektren von Offline-Eluatproben der chromatographischen Melasseentzuckerung die wichtigsten, voneinander unabhängigen Wellenlängen gefunden werden. Diese sollen in den folgenden Kapiteln zur Identifikation einzelner Fluorophore sowie der möglichen Festlegung von Schnittgrenzen einzelner Melasseinhaltsstoffe genutzt werden.

### 5.2.2 Detektion von Tyrosin im Trennprozeß

Von den drei fluoreszierenden Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin ist für die Melasseaufarbeitung lediglich Tyrosin relevant [35]. Beim Prozeß der AMINO GmbH wird Tyrosin im Verlauf des Trennprozesses angereichert und kann als Wirkstoff für Infusionslösungen oder andere pharmazeutische Anwendungen vermarktet werden. Deshalb ist eine genaue Detektion der Aminosäure Tyrosin während des Chromatographieprozesses erforderlich.

Das Fluoreszenzmaximum von Tyrosin liegt bei 275 nm für die Exzitations- und bei 303 nm für die Emissionswellenlänge [34]. Tyrosin ist in der Melasse sowohl in Peptiden gebunden als auch in freier Form vorhanden. Da die meßbare Fluoreszenz von peptidgebundenem Tyrosin sehr gering ist [34], wird mit der Fluoreszenzspektroskopie vorwiegend freies Tyrosin detektiert. Aus diesem Grund sollte ein Nachweis des freien Tyrosins in dem Chromatographieprozeß mit Hilfe der Fluoreszenz möglich sein.

In Abbildung 5.4 ist ein Vergleich zwischen der Tyrosinkonzentration und der Fluoreszenzintensität Ex270/Em310 nm von 104 Offline-Elutionsproben der chromatographischen Melasseentzuckerung dargestellt. Aus den Ergebnissen geht eine sehr gute Übereinstimmung von Fluoreszenz- und Referenzdaten der HPLC hervor.

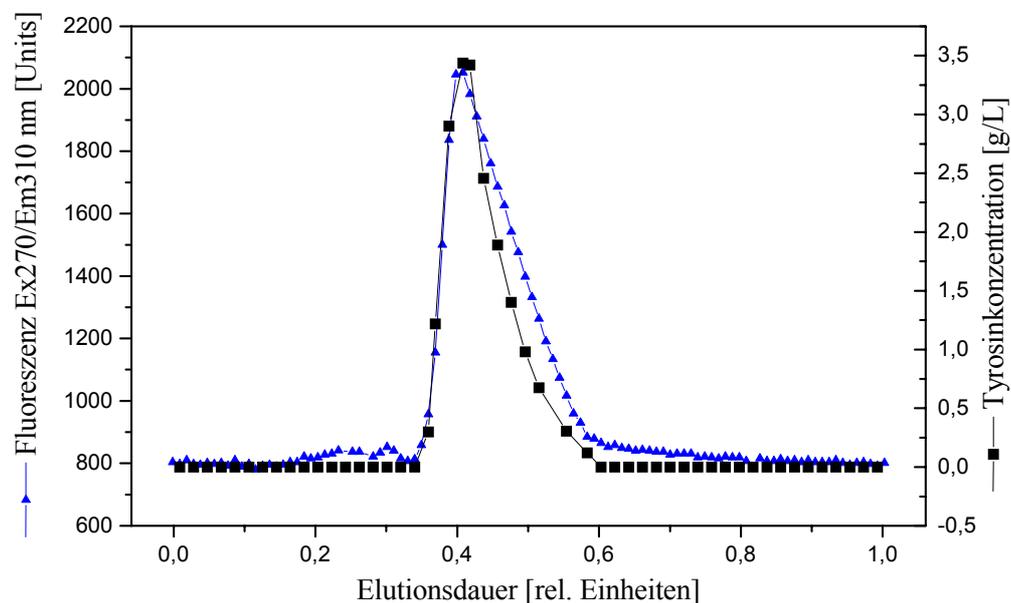


Abbildung 5.4: Tyrosinkonzentration von Proben aus einem Chromatographiezyklus sowie detektierte Fluoreszenz Ex270/Em310 nm

Mit den erzielten Ergebnissen wird eine exakte Bestimmung von Tyrosin im Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung erreicht. Eine Überlagerung der Fluoreszenz von Tyrosin durch andere in der Melasse vorkommenden Fluorophore, die zum einen fluoreszieren und zum anderen Fluoreszenz anderer biogener Fluorophore auslösen [36-39], ist nicht zu beobachten. Die Messung der Fluoreszenz würde somit eine Berücksichtigung der Aminosäure Tyrosin bei der Prozeßführung ermöglichen.

### 5.2.3 Vergleich anderer Melasseinhaltsstoffe mit Fluoreszenzdaten

Im Anschluß soll getestet werden, ob auch für andere Substanzen neben dem fluoreszierenden Tyrosin eine Vorhersage im Chromatographieprozeß möglich ist. Damit wird überprüft, ob die Fluoreszenz auch als Online-Meßmethode für weitere nicht fluoreszierende Melasseinhaltsstoffe einsetzbar ist.

Die Elutionsprofile sämtlicher Melasseinhaltsstoffe aus den Analyseergebnissen der HPLC (Aminosäuren, Zucker sowie Betain) wurden analysiert und mit den durch die Hauptkomponentenanalyse gefundenen, charakteristischen Wellenlängen der 104 Eluatproben verglichen. Diese Wellenlängen weisen ein besonders hohes Signal-/Rauschverhältnis auf und sind somit besonders gut für stabile Online-Vorhersagen geeignet. Alle gefundenen Korrelationen sind in diesem Kapitel aufgeführt.

#### 5.2.3.1 Korrelation von Asparagin und Threonin mit Fluoreszenzdaten

Für die beiden Aminosäuren Asparagin und Threonin konnte eine Korrelation mit dem Fluoreszenzverlauf Ex270/Em470 nm gefunden werden, wie Abbildung 5.5 zu entnehmen ist.

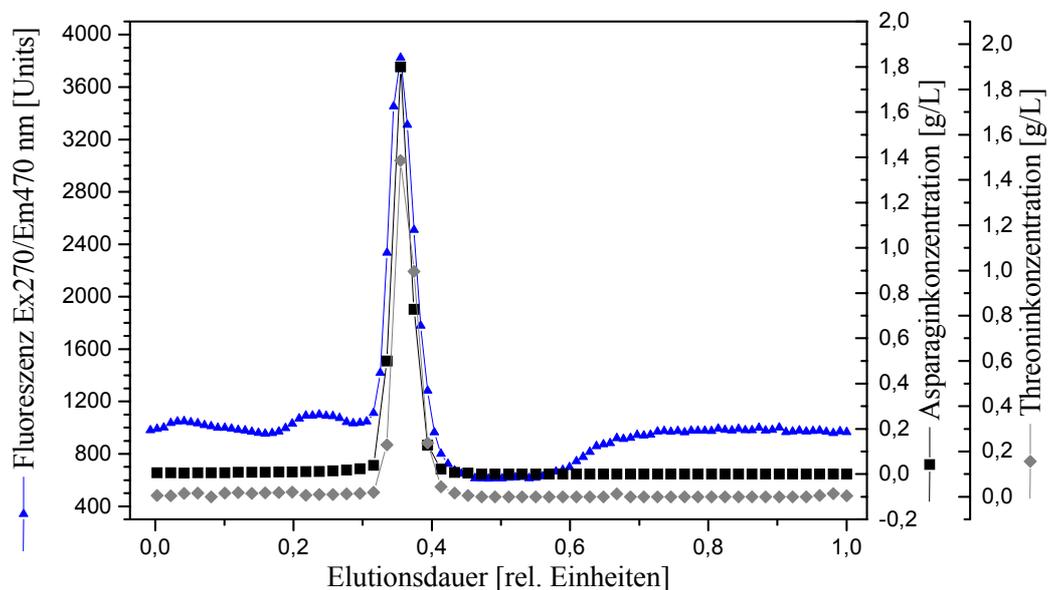


Abbildung 5.5: Korrelation der Aminosäuren Asparagin und Threonin mit dem Fluoreszenzverlauf Ex270/Em470 nm

Der Verlauf der Fluoreszenz und die jeweilige Aminosäurekonzentration stimmen sowohl im Anstieg, im Maximum als auch der anschließenden Abnahme des Peaks sehr gut überein. Dabei werden die Maxima der Elution der jeweiligen Aminosäure auf die Minute genau mit Hilfe der Fluoreszenz wiedergegeben. In der Melasse ist somit ein Fluorophor vorhanden (die Identifikation des Fluorophors wird in Kapitel 5.2.3.3 beschrieben), das die gleichen Trenneigenschaften wie die Aminosäuren Asparagin und Threonin aufweist und für eine Bestimmung der Elution dieser beiden Aminosäuren genutzt werden kann. Im chromatographischen Trennprozeß der AMINO GmbH werden die beiden genannten Aminosäuren bisher nicht berücksichtigt und könnten durch Verwendung der 2D-Fluoreszenz vorhergesagt und in die Prozeßführung mit einbezogen werden.

Durch die Korrelation der nicht fluoreszierenden Aminosäuren Asparagin und Threonin mit Fluoreszenzdaten konnte somit gezeigt werden, daß mit der 2D-Fluoreszenz eine gute Methode zur Prozeßbeobachtung zur Verfügung steht. Die Fluoreszenzspektroskopie kann neben den bisher verwendeten Prozeßparametern zusätzlich eingesetzt werden, da sie weitere neue Informationen über den Prozeßablauf aufzeigt.

### **5.2.3.2 Untersuchungen zur Korrelation von Serin mit Fluoreszenzdaten**

Da für Serin bisher noch keine Online-Analytik bekannt ist, sollen im Anschluß zunächst die Fluoreszenzmessungen an den Eluatproben auf eine mögliche Bestimmung von Serin im Prozeß untersucht werden.

Das Elutionsprofil von Serin weist die gleichen Charakteristika wie die beiden Aminosäuren Threonin und Asparagin auf, Serin eluiert jedoch erst zwei Minuten später [40,41]. Deshalb kann auch wie im vorherigen Kapitel der Fluorophor Ex270/Em470 nm zur Elutionsbestimmung genutzt werden. Ein Vergleich der Fluoreszenzdaten mit der Serinelution ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

Obwohl im Falle des Serins keine direkte Korrelation mit einem Fluoreszenzverlauf möglich ist, kann ein Fluorophor gefunden werden, das unmittelbar vor Serin eluiert. Dieser Verlauf kann zur Festlegung der Schnittgrenzen für Serin verwendet werden, wenn die Fluoreszenzdaten mit den zwei Minuten später gemessenen Serinkonzentrationen korreliert werden.

Dieser Zusammenhang wird im folgenden genauer überprüft und validiert, um eine Möglichkeit zur Online-Prozeßsteuerung zu erreichen.

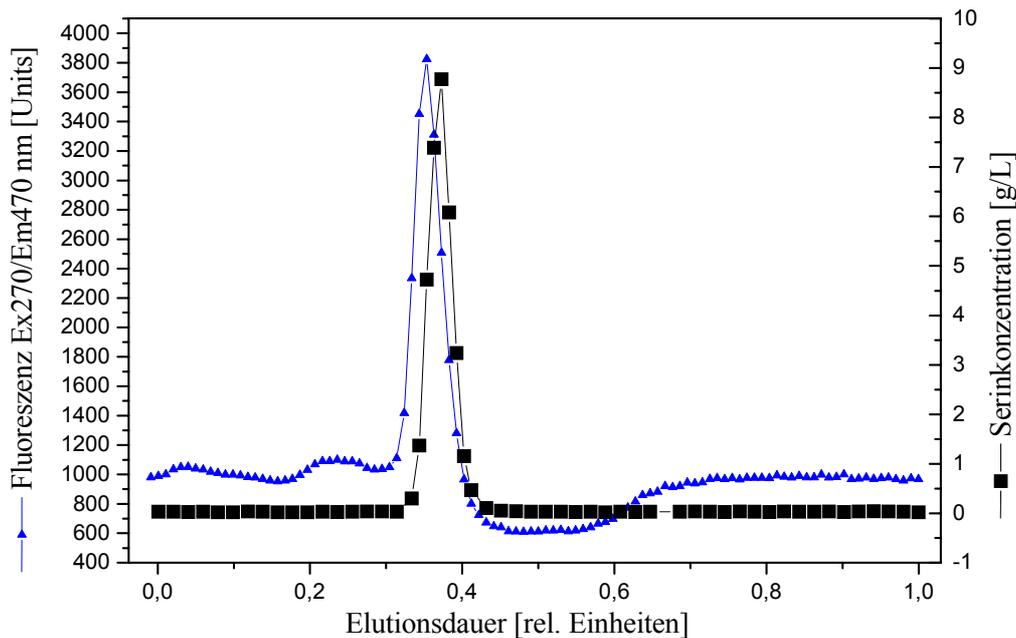


Abbildung 5.6: Vergleich zwischen der Elution von Serin und der Fluoreszenzwellenlänge Ex270/Em470 nm

### 5.2.3.3 Identifikation des Fluorophors (Fluoreszenz Ex270/Em470 nm)

Zur Bestimmung der Elutionsprofile von Serin sowie der beiden Aminosäuren Asparagin und Threonin wurde jeweils das Wellenlängenpaar Ex270/Em470 nm genutzt. Da für Serin eine Online-Analytik entwickelt werden soll und die Fluoreszenzwellenlänge Ex270/Em470 nm hierbei einen entscheidenden Einfluß hat, soll im weiteren der Fluorophor genauer untersucht und identifiziert werden.

Dazu wird die Hauptkomponentenanalyse der bisher diskutierten 104 Eluatproben verwendet (s. Kapitel 5.2.1). In der PCA wurden verschiedene Hauptkomponenten beschrieben und die Beeinflussung der Hauptkomponenten (PCs) durch die Wellenlängen aus dem 2D-Fluoreszenzspektrum vorgestellt. Um den gewünschten Fluorophor durch eine PC zu charakterisieren, müssen zwei Kriterien erfüllt sein:

- Die PC muß einen starken Einfluß auf die Gesamtvarianz besitzen, da es sich um eine stark fluoreszierende Substanz handelt, die im gesamten 2D-Fluoreszenzspektrum wiedergefunden wird.
- Die Fluoreszenz bei Ex270/Em470 muß einen hohen Einfluß auf die PC ausüben, was durch ein hohes Loading für diese Wellenlängenkombination zu erkennen wäre.

Da diese beiden Kriterien nur für die zweite Hauptkomponente der PCA erfüllt sind, wird der untersuchte Fluorophor am besten durch diese Hauptkomponente repräsentiert.

In Abbildung 5.7 ist ein Loadingspektrum für die zweite Hauptkomponente dargestellt. Diese Spektren lassen sich durch Transformation der Loadings für die entsprechende Hauptkomponente aus der PCA erstellen [42]. In dem Loadingspektrum sind drei Bereiche mit einem hohen Einfluß auf die zweite Hauptkomponente zu erkennen.

Für den Bereich 1 konnte bereits ein hoher Beitrag für die erste Hauptkomponente nachgewiesen werden (s. Kapitel 5.2.1). Für die zweite Hauptkomponente haben die Loadings aus Bereich 1 nun ein negatives Vorzeichen, wodurch der Bereich 1 subtrahiert wird und einen Ausgleich für den Einfluß der ersten Hauptkomponente darstellt. Damit verbleiben zwei Bereiche mit einem positiven Einfluß auf die zweite PC bei Ex270/Em470 nm und bei Ex370/Em470 nm.

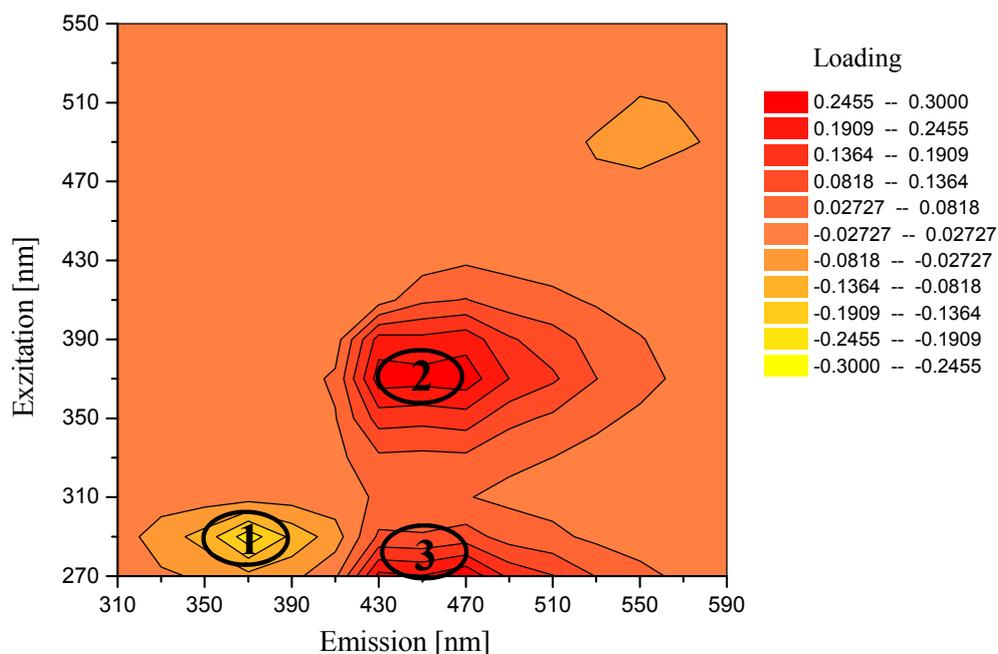


Abbildung 5.7: Sensitivitätsspektrum der zweiten Hauptkomponente, ermittelt durch Transformation des entsprechenden Loadings

Da beide Bereiche die gleiche Emissionswellenlänge (Em470 nm) jedoch unterschiedliche Anregungswellenlängen (Ex270 nm und Ex370 nm) besitzen, wird es sich wahrscheinlich um ein Fluorophor mit zwei Anregungswellenlängen handeln. Ein Fluorophor mit exakt denselben Exzitations- und Emissionseigenschaften wird in Arbeiten von Baunsgaard et al. [43,44] in Zuckerrübendicksaft nachgewiesen. Es handelt sich dabei um ein Produkt aus einer

Maillardreaktion, die beim Erhitzen von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern eingegangen wird. Das gebildete Polymer variiert stark in Größe und Gewicht und ist damit schwer nachweisbar. Dieses Produkt bleibt wahrscheinlich nach dem Auskristallisieren des Zuckeranteils aus dem Dicksaft zurück und geht somit in die Melasse über.

### 5.3 Entwicklung eines Modells zur Online-Vorhersage von Serin

Nachdem in Offline-Untersuchungen an Eluatproben aus der chromatographischen Melasseentzuckerung die prinzipiellen Möglichkeiten einer Prozeßbeobachtung durch die 2D-Fluoreszenzspektroskopie vorgestellt wurden, sollen die Ergebnisse im folgenden zum Aufbau einer Online-Meßmethode genutzt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Meßzelle entwickelt, mit deren Hilfe der BioView online in einem Bypass am Ausgang der Chromatographiesäulen angeschlossen werden kann.

#### 5.3.1 Vorstellung der Modelle zur Vorhersage von Serin im Überblick

Bei der chromatographischen Melasseentzuckerung der AMINO GmbH wurden an allen sechs Trennkolonnen (TK 1-6) während eines kompletten Trennzyklus jede Minute Online-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Zeitgleich wurden jede Minute Proben entnommen, die im Anschluß auf ihren Seringehalt untersucht wurden. Eine Übersicht der zur Kalibrierung verwendeten Online-Messungen und Proben ist in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Übersicht der zur Kalibrierung verwendeten Meßdaten (je Trennkolonne ein vollständiger Chromatographiezyklus)

Trennkolonne	Anzahl Proben
TK 1	135
TK 2	114
TK 3	115
TK 4	105
TK 5	109
TK 6	110

Auf Basis der Fluoreszenzdaten und der Serinkonzentration wird nun im Anschluß ein Modell zur Vorhersage der Serinelution entwickelt. Hierbei wird der Schwerpunkt auf die Verwendung chemometrischer Modelle wie der Partial-Least-Squares-Regression (PLS) gelegt, da diese Modelle den Informationsgehalt des gesamten 2D-Fluoreszenzspektrums nutzen. Überlagerungen einzelner Fluoreszenzwellenlängen durch andere Fluorophore besitzen dadurch nur einen geringen Einfluß auf die Vorhersage. Zusätzlich erweisen sich PLS-Modelle auf Grund der sehr großen Datensätze für die Kalibrierung als wesentlich stabiler als einfache lineare Modelle [45].

Da bei vorangegangenen Untersuchungen an Eluatproben (s. Kapitel 5.2) aus der chromatographischen Melasseentzuckerung bereits festgestellt werden konnte, daß ein Fluorophor zwei Minuten früher als die Aminosäure Serin eluiert, sollen auch PLS-Modelle mit Korrelationen zwischen Serindaten und den zeitlich früher gemessenen Fluoreszenzspektren vorgestellt werden.

Daraus ergeben sich die folgenden Modelle, die überprüft werden sollen:

- PLS-Modell von Serindaten und gleichzeitig gemessenen Fluoreszenzspektren
- PLS-Modell von Serindaten und 1 Minute vorher gemessenen Fluoreszenzspektren
- PLS-Modell von Serindaten und 2 Minuten vorher gemessenen Fluoreszenzspektren
- PLS-Modell von Serindaten und 3 Minuten vorher gemessenen Fluoreszenzspektren
- PLS-Modell von Serindaten und 4 Minuten vorher gemessenen Fluoreszenzspektren

### 5.3.2 Bestimmung der Modellwahl am Kalibrationsdatensatz

Für die Online-Fluoreszenzdaten der insgesamt 688 Messungen an den Trennkolonnen 1-6 wurden die oben genannten PLS-Modelle für Seringehalte entwickelt und im Anschluß für den gleichen Datensatz getestet.

Dabei werden für jedes Modell die Anzahl der von der Software vorgeschlagenen Hauptkomponenten sowie der im Test ermittelte mittlere Fehler der Vorhersage (RMSEP) angegeben. Durch die Angabe der PCs wird die Stabilität des Modells beschrieben, wobei eine kleine Anzahl von Hauptkomponenten auf eine hohe Robustheit des Modells hinweist. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP) gibt die Genauigkeit des Modells bei der anschließenden internen Validierung an. In Tabelle 5.2 sind die Ergebnisse für die verschiedenen Modelle aufgeführt.

Tabelle 5.2: Anzahl der vorgeschlagenen PCs sowie der Fehler der Vorhersage (RMSEP) für verschiedene PLS-Modelle

<b>Modell (Verschiebung Serindaten)</b>	<b>Anzahl vorgeschlagene PCs</b>	<b>RMSEP</b>
Modell ohne Shift	12	0,45 g/L
1 Minute nach vorne	9	0,40 g/L
2 Minuten nach vorne	7	0,28 g/L
3 Minuten nach vorne	8	0,35 g/L
4 Minuten nach vorne	12	0,47 g/L

Es ist deutlich zu erkennen, daß eine Korrelation der Serindaten mit den früher gemessenen Fluoreszenzdaten beim Einsatz von PLS-Modellen erst zu erheblichen Verbesserungen in der Stabilität der Modelle führt, diese jedoch bei weiterer Verschiebung wieder abnimmt. Dieses ist an der Anzahl der vorgeschlagenen PCs und dem geringen Fehler in der Vorhersage zu erkennen. Das Minimum an PCs und im Fehler liegt bei einer zeitlichen Verschiebung der Serindaten um zwei Minuten.

Dieses Ergebnis kann gut mit den Resultaten aus den Offline-Untersuchungen an Eluatproben (s. Kapitel 5.2) erklärt werden. Hierbei wurde ein Fluorophor entdeckt, das exakt 2 Minuten vor Serin eluiert. Durch die Verschiebung der online gemessenen Fluoreszenzdaten um zwei Minuten nach hinten werden nun Serinelution und Elution dieses Fluorophors im Datensatz zur Deckung gebracht. Dadurch kann unter Berücksichtigung der zeitlichen Verschiebung direkt aus dem Elutionsprofil des Fluorophors der Seringehalt im Eluat berechnet werden.

### 5.3.3 Experimente zur Unterstützung der Modellwahl

In bisherigen Experimenten wurden vollständige 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen, wodurch der zeitliche Abstand zwischen dem Beginn einer Messung und dem Beginn der darauffolgenden Messung mindestens 1 Minute beträgt. Im folgenden soll nun der zeitliche Abstand zwischen Serin- und Fluorophorelution mit Hilfe einer schnelleren Datenaufnahme genauer bestimmt werden. So soll eine weitere Verbesserung des Modells erreicht werden.

Dazu wurde die Software „Timescan“ für den BioView verwendet, mit der 10 Fluoreszenzmessungen je Sekunde bei einer Wellenlänge möglich sind. Für die Fluoreszenzwellenlänge

Ex270/Em470 nm wurden zehn Messungen je Sekunde durchgeführt, während alle zwanzig Sekunden zusätzlich eine Probennahme erfolgte.

Durch die Verwendung der schnellen Meßwiederholung läßt sich in Abbildung 5.8 erkennen, daß die Serinelution und die Fluoreszenz bei Ex270/Em470 nm den gleichen Verlauf aufweisen und der zeitliche Unterschied der beiden Verläufe exakt 120 Sekunden beträgt. Damit werden die Ergebnisse der Modellwahl aus dem vorangegangenen Kapitel bestätigt, bei denen eine Optimierung des Modells durch Verschiebung der Serinkonzentrationen um zwei Minuten erfolgte.

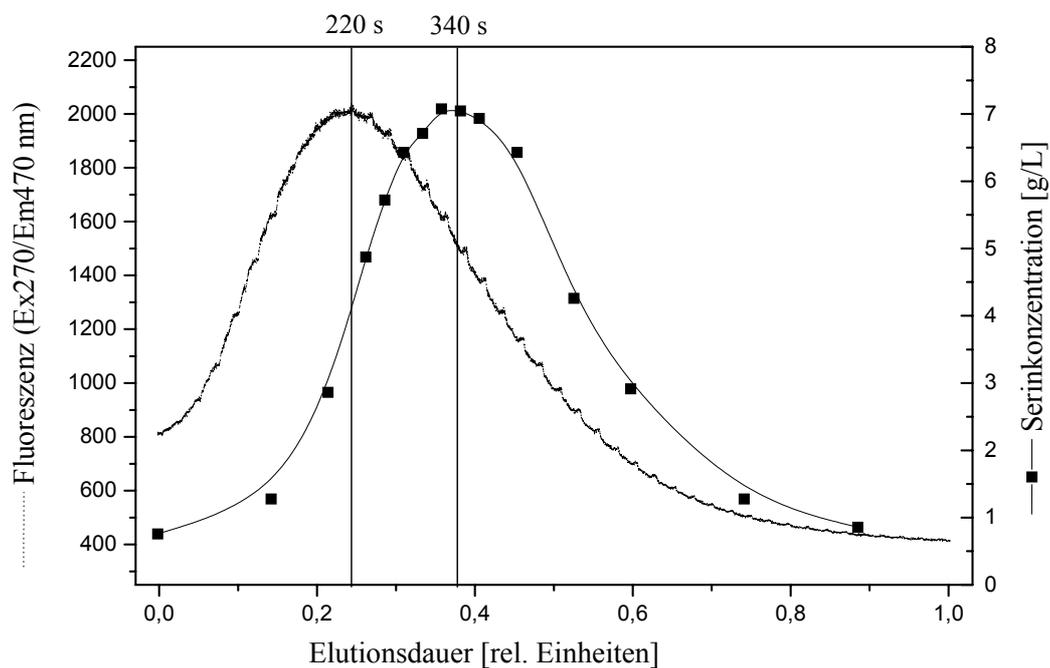


Abbildung 5.8: Korrelation der Serinkonzentration und der Fluoreszenz Ex270/Em470 nm bei hoher Meßfrequenz

#### 5.4 Validierung des Modells an weiteren Chromatographiezyklen

Das erstellte Modell zur Vorhersage von Serin soll nun auf seine Stabilität bei verschiedenen Prozeßveränderungen getestet werden. Dazu sollen folgende Punkte untersucht und überprüft werden:

- Langzeitstabilität des Modells über 18 Monate
- Anwendbarkeit der Vorhersage für verschiedene Melassechargen
- Test für Chromatographiezyklen mit außergewöhnlich hohen Serinkonzentrationen

### 5.4.1 Test über 18 Monate bei Verwendung verschiedener Melassechargen

Das Modell wurde nach 6 Monaten an vier weiteren Chromatographiezyklen und nach 18 Monaten für zwei Trennzyklen überprüft. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten wie bei der Modellerstellung online am Chromatographieprozeß im Abstand von jeweils einer Minute. Zur Bestimmung der Serinkonzentration wurden im selben Zeitabstand Proben entnommen und im Anschluß mit einer HPLC analysiert.

Tabelle 5.3: Validierung der Vorhersage von Serin an weiteren Chromatographiezyklen

Zyklus Nr.	RMSEP Kompletter Zyklus	Richtige Zuordnung Seringehalt über 4 g/L
1	0,36 g/L	5 von 5
2	0,57 g/L	5 von 5
3	0,26 g/L	4 von 4
4	0,57 g/L	4 von 5
5	0,42 g/L	4 von 4
6	0,51 g/L	5 von 5
<b>Gesamt</b>	<b>0,46 g/L</b>	<b>27 von 28</b>

Der Fehler der Vorhersagen für die kompletten Chromatographiezyklen liegt zwischen 0,26 g/L und 0,57 g/L. Dabei ist keine signifikante Abweichung zwischen den ersten vier Zyklen nach sechs Monaten und den nach 18 Monaten gemessenen Zyklen 5 und 6 zu erkennen. Damit kann zum einen die Langzeitstabilität der Methode im betrachteten Zeitraum gezeigt werden und zum anderen – da die Melassecharge in der Zwischenzeit gewechselt wurde – die Übertragbarkeit des Modells auf verschiedene Melassechargen und somit unterschiedliche Melassezusammensetzungen belegt werden.

Der RMSEP liegt im Durchschnitt bei 0,46 g/L, was einem prozentualen Fehler von 5,83 % bezogen auf eine Höchstkonzentration von 8 g/L Serin entspricht. Dieser Fehler ist für eine Verwendung als Online-Analytik zur Serinbestimmung ausreichend gering, da für die Prozeßführung lediglich die höchsten Seringehalte erkannt werden müssen.

Von den 28 Proben mit den höchsten Serinkonzentrationen (Seringehalt > 4 g/L) wurden von dem Modell 27 Proben richtig erkannt und ebenfalls den höchsten Seringehalten zugeordnet. Lediglich bei einem Zyklus wurde eine Abweichung festgestellt. Im Vergleich zur bisherigen

Prozeßführung, bei der Abweichungen von bis zu 3 Minuten zwischen der optimalen und der verwendeten Schnittführung auftreten, kann mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine deutliche Verbesserung der Prozeßführung und damit der Serinausbeute erreicht werden.

#### 5.4.2 Überprüfung des Modells für außergewöhnlich hohe Serinkonzentrationen

Bei der AMINO GmbH werden einmal im Jahr die Trennkolonnen für zwei Monate stillgelegt. Während dieser Zeit erfolgt die Wartung der Chromatographiesäulen und Leitungssysteme. Drei Tage vor der Stilllegung wird das Serin aus dem Produktstrom nicht mehr weiterverarbeitet, sondern der neuen auf die Chromatographiesäule aufgegebenen Melasse zugesetzt. So reichert sich immer mehr Serin bis zur Stilllegung der Trennsäulen im Eluat an. Es soll nun anhand der Chromatographiezyklen mit sehr hohen Serinkonzentrationen überprüft werden, ob in diesen Sonderfällen das Modell zur Vorhersage anwendbar bleibt.

Dazu wurden während der letzten drei Tage vor der Stilllegung Online-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Der Zyklus 1 wurde am ersten Tag, der Zyklus 2 am zweiten Tag und der Zyklus 3 am letzten Tag vor der Stilllegung der Trennkolonnen aufgenommen. In Abbildung 5.9 ist eine Übersicht der vorhergesagten und gemessenen Serinkonzentrationen über jeweils 15 Minuten einschließlich der Serinfraktion dargestellt.

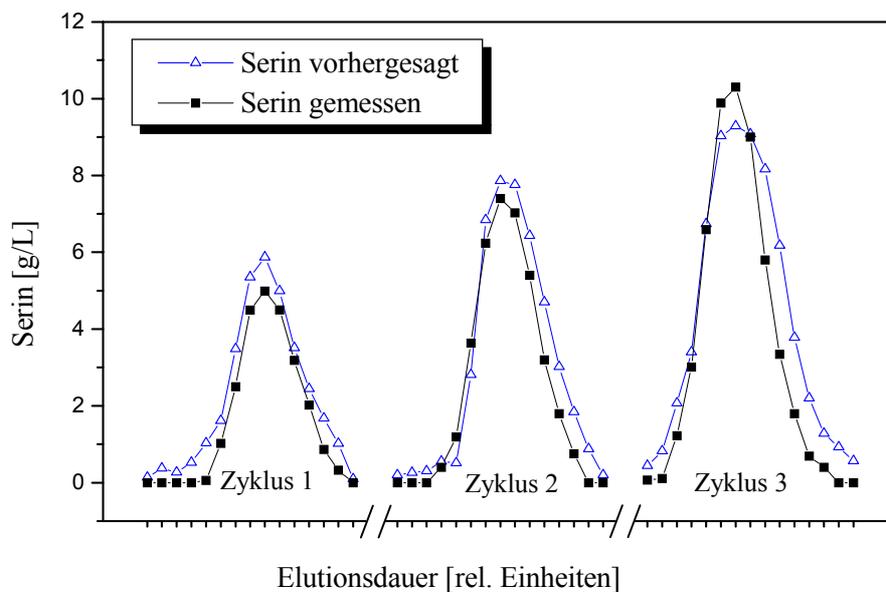


Abbildung 5.9: Elutionsprofile der vorhergesagten sowie gemessenen Serinkonzentrationen für drei Chromatographiezyklen mit sehr hohem Seringehalt

Jeder Meßpunkt entspricht einer 2D-Fluoreszenzmessung bzw. einer Probe, aus der der Seringehalt ermittelt wurde. Dabei ist gut zu erkennen, wie das Serin über die Chromatographiezyklen im Eluat angereichert wird. Während im ersten Zyklus die maximale Serinkonzentration nur 5 g/L beträgt, ist im dritten Zyklus eine Anreicherung bis auf 10 g/L festzustellen. Neben dem Serinanstieg ist eine deutliche Verbreiterung des Elutionspeaks zu erkennen. Sowohl der Anstieg der maximal auftretenden Serinkonzentration als auch die Peakverbreiterung von Zyklus 1 bis Zyklus 3 werden in der Modellvorhersage gut erfaßt.

Auch wenn die Abweichungen in der Vorhersage für den dritten Zyklus 1,29 g/L betragen, der Fehler der Vorhersage für die 15 Proben ist in Tabelle 5.4 aufgeführt, wird die Elution von Serin gut erfaßt. Dies kann mit der richtigen Zuordnung der Eluatproben mit den höchsten Serinkonzentrationen (Seringehalt > 4 g/L) nachgewiesen werden, für die auch im Modell anschließend die höchsten Serinkonzentrationen vorhergesagt werden.

Tabelle 5.4: Validierung der Vorhersage von Serin für Chromatographiezyklen mit sehr hohen Serinkonzentrationen

Zyklus Nr.	RMSEP 15 Proben um Serinfraktion	Richtige Zuordnung Seringehalt über 4 g/L
1	0,62 g/L	3 von 3
2	0,78 g/L	4 von 4
3	1,29 g/L	5 von 5

Mit den Versuchen konnte gezeigt werden, daß eine gute Übereinstimmung zwischen Vorhersage und tatsächlicher Serinelution auch bei Chromatographiezyklen mit sehr hohen Serinkonzentrationen gegeben ist. Durch die Rückführung des Serins in die neu auf die Chromatographiesäule aufgegebene Melasse wird auch der kurze Zeit vorher eluierende Fluorophor zurückgeführt. So reichern sich beide Substanzen im Eluat an, und eine Vorhersage des Serins bleibt trotz der äußerst hohen Konzentrationen möglich.

Die 2D-Fluorezenz ist folglich auch bei Änderungen in der Prozeßführung, die zu einer Anreicherung von Serin im Eluat führen, als Online-Analytik und Prozeßkontrolle einsetzbar.

### 5.5 Vorteile der Online-Fluoreszenzmessung in der Praxis

Zur Festlegung der Schnittgrenzen für Serin werden von der AMINO GmbH bisher die physikalischen Meßgrößen Brechungsindex und Leitfähigkeit genutzt.

Die Schnittgrenzen für die Serinfraktion werden so festgelegt, daß die Schnittführung ein paar Minuten nach einer Änderung der Leitfähigkeit erfolgt. Durch auftretende Veränderungen im Elutionsverhalten der Trennkolonne kann es jedoch zu fehlerhaften Korrelationen zwischen der Leitfähigkeit und der Serinfraktion kommen. Damit ist eine sichere Vorhersage der Serinfraktion nicht möglich. Für den Trennprozeß der TK3 wurden erhebliche Abweichungen zwischen der verwendeten Festlegung der Schnittgrenzen [Angaben AMINO, 1999] und dem tatsächlichen Verlauf der Serinkonzentration gefunden. Für die Trennsäule waren seit längerem die Schnittgrenzen nicht neu bestimmt worden, wodurch eine Verschiebung des Elutionsprofils von Serin zu dem Prozeßparameter Leitfähigkeit aufgetreten war. Dadurch kam es zu einer starken Abweichung zwischen der von der AMINO GmbH verwendeten und der optimalen Prozeßführung, wie in Abbildung 5.10 zu erkennen ist.

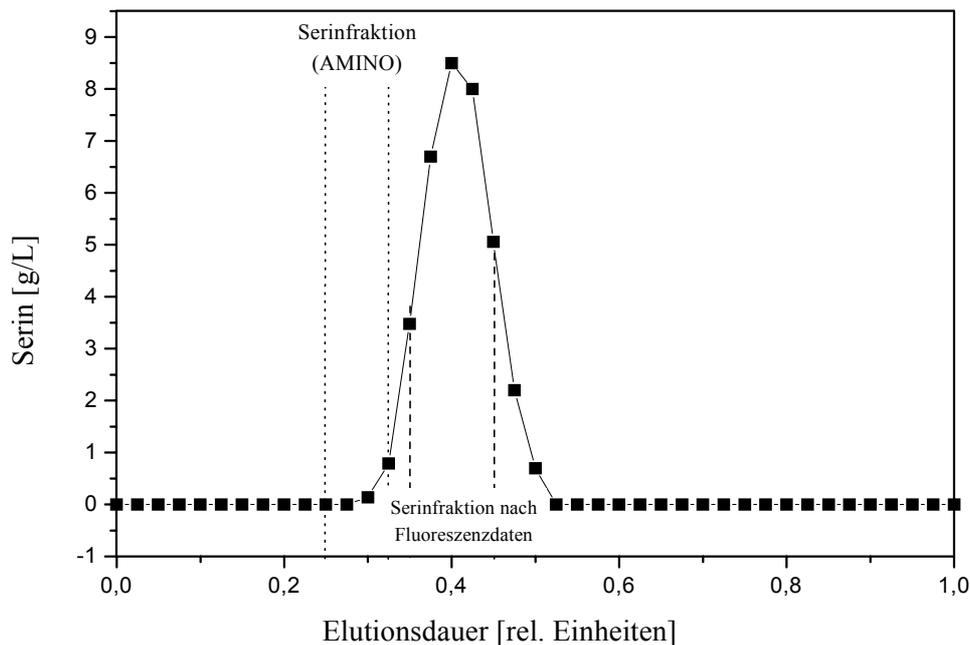


Abbildung 5.10: Festsetzung der Schnittgrenzen für Serin und tatsächlicher Verlauf der Serinkonzentration (TK3, Daten AMINO November 1999)

Für die bei der AMINO GmbH untersuchten Chromatographiezyklen ist in Tabelle 5.5 eine Gegenüberstellung der möglichen Schnittführung durch Verwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie und der tatsächlich vollzogenen Schnittführung der AMINO GmbH aufgeführt.

Betrachtet wurden alle Chromatographiezyklen, die für die Kalibrierung und die anschließende Validierung der Vorhersage genutzt wurden. In der Tabelle ist die Ausbeute an Serin der jeweiligen Schnittführung im Vergleich zur optimalen Prozeßführung angegeben, die aus den Referenzwerten der HPLC ermittelt wurde. Zur Berechnung der optimalen Produktmenge wurde von einer Dauer der Produktfraktion von vier Minuten ausgegangen. Diese Methode gewährleistet eine optimale Menge an Serin bei gleichzeitig hoher Konzentration im aufgefangenen Produktstrom.

Tabelle 5.5: Gegenüberstellung der möglichen Prozeßführung durch die 2D-Fluoreszenzspektroskopie und der bisher verwendeten Schnittführung der AMINO GmbH

<b>Trennkolonne</b>	<b>Datum</b>	<b>Maximale Produktmenge</b>	<b>AMINO Schnittführung</b>	<b>Fluoreszenz Schnittführung</b>
1	November 1999	4,7 kg	48,9 %	98,7 %
2	November 1999	5,4 kg	77,1 %	100 %
3	November 1999	5,6 kg	11,6 %	100 %
4	November 1999	6,1 kg	84,7 %	96,4 %
5	November 1999	5,1 kg	68,4 %	100 %
6	November 1999	5,3 kg	50,1 %	97,3 %
1	April 2000	4,5 kg	84,7 %	99,6 %
3	April 2000	5,6 kg	99,7 %	99,6 %
4	April 2000	5,1 kg	92,2 %	100 %
5	April 2000	4,7 kg	69,1 %	100 %
4	September 2001	3,8 kg	87,5 %	100 %
4	September 2001	5,7 kg	92,3 %	98,4 %
<b>Mittelwert</b>		<b>5,1 kg</b>	<b>72,2 %</b>	<b>99,2 %</b>

Die momentan bei der AMINO GmbH verwendete Prozeßführung weist hohe Schwankungen in der Ausbeute auf. Im November 1999 wurden die Schnittgrenzen für die Serinfraktion so gesetzt, daß eine Ausbeute an Serin von lediglich 11,6 % erzielt wurde. Auch bei der durchschnittlichen Ausbeute konnte durch Messungen über den Zeitraum von etwa 2 Jahren gezeigt

werden, daß lediglich 72 % des Serins direkt durch die Prozeßführung erfaßt werden. Durch die unsichere Bestimmung der Serinfraktion müssen die Flanken der Fraktion den Trennprozeß mehrfach durchlaufen. Durch diese erneuten Chromatographierungsschritte kommt es zu einem zusätzlichen Energie- und Rohstoffbedarf.

Durch die Online-Fluoreszenzmessungen ist eine zuverlässigere Bestimmung und Vorhersage der Serinfraktion möglich. Bei dieser Methode konnten im beobachteten Zeitraum nur sehr geringe Abweichungen von maximal 4 % von der optimalen Prozeßführung festgestellt werden. Somit ist eine genauere und engere Festsetzung der Schnittgrenzen für Serin möglich, wodurch die Produktionskosten gesenkt werden könnten und eine geringere Umweltbelastung durch die Re-Chromatographierung erreicht würde.

Der Einsatz der 2D-Fluoreszenz als Online-Analytik in Verbindung mit einer chemometrischen Auswertung bietet weiterhin den Vorteil, bei Verwendung neuer Melassechargen keine erneute Kalibrierung zu benötigen (s. Kapitel 5.4). Dieses ist bei der bisherigen Prozeßführung für jede neue Melasselieferung notwendig, und die Ergebnisse sind zum Teil erst nach einer erheblichen Zeitverzögerung von einer Woche verfügbar. Innerhalb dieses Zeitraums ist keine zufriedenstellende Prozeßführung möglich, woraus hohe Kosten für erneute Chromatographierungsschritte resultieren. Dieses Problem kann durch den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie vermieden werden.

Mit den Fluoreszenzmessungen am Trennprozeß konnte gezeigt werden, daß die 2D-Fluoreszenz eine geeignete Online-Analytik für die Prozeßüberwachung der Melasseauftrennung darstellt. Mit dieser Analytik ist eine bessere Festsetzung der Schnittgrenzen für die Serinfraktion als mit den bisherigen Methoden möglich.

## **5.6 Zusammenfassung**

Mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde eine neue Methode zur Online-Überwachung der chromatographischen Melasseentzuckerung vorgestellt.

Zunächst konnten an Eluatproben der Melasseaufreinigung durch Hauptkomponentenanalyse jeweils unterschiedliche, charakteristische Fluoreszenzverläufe aufgezeigt werden. Für die Aminosäure Tyrosin war eine Bestimmung in den Eluatproben durch die Wellenlänge Ex270/Em310 nm möglich. Für die Melasseinhaltsstoffe Threonin, Asparagin und Serin war ebenfalls eine Korrelation mit Fluoreszenzdaten möglich. Der für die Korrelation verwendete Fluorophor konnte als polymeres Maillardprodukt identifiziert werden.

Die Versuche mit den Offline-Proben wurden dann zum Aufbau eines Online-Monitorings für Serin genutzt. Durch Korrelation der Serindaten mit den zwei Minuten früher detektierten Fluoreszenzdaten und anschließender chemometrischer Auswertung konnte eine Optimierung der Vorhersage erreicht werden. Dieses Modell wurde im Anschluß für unterschiedliche Melassechargen und für Chromatographiezyklen mit außergewöhnlich hohen Serinkonzentrationen überprüft. Bei allen Versuchen über einen Zeitraum von 18 Monaten konnte die Leistungsfähigkeit und Stabilität der Analytik unter Beweis gestellt werden.

Abschließend wurde ein Vergleich zwischen den momentan verwendeten Meßmethoden und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie als Online-Analytik zur Serinbestimmung gezeigt. Dabei erwies sich die 2D-Fluoreszenzspektroskopie den bisher zur Prozeßführung verwendeten Prozeßparametern als deutlich überlegen.

## **6 Einsatz der NIR-Spektroskopie bei der chromatographischen Melasseauftrennung**

Die NIR-Spektroskopie ist eine in der Zuckerindustrie häufig angewandte Online-Methode. Deshalb soll die NIR-Spektroskopie auf ihre Einsatzmöglichkeiten zur Prozeßbeobachtung der chromatographischen Melasseentzuckerung getestet werden.

Zuerst werden die NIR-Spektren von Wasser, Saccharose, Betain und Serin vorgestellt und diskutiert. Dabei sollen signifikante, charakteristische Banden in den NIR-Spektren der reinen Substanzen gefunden werden, die zur Kalibration genutzt werden können. Im Anschluß erfolgt eine Kalibration, die zunächst an einigen Eluatproben mit komplexer Matrix überprüft werden soll. Die Einsatzmöglichkeiten der NIR-Spektroskopie bei der chromatographischen Melasseentzuckerung werden dann exemplarisch an Eluatproben aus einem kompletten Chromatographiezyklus aufgezeigt.

### **6.1 NIR-Spektroskopie in der Zuckerindustrie – Stand der Technik**

Im Bereich der Zuckerindustrie wurde in den letzten Jahren besonders die NIR-Spektroskopie als Online-Meßmethode untersucht. Die entscheidenden Vorteile dieser Methode liegen in der schnellen Verfügbarkeit der Analysenergebnisse sowie der Möglichkeit zur Verwendung von Lichtleitern, die Online-Messungen ohne Probenentnahme erlauben.

Eine Möglichkeit der Anwendung der NIR-Spektroskopie liegt in der Bestimmung von Stickstoff. Durch die Bestimmung von Stickstoff in Zuckerrüben konnte ein effizienterer Einsatz von Düngemitteln erreicht werden [46-48].

Mit Hilfe der NIR-Spektroskopie werden in Melasse viele unterschiedliche Substanzen bestimmt. Zucker wie Saccharose, Fructose und Glucose, aber auch Prozeßparameter wie der Gehalt an Trockensubstanz in Melasse können bestimmt werden [49-52].

Insbesondere bei der chromatographischen Melasseauftrennung bietet sich diese Analytik an, da bei der Aufreinigung keine suspendierten Feststoffe vorhanden sind und somit eine leichte Transmissionsmessung möglich ist.

In bisherigen Studien zur chromatographischen Melasseauftrennung wurden immer Hauptkomponentenanalysen oder Multi-Lineare-Regressionsmodelle verwendet [53-55], die einige entscheidende Nachteile beinhalten. So sind bei diesen Modellen sehr langwierige Kalibrationen notwendig, die sich zum Teil über Jahre erstrecken können. Selbst in diesen

Fällen werden zumeist Änderungen im Prozeß von den erstellten Modellen nicht erfaßt. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Prozesse ist selten möglich [56-58].

Diese Schwierigkeiten können vermieden werden, wenn eine direkte Auswertung der NIR-Spektren erfolgt, bei der eine eindeutige Zuordnung von Banden im NIR-Spektrum zu Substanzen in der Melasse verwendet wird. Diese Analytik bietet den entscheidenden Vorteil, daß sie auch bei Abweichungen im Prozeß anwendbar bleibt und somit veränderte Trenneigenschaften im Chromatographieprozeß oder Unterschiede in der Zusammensetzung von Melasse automatisch berücksichtigt. Des weiteren werden Kalibrationen für die zu bestimmende Substanz wesentlich erleichtert, was mit einem geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist.

## 6.2 NIR-Spektrum von Wasser und wäßrigen Lösungen

Wasser besitzt einen großen Einfluß auf die NIR-Spektren wäßriger Lösungen [51]. Um die Einsatzmöglichkeiten der NIR-Spektroskopie bei der chromatographischen Melasseentzuckerung in wäßrigen Lösungen aufzeigen zu können, ist es notwendig, zunächst das NIR-Spektrum von deionisiertem Wasser zu betrachten.

Für die Messungen wurde ein Spektrometer der Firma Polytec verwendet, das einen Spektralbereich zwischen 1260 nm und 2200 nm bei einer Auflösung von 4 nm Bandbreite erfaßt. Es wurde nur eine Meßwiederholung je Meßpunkt gewählt. Diese Geräteeinstellung wurde für alle folgenden NIR-Messungen übernommen. Die Messungen erfolgten in einer Quarzglasküvette mit 2 mm Schichtdicke.

Das NIR-Spektrum von deionisiertem Wasser ist in Abbildung 6.1 dargestellt. In diesem Spektrum sind deutlich zwei starke Absorptionsbanden von Wasser bei 1450 nm und 1940 nm zu erkennen. Die Bande bei 1450 nm entsteht durch die Kopplung einer symmetrischen und einer asymmetrischen Streckschwingung im Wassermolekül und die Bande bei 1940 nm wird durch die Kombination von Streck- und Deformationsschwingung verursacht [58]. Durch die hohe Absorption in diesem Bereich hängt das detektierte Signal nicht mehr linear vom Absorptionswert ab, was an dem Rauschen in den Banden zu erkennen ist.

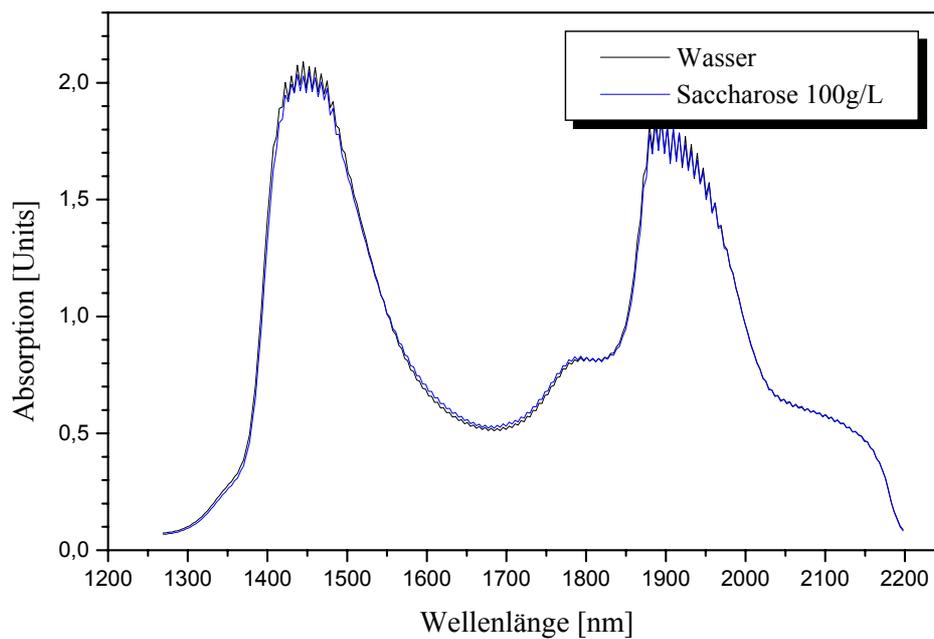


Abbildung 6.1: NIR-Spektrum von Wasser und einer Saccharoselösung 100 g/L

Bei der Darstellung von NIR-Spektren wässriger Lösungen treten häufig Schwierigkeiten auf, da die Absorption der gewünschten Substanzen meist deutlich geringer als die des Wassers ist. Dieses ist für eine Saccharoselösung mit einer Konzentration von 100 g/L in Abbildung 6.1 zu sehen. Der Verlauf der Absorption der Lösung wird hauptsächlich von Wasser bestimmt, wodurch der Kurvenverlauf nicht von dem des deionisierten Wassers zu unterscheiden ist. Um dennoch eine geeignete Darstellung zu ermöglichen, wird bei allen nachfolgenden Versuchen von den NIR-Spektren der Lösungen das Grundspektrum des Wasser abgezogen. In den so erhaltenen Differenzspektren lassen sich auch geringere Absorptionsbanden der gelösten Substanzen erkennen.

### 6.3 NIR-Differenzspektren wichtiger Melasseinhaltsstoffe

Ein wichtiges Kriterium für den Aufbau einer Analytik ist die spezifische Detektion der zu bestimmenden Komponente. Deshalb werden im folgenden die NIR-Differenzspektren wichtiger Melasseinhaltsstoffe untersucht, um mögliche vorhandene charakteristische Banden in den Spektren aufzeigen zu können.

Neben dem Saccharoseanteil sind in der Melasse die Inhaltsstoffe Serin und Betain von wirtschaftlichem Interesse. Deshalb wurden für diese drei Substanzen Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 20 g/L erstellt und von den aufgenommenen NIR-Spektren das

Spektrum von Wasser subtrahiert, um so die Differenzspektren zu erhalten. Eine Übersicht der NIR-Differenzspektren ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

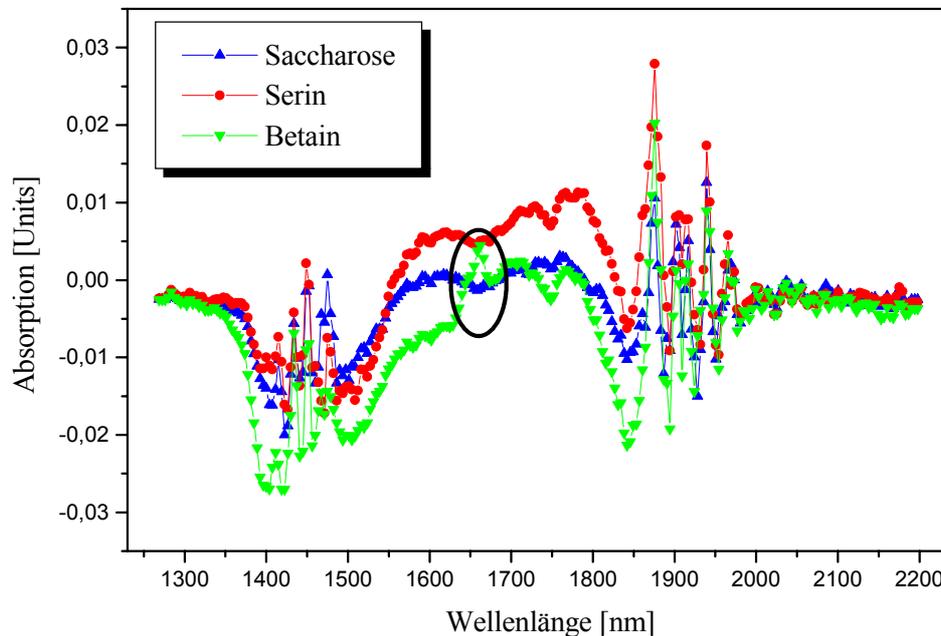


Abbildung 6.2: NIR-Differenzspektren der wässrigen Lösungen Saccharose, Serin und Betain (jeweils 20 g/L)

In den NIR-Differenzspektren aller drei Melasseinhaltsstoffe ist ein starkes Rauschen in den beiden Bereichen bei 1450 nm und 1900 nm festzustellen. Dieses wird durch die sehr hohe Absorption des Wassers in diesen Wellenlängenbereichen verursacht, wodurch das detektierte Signal nicht mehr linear vom Absorptionswert abhängt, wie bereits an Messungen von Wasser gezeigt werden konnte.

Für die beiden Substanzen Serin und Betain kann eine weitere Bande bei 1750 nm festgestellt werden, wahrscheinlich handelt es sich dabei um Stickstoff-Wasserstoff Interaktionen. Eine genaue Zuordnung der Banden ist jedoch sehr schwierig und zumeist unmöglich [58]. Da diese Bande bei mehreren Substanzen auftritt, ist sie somit für eine spezifische Detektion einzelner Melasseinhaltsstoffe ungeeignet. Es bestände allerdings die Möglichkeit, mit dieser Bande eine Gesamt-Stickstoffbestimmung in wässrigen Lösungen durchzuführen, dieses müßte jedoch in weiteren Versuchen eingehender untersucht werden.

Eine einzelne charakteristische Bande ist für die Substanz Betain bei einer Absorption von 1660 nm zu erkennen. Diese Bande tritt bei vierfach gebundenem Stickstoff wie in Betain oder Tetramethylammoniumionen auf [59]. Da in Melasse lediglich Betain vierfach gebunden

Stickstoff enthält und in höheren Konzentrationen auftritt, kann diese Bande zu einer spezifischen Detektion von Betain in Melasse und damit dem Aufbau einer Betain-Analytik genutzt werden.

#### 6.4 Erstellung einer Kalibrationsgeraden für Betain

Die für Betain gefundene, charakteristische Bande im NIR-Spektrum soll nun zu einer spezifischen Detektion genutzt werden. Dazu muß mit Hilfe des gefundenen Peaks eine Kalibration erstellt werden, mit der anschließend eine Bestimmung von Betain in Realproben erfolgen kann.

Die Kalibration erfolgt durch Peakauswertung mit Basislinienkorrektur. Diese Methode hat gegenüber chemometrischen Modellen den Vorteil, daß eine genaue Zuordnung eines Peaks zu einer Substanz möglich ist. Dadurch wird eine leichte Kalibration mit wenigen Proben ermöglicht, die sich im Anschluß auch auf unterschiedliche Prozesse einfach übertragen läßt. Durch die Basislinienkorrektur können insbesondere bei Messungen an Realproben die zumeist sehr breiten Banden der Matrix herausgefiltert werden.

Um den Einfluß der breiten Banden der Matrix bei den Realproben zu minimieren, sollte der gewählte Bereich zur Berechnung der Peakhöhe möglichst gering sein. In Abbildung 6.3 ist ein Ausschnitt aus dem Differenzspektrum von Betain dargestellt.

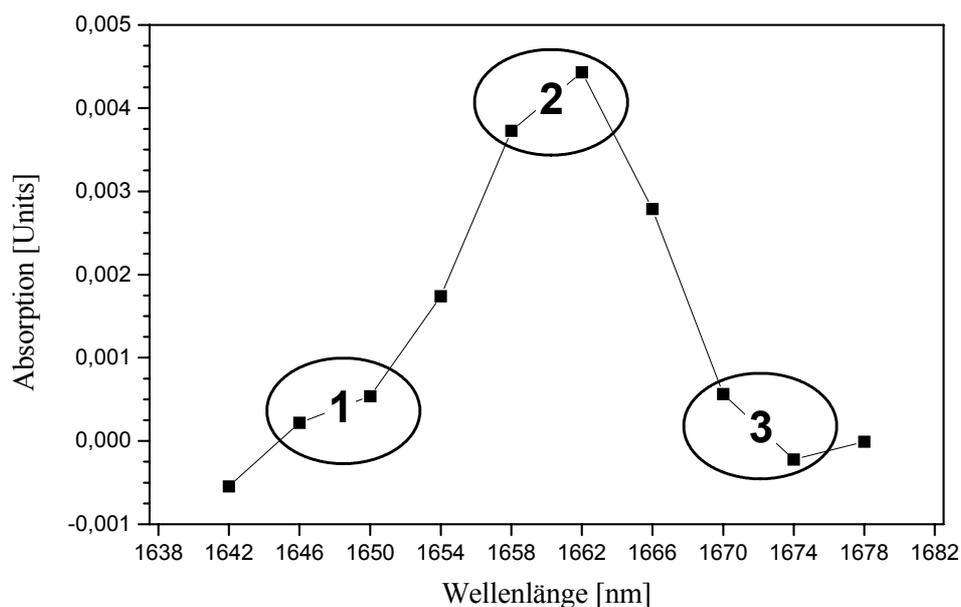


Abbildung 6.3: Ausschnitt des NIR-Differenzspektrums einer Betainlösung (20 g/L)

Zur Berechnung der Peakhöhe wird vom Bereich 2 das arithmetische Mittel der Bereiche 1 und 3 subtrahiert. Jeder einzelne Bereich wird als Summe zweier Meßpunkte berechnet, wodurch Meßungenauigkeiten durch Rauschen minimiert werden. Damit läßt sich die Peakhöhe nach Gleichung 6.1 berechnen.

$$\text{Signal} = \frac{[\text{Abs}_{1658\text{nm}} + \text{Abs}_{1662\text{nm}}]}{2} - \frac{[(\text{Abs}_{1646\text{nm}} + \text{Abs}_{1650\text{nm}}) + (\text{Abs}_{1670\text{nm}} + \text{Abs}_{1674\text{nm}})]}{4} \quad (6.1)$$

Die Kalibration wurde mit wäßrigen Betain-Lösungen erstellt und erfolgte im Konzentrationsbereich von 0 g/L bis 100 g/L, was dem zu erwartenden Bereich der Realproben entspricht. Die Ergebnisse der Kalibration sind in Abbildung 6.4 dargestellt.

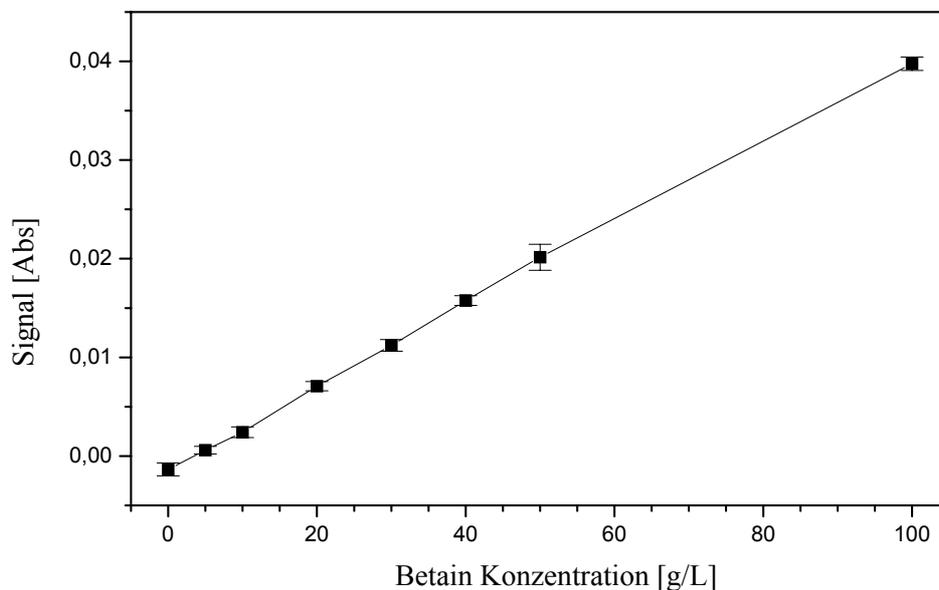


Abbildung 6.4: Kalibration für Betain im Konzentrationsbereich zwischen 0 g/L und 100 g/L

Im gesamten Konzentrationsbereich bis zur maximalen Betainkonzentration von 100 g/L ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Betainkonzentration und der ermittelten Peakhöhe zu erkennen ( $R = 0,99952$ ). Der durch lineare Regression ermittelte Ordinatenschnittpunkt liegt bei  $-0,00122$ , was wahrscheinlich durch Matrixeinflüsse des Wassers verursacht wird. Im Anschluß kann mit der Kalibration die Betainkonzentration in Realproben durch Verwendung der linearen Regression nach Gleichung 6.2 bestimmt werden.

$$\text{Betain [g/L]} = (\text{Signal} + 0,0012) \times 2412 \quad (6.2)$$

## 6.5 Überprüfung der Kalibration nach dem Standardzusatzverfahren

Die Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode sollte in einem ersten Test überprüft werden. Da die NIR-Spektroskopie für einen technischen Einsatz in der chromatographischen Melasseentzuckerung etabliert werden soll, wurden für den Test Eluatproben aus der Melasseaufreinigung gewählt. Dabei soll durch die Verwendung von Realproben zusätzlich überprüft werden, ob die an Standards entwickelte Kalibration vor dem Hintergrund von Matrixeinflüssen einsetzbar ist.

Dazu wurden zwei Proben aus dem Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung bei der AMINO GmbH entnommen und untersucht. Die Bestimmung der Betainkonzentration in den Proben erfolgte mittels HPLC. Die Probe A stammte aus einer Restfraktion mit hohem Salz- und geringem Betaingehalt von 0,7 g/L und die Probe B war aus der Betainfraktion mit hohem Betainanteil von 29,8 g/L. Beide Proben wurden in jeweils sechs gleiche Teile aufgeteilt und anschließend wurde kristallines Betain zugesetzt, so daß sich Konzentrationen im Bereich zwischen 0,7 – 80 g/L ergaben. Die vorhergesagten Betaingehalte wurden nach Gleichung 6.2 aus den NIR-Daten errechnet.

Somit konnte überprüft werden, ob eine Bestimmung der Betainkonzentration in Realproben möglich ist. Weiterhin wurde getestet, ob der Zusatz von Betain zu den Proben auch zu einem Anstieg des Meßsignals in erwarteter Höhe führen würde. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 6.5 zu sehen.

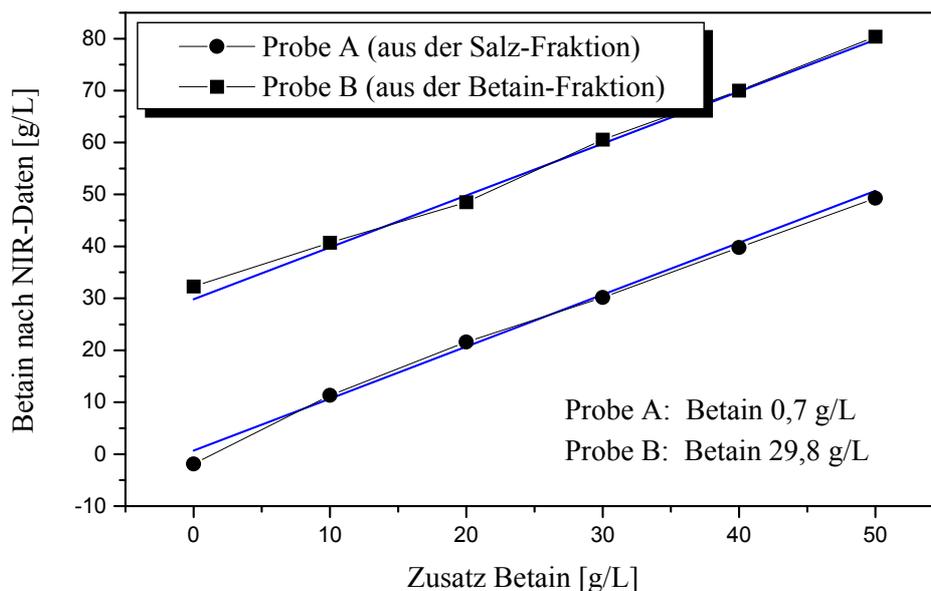


Abbildung 6.5: Zwei Proben aus der Melasseentzuckerung wurde Betain zugesetzt. Anschließend wurde die Betainkonzentration mittels NIR-Daten bestimmt.

Die Abweichungen der unbehandelten Proben betragen  $-2,79$  g/L für Probe A (für den Wert  $0,7$  g/L Betain) sowie  $+2,46$  g/L für Probe B (für den Wert  $29,8$  g/L Betain). Werden diese Abweichungen auf die im Prozeß maximal auftretende Konzentration von  $30$  g/L Betain bezogen, beträgt der prozentuale Fehler in beiden Fällen unter  $9$  %. Wird weiterhin berücksichtigt, daß die Kalibration für reine Betainstandards erstellt wurde und der Test an komplexen Melasseproben erfolgte, ergeben sich selbst bei komplexen Medien nur geringe Matrixeinflüsse.

Weiterhin ist zu erkennen, daß der Zusatz von Betain zu beiden Proben von der Analytik sehr gut erfaßt wird. Zusätzlich sind in der Abbildung die Geraden mit den tatsächlich in den Proben vorhandenen Betaingehalten eingezeichnet. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP) beträgt für alle Meßpunkte  $1,43$  g/L. Damit kann gezeigt werden, daß mit der Methode auch höhere Betainkonzentrationen bis  $80$  g/L in komplexen Proben sehr gut nachgewiesen werden können.

## 6.6 Validierung der Methode für einen kompletten Trennzyklus

Bei der Betainbestimmung mit den ersten Eluatproben lieferte die entwickelte Methode gute Ergebnisse. Aus diesem Grund soll anschließend die Leistungsfähigkeit des entwickelten Meßsystems durch die Analyse eines kompletten Zyklus der chromatographischen Melasse-entzuckerung bestätigt werden.

Dazu wurden während eines Chromatographiezyklus jede Minute Proben entnommen und mit dem NIR-Spektrometer untersucht. Die Referenzanalytik wurde mit einer HPLC durchgeführt. Für die Ermittlung der Betainkonzentration wurde – wie bei den ersten Eluatproben – die an Standards erstellte Kalibration verwendet.

In Abbildung 6.6 ist eine gute Übereinstimmung der berechneten Betainkonzentrationen mit den Referenzwerten zu erkennen. Eine signifikante Abweichung tritt lediglich zwischen den Minuten  $30$  bis  $70$  auf, während derer der Hauptteil der Zuckerfraktion eluiert. Wahrscheinlich führen hohe Zuckerkonzentrationen bis zu  $200$  g/L zu einer Veränderung des NIR-Spektrums, woraus eine geringfügige Abweichung in der Bestimmung des Betaingehaltes resultiert.

Von den für die weitere Aufarbeitung wichtigen Proben mit Betainkonzentrationen über  $20$  g/L beträgt der durchschnittliche Fehler der Vorhersage (RMSEP)  $2,35$  g/L, was bei einer maximal auftretenden Konzentration von  $30$  g/L einem relativen Fehler von  $7,8$  % entspricht. Von den  $15$  Proben mit Betaingehalten über  $20$  g/L wurde lediglich eine Probe bei der Berechnung falsch bestimmt und mit einem Seringehalt von unter  $20$  g/L wiedergegeben. Damit stellt die

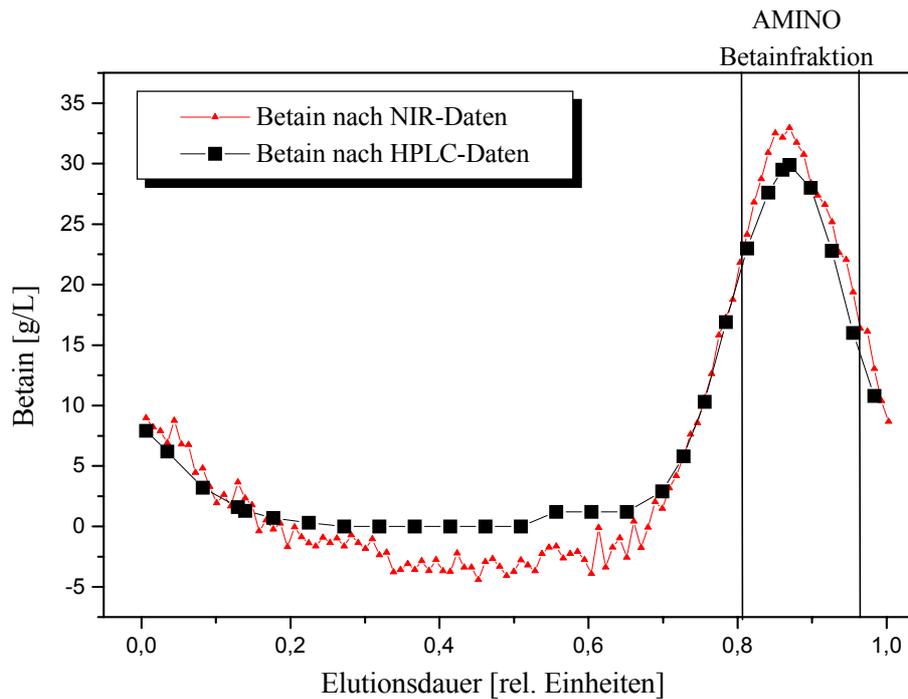


Abbildung 6.6: Betainbestimmung mit NIR-Spektroskopie für einen kompletten Zyklus der chromatographischen Melasseentzuckerung

Bestimmung von Betain aus NIR-Daten eine deutliche Verbesserung gegenüber der in Abbildung 6.6 eingezeichneten momentanen Prozeßführung dar. Damit ist die an Standardproben entwickelte Methode nicht nur auf Industrieprozesse übertragbar, es konnte sogar eine deutliche Verbesserung gegenüber gegenwärtig verwendeten Verfahren am Beispiel der chromatographischen Melasseentzuckerung gezeigt werden.

## 6.7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einsatzmöglichkeiten der NIR-Spektroskopie zur Prozeßbeobachtung der chromatographischen Melasseentzuckerung untersucht.

Zunächst wurden die NIR-Spektren von Wasser und einer wäßrigen Saccharoselösung vorgestellt. Anhand dieser Spektren konnte die Notwendigkeit zur Darstellung von Differenzspektren gezeigt werden, um eine sinnvolle Interpretation der Daten zu ermöglichen. In den Differenzspektren der Lösungen von Saccharose, Betain und Serin konnte lediglich im Falle des Betains eine spezifische, charakteristische Bande im NIR-Spektrum gefunden werden. Diese Bande wurde im Anschluß zur Erstellung einer Kalibration mit Betainstandards genutzt.

Dabei wurde ein Modell zur Peakauswertung mit Basislinienkorrektur gewählt, das eine lineare Korrelation zwischen Betainkonzentration und Peakhöhe lieferte.

Die Anwendbarkeit der Methode wurde im Anschluß mit Eluatproben aus der industriellen Melasseaufreinigung getestet. Dabei war in den Eluatproben sowohl eine Bestimmung des Betains möglich als auch ein Test nach dem Standardzusatzverfahren für die Eluatproben erfolgreich. Die Ergebnisse konnten abschließend für einen kompletten Chromatographiezyklus bestätigt werden.

Damit wurde die Leistungsfähigkeit der an Standards entwickelten Methode zum Nachweis von Betain unter Beweis gestellt, mit Hilfe derer eine Bestimmung von Betain in Eluatproben trotz der komplexen Matrix möglich war. Die gewonnenen Erkenntnisse sind wahrscheinlich durch ihre Spezifität in der Detektion von Betain nicht nur auf den Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung beschränkt, sondern lassen sich auch auf andere Prozesse in der Zuckerindustrie übertragen.

## 7 Überwachung anaerober Prozesse

Anaerobe Prozesse können mit Hilfe geeigneter Sauerstoffindikatoren überwacht werden. In der vorliegenden Arbeit sollen die Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie zur Überwachung anaerober Prozesse untersucht werden. Dazu wird der Sauerstoffindikator Resazurin eingesetzt, der bereits 1871 entdeckt und bisher als Farbindikator verwendet wird [60].

Zunächst werden die Fluoreszenzeigenschaften von Resazurin untersucht. Dabei sollen die 2D-Fluoreszenzspektren von Resazurin und dessen Reduktionsprodukten vorgestellt werden. Mit der Erstellung einer Kalibrationsgeraden wird dann eine geeignete Resazurinkonzentration ermittelt, die in späteren Fermentationsprozessen eingesetzt werden kann. Die Reversibilität des Vorganges soll durch wiederholte Oxidation und Reduktion gezeigt werden.

Die Anwendung der Fluoreszenz zur Prozeßüberwachung soll exemplarisch an Hand von Kultivierungen des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* gezeigt werden. Eine Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie wird abschließend durch den Einsatz eines Industriemediums auf Lactatbasis aufgezeigt.

### 7.1 Anwendung von Resazurin – Stand der Technik

Resazurin wird zur Kontrolle des Redoxpotentials und zur Überprüfung des anaeroben Milieus in Bioreaktoren eingesetzt. Die Verwendung von Resazurin für den Nachweis von Sauerstoff bietet gegenüber dem Einsatz von Sauerstoffelektroden den Vorteil, daß auf Grund der hohen Empfindlichkeit von Resazurin insbesondere Sauerstoffkonzentrationen im Spurenbereich detektierbar sind [20].

Der Sauerstoffindikator wird in zwei Schritten reduziert. Der erste Schritt ist irreversibel vom blauen Resazurin zum roten Resorufin und der zweite Schritt ist eine reversible Reduktion zum Dihydroresorufin [61]. Die Umwandlung zwischen oxidiertem und reduziertem Form tritt sehr schnell ein [21], so daß die Substanz gut für eine Online-Kontrolle des Redoxpotentials geeignet ist. Keine der drei Modifikationen besitzt in dem für Fermentationsprozesse geeigneten Konzentrationsbereich einen toxischen Einfluß auf Mikroorganismen [21].

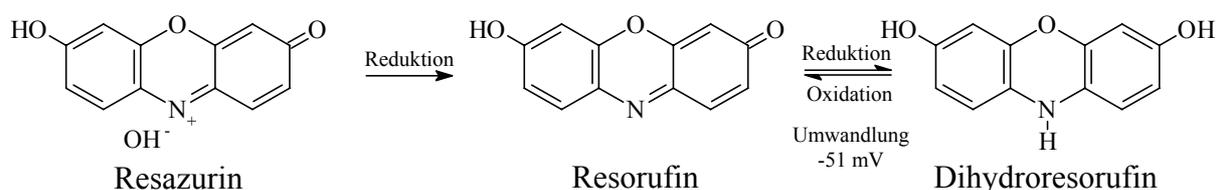


Abbildung 7.1: Umwandlung von Resazurin in zwei Schritten

Eine Anwendungsmöglichkeit von Resazurin besteht in der Detektion von Sauerstoff in Lösungen. Dieses konnte bei enzymatisch katalysierten Reaktionen von Zuckern wie Fructose oder Glucose mit Sauerstoff genutzt werden, wobei Resazurin reduziert wird [62,63]. Mit diesem System konnte eine Glucosebestimmung in Blut realisiert werden [64].

Resazurin kann ebenfalls durch eine katalytische Reaktion in Zellen reduziert werden [65]. Damit läßt sich die Zellzahl photometrisch oder fluorimetrisch durch die Bildung von Resorufin bestimmen. Bereits 80 Zellen liefern ein reproduzierbares Signal, wodurch die Methode in der Sensitivität mit radioaktiven Verfahren vergleichbar ist [66].

Resazurin wird seit 50 Jahren zur Hefe- und Bakterienbestimmung in Milch verwendet und findet bis heute zu diesem Zweck Anwendung [67,68]. Auch auf andere Lebensmittelprodukte wie Fleisch- oder Getreideprodukte ist die Methode übertragbar [69].

Weiterhin wurde auf der Basis von Resazurin ein Testkit zur Vitalitätsbestimmung von Zellen entwickelt. In dem Testkit wird dem Indikator Eisencyanid zugesetzt. Diese Substanz wirkt zwar als Inhibitor beim Elektronentransport in der Atmungskette [70], eine Reduktion des Resazurins durch das Kulturmedium wird jedoch verhindert. Damit findet die Reduktion von Resazurin ausschließlich innerhalb der Zellen statt [71].

Alle bisherigen Tests auf der Basis von Fluoreszenz beruhen auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin. Da diese Umsetzung irreversibel ist und schon bei hohen Sauerstoffkonzentrationen auftritt, ist eine Detektion der Vitalität anaerober Bakterien mit dieser Methode nicht möglich. Deshalb soll in dieser Arbeit die reversible Reduktion von Resorufin zu Dihydroresorufin mittels Fluoreszenz verfolgt und zur Vitalitätsbestimmung anaerober Bakterien genutzt werden.

## 7.2 Fluoreszenzeigenschaften des Sauerstoffindikators Resazurin

Bevor die Anwendung des Sauerstoffindikators Resazurin bei Fermentationsprozessen erfolgen kann, sollen zunächst die allgemeinen Fluoreszenzeigenschaften dieses Fluorophors vorgestellt werden. Darunter sollen die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt und interpretiert werden:

- Das 2D-Fluoreszenzspektrum von Resazurin
- Einordnung der Fluoreszenz von Resazurin in Kulturmedien
- Erstellung einer Kalibrationsgeraden
- Reduktion von Resazurin mit Natriumthioglycolat
- Test zur Reversibilität der Reduktion von Resazurin

### 7.2.1 Das Fluoreszenzspektrum von Resazurin und seiner Derivate

Resazurin wird durch Reduktion zunächst in Resorufin und dann in Dihydroresorufin umgewandelt (s. Kapitel 7.1). Die Fluoreszenzspektren dieser drei Substanzen sollen zunächst für eine Interpretation der Fluoreszenzeigenschaften vorgestellt werden.

Für die Messungen wurde der F-4500 verwendet. Dieses Spektrometer wurde eingesetzt, weil es auf Grund der Verwendung von Gittern für eine Charakterisierung biogener Fluorophore gut geeignet ist [40,72]. Die verwendeten Meßeinstellungen sind in Tabelle 7.1 zusammengefaßt.

Tabelle 7.1: Meßeinstellungen des F-4500 für die Fluoreszenzmessungen mit Resazurin

Meßparameter	Einstellung
Exzitationswellenlängenbereich	250-650 nm
Emissionswellenlängenbereich	260-700 nm
Schrittweite der Exzitationswellenlänge	10 nm
Schrittweite der Emissionswellenlänge	10 nm
Spaltbreite (Slit) Exzitation	5 nm
Spaltbreite (Slit) Emission	10 nm
Photomultiplierspannung	700 Volt
Scangeschwindigkeit	12000 nm/sec

Alle Lösungen wurden in einem 0,1 M KPP-Puffer bei pH 8,0 angesetzt. Resazurin kann durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriumthioglycolat bis zum Dihydroresorufin reduziert werden. Anschließendes Schütteln der Lösung erhöht die Sauerstoffkonzentration wieder, so daß eine quantitative Oxidation bis zum Resorufin stattfindet. Erfolgt die Zugabe des Reduktionsmittels in der Meßküvette (Schichtdicke 2 mm) und wird diese gegen Luft abgedichtet, so entsteht das reduzierte Dihydroresorufin. Daraus ergeben sich für die Herstellung der Lösungen folgende Verfahren:

- Resazurin                    Lösen in Puffer
- Resorufin                    Lösen in Puffer, Zugabe Natriumthioglycolat und Schütteln
- Dihydroresorufin        Lösen in Puffer, Zugabe Natriumthioglycolat in die Küvette, Abdichten der Küvette gegen Luft und 1 Tag stehen lassen

Die eingesetzten Konzentrationen von Resazurin, Resorufin und Dihydroresorufin betragen bei jeder Messung 1 mg/L. Die 2D-Fluoreszenzspektren der Lösungen sind in Abbildung 7.2 dargestellt.

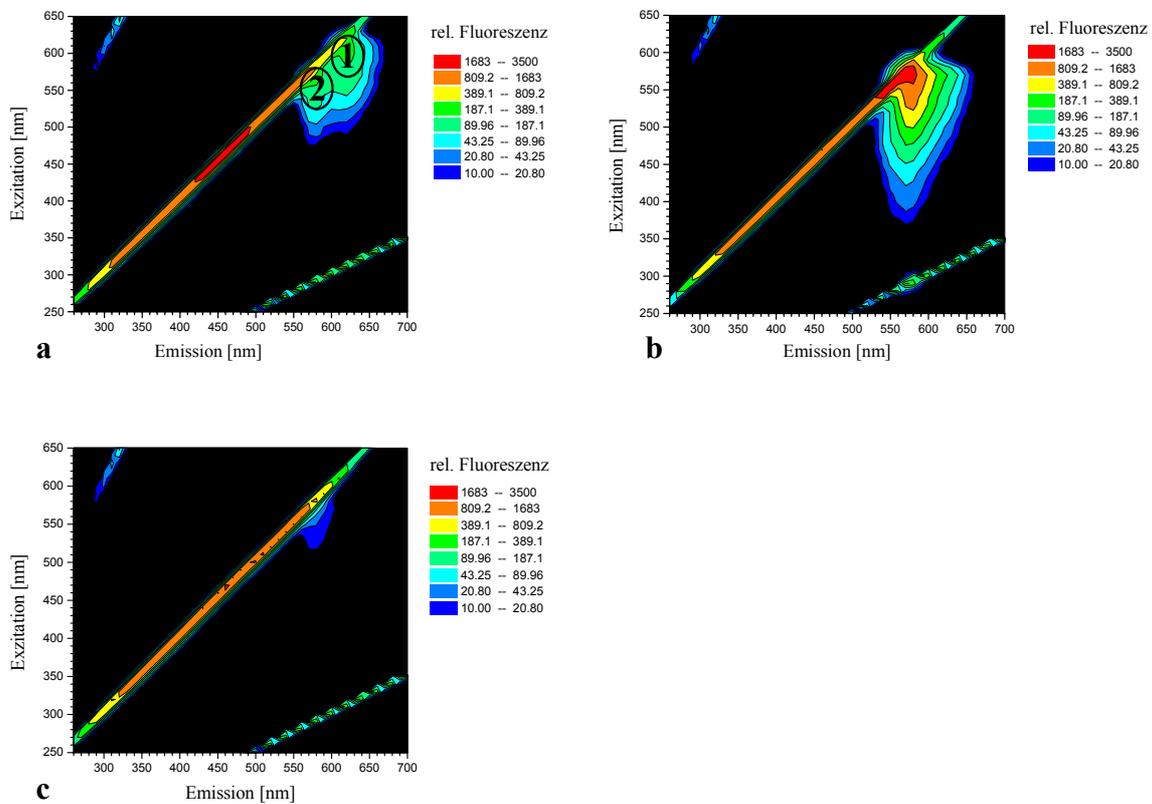


Abbildung 7.2: 2D-Fluoreszenzspektren von Resazurin (a), Resorufin (b) und Dihydroresorufin (c)

In der Abbildung 7.2 a sind zwei Exzitations/Emissions-Maxima für die Substanz Resazurin zu erkennen. Eines liegt im Bereich 1 bei Ex600/Em620 nm und das zweite in Bereich 2 bei Ex560/Em580 nm. Bei dem zweiten Fluoreszenzmaximum handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen von Resazurin mit Resorufin. Dieses kann durch das 2D-Fluoreszenzspektrum von Resorufin bestätigt werden. Das Fluoreszenzmaximum für Resorufin liegt eindeutig bei Ex560/Em580 nm, was exakt dem Bereich 2 im Spektrum von Resazurin entspricht. Damit handelt es sich bei dem zweiten Peak im Fluoreszenzspektrum von Resazurin zweifellos um Bestandteile von Resorufin. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Rasmussen et al. bei Untersuchung von der Firma Sigma gelieferten Resazurin [71]. Auch in dieser Arbeit konnten mittels HPLC Verunreinigungen von Resorufin in neu hergestelltem Resazurin festgestellt werden.

In dem Fluoreszenzspektrum von Resorufin ist nur ein einziges Fluoreszenzmaximum bei Ex560/Em580 nm zu erkennen, was den Angaben in der Literatur entspricht [73,74].

Für Dihydroresorufin ist nur eine sehr schwache Fluoreszenz detektierbar. Wahrscheinlich konnte die Küvette nicht vollständig gegen das Eindringen von Sauerstoff abgedichtet werden, so daß eine vollständige Reduktion von Resorufin nicht möglich war. Die Reste von Resorufin verursachen dadurch die auftretende Fluoreszenz.

Zusammenfassend konnten für Resazurin und Resorufin verschiedene Fluoreszenzmaxima mit unterschiedlicher Lage im 2D-Fluoreszenzspektrum aufgezeigt werden. Außerdem weist Resorufin eine sehr viel stärkere Fluoreszenz als Resazurin auf. Für die letzte reduzierte Stufe von Resazurin, das Dihydroresorufin, wurde keine Fluoreszenz festgestellt.

### 7.2.2 Fluoreszenz von Resazurin in Kulturmedien

Für den praktischen Einsatz von Resazurin bei anaeroben Fermentationsprozessen ist es von entscheidender Bedeutung, daß die Fluoreszenz des Sauerstoffindikators nicht durch Fluorophore im Medium überlagert wird. Um dieses zu überprüfen, sollen die 2D-Fluoreszenzspektren von Resazurin und eines Komplexmediums miteinander verglichen werden.

Für die Messungen wurde wie in dem vorangegangenen Kapitel das Prozeßspektralphotometer F-4500 verwendet. Die Meßeinstellungen wurden aus dem vorherigen Kapitel übernommen. Alle Messungen erfolgten in einer Quarzglas-Küvette mit 2 mm Schichtdicke. Es wurde für die Kultivierungen der Bakterien ein Medium mit 10 g/L Hefeextrakt, Puffer und Spurenelementen verwendet, die Zusammensetzung ist im Anhang Kapitel 10.5 aufgeführt. Die eingesetzte Resazurinkonzentration betrug 1 mg/L. Zusätzlich wurde ein 2D-Fluoreszenzspektrum von dem Reduktionsmittel Natriumthioglycolat aufgenommen. Diese Substanz soll in späteren Versuchen eingesetzt werden und daher muß nachgewiesen werden, daß diese Substanz keine Eigenfluoreszenz aufweist.

Die Fluoreszenzspektren von Resazurin, dem Komplexmedium und Natriumthioglycolat sind in Abbildung 7.3 dargestellt.

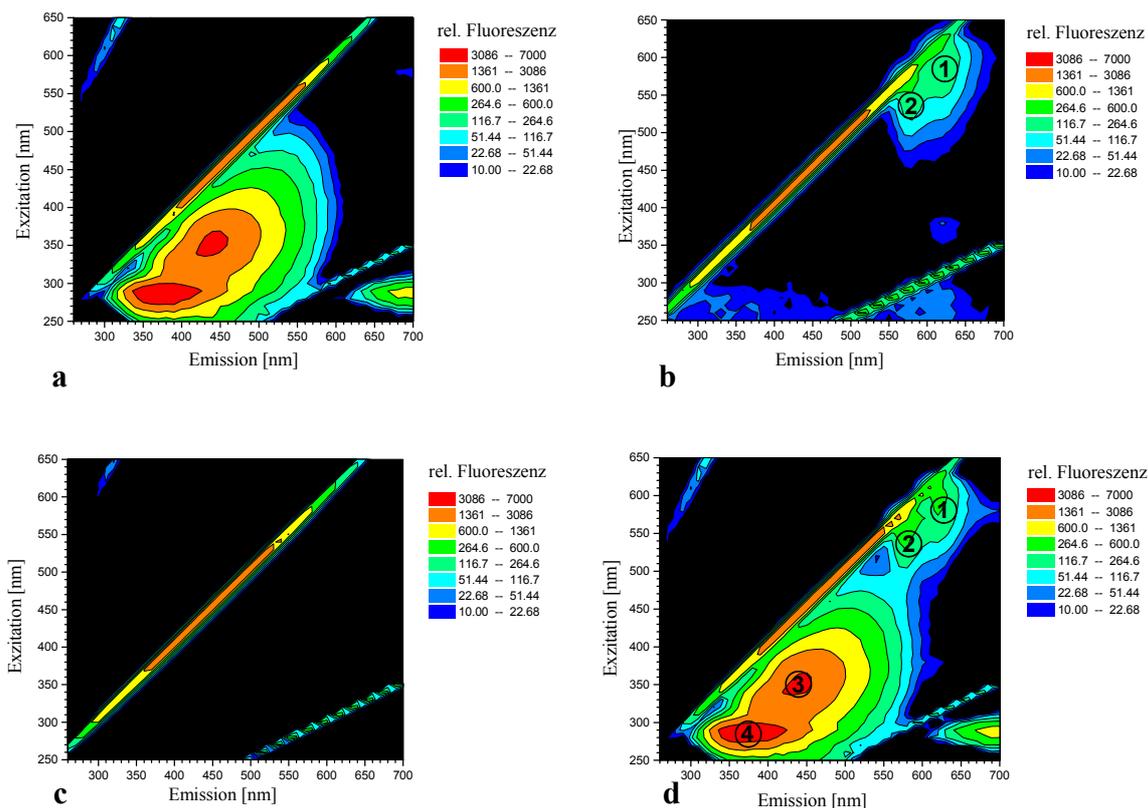


Abbildung 7.3: 2D-Fluoreszenzspektren von

**a** Komplexmedium**b** Resazurin**c** Natriumthioglycolat 0,75 g/L**d** Komplexmedium mit Resazurin

In dem 2D-Fluoreszenzspektrum des Komplexmediums mit Hefeextrakt sind deutlich zwei unterschiedliche Fluoreszenzmaxima zu erkennen. Ein Maximum liegt bei Ex270/Em370 nm und ist auf eine von Proteinen hervorgerufene Fluoreszenz zurückzuführen. Ein zweiter sehr großer Bereich ist um Ex360/Em450 zu erkennen, ein Bereich, in dem Vitamine und Co-faktoren fluoreszieren [34]. Diese Stoffe kommen ebenfalls im Hefeextrakt vor und erklären somit die hohe Fluoreszenz des Mediums im Vitaminbereich. Für Resazurin können zwei nahe nebeneinander liegende Fluoreszenzmaxima gefunden werden. Wie im vorherigen Kapitel verifiziert wurde, handelt es sich beim Bereich 1 um Resazurin und beim Bereich 2 um Resorufin. Das für Kulturmedien empfohlene Reduktionsmittel Natriumthioglycolat zeigt keinerlei Fluoreszenz.

Wird die Fluoreszenz eines Mediums nach Zugabe von Resazurin gemessen, so können alle Peaks von Resazurin und dem Medium unabhängig voneinander detektiert werden. Überlagerungen in der Fluoreszenz beider Stoffe treten nicht auf. Resazurin ist somit sehr gut zur

Fluoreszenzüberwachung in Kulturmedien geeignet und damit zur Online-Beobachtung von Fermentationsprozessen einsetzbar.

### 7.2.3 Erstellung einer Kalibrationsgeraden für Resazurin

Im folgenden soll die Vorgehensweise zur Erstellung einer Kalibrationsgerade für Resazurin beschrieben werden. Das Ziel dabei ist es, die untere Nachweisgrenze für Resazurin und den linearen Bereich der Kalibration zu ermitteln. Aus dem linearen Bereich können im Anschluß Rückschlüsse über eine geeignete Resazurinkonzentration für Fermentationsprozesse gezogen werden.

Die Verwendung von Küvetten bietet den Vorteil, daß sie gegenüber Lichtleitmessungen eine um den Faktor 100 höhere Sensitivität aufweist [40]. Die Einstellung der Spaltbreite (Slit) des F-4500 wurde für diese Messungen auf 10 nm für die Exzitation und auf 20 nm für die Emission heraufgesetzt, damit auch möglichst geringe Konzentrationen Resazurin nachgewiesen werden können. Alle anderen Einstellungen wurden aus Kapitel 7.2.1 übernommen. In Abbildung 7.4 ist die Kalibrationsgerade für Resazurin dargestellt.

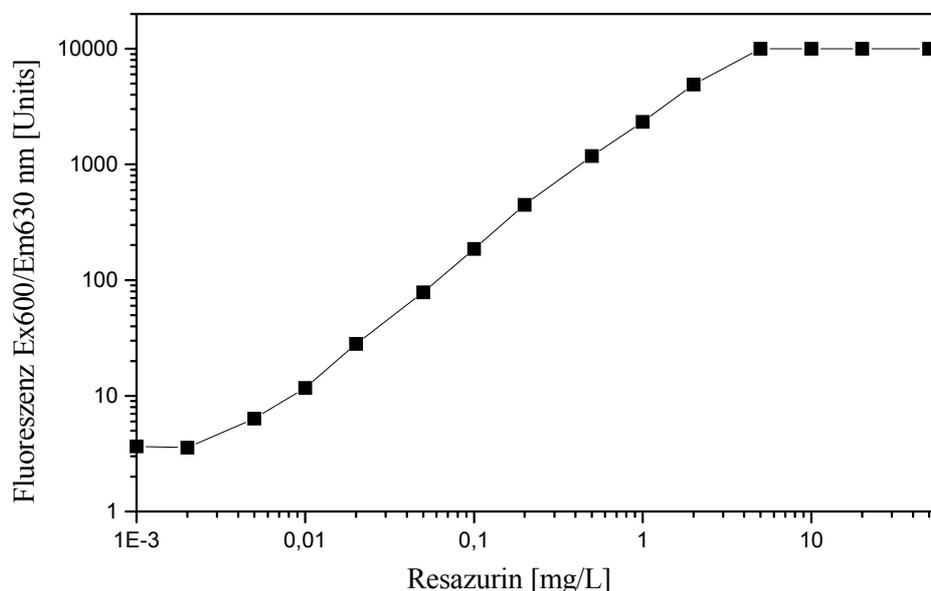


Abbildung 7.4: Kalibrationskurve für Resazurin

Zur Auswertung wurde die Wellenlänge Ex600/Em630 nm gewählt, die nah am Fluoreszenzmaximum von Resazurin liegt und nur eine geringe Beeinflussung durch Streulicht aufweist.

Als untere Nachweisgrenze für Resazurin konnte eine Konzentration von 0,01 mg/L ( $4 \cdot 10^{-8}$  M) ermittelt werden. Der lineare Bereich der Kalibration liegt zwischen 0,01 mg/L und 5 mg/L. Aus dieser Kalibration soll nun eine geeignete Resazurinkonzentration ermittelt werden, die bei späteren Fermentationsprozessen in Bioreaktoren eingesetzt werden kann. Für die Online-Fluoreszenzmessungen in Bioreaktoren ist der Einsatz von Lichtleitern notwendig, die jedoch eine erheblich geringere Sensitivität gegenüber den Messungen in Küvetten aufweisen. Deshalb soll eine möglichst hohe Resazurinkonzentration gewählt werden, die gleichzeitig noch den linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Konzentration des Fluorophors gewährleistet. Dafür ist die Konzentration von 1 mg/L Resazurin geeignet, die in allen weiteren Versuchen eingesetzt wird.

#### **7.2.4 Reduktion von Resazurin mit Natriumthioglycolat**

Nachdem das Fluoreszenzspektrum von Resazurin gezeigt und identifiziert wurde, soll nun der Reduktionsprozeß verfolgt werden. Das Ziel ist es dabei, in einem Modellversuch die Sauerstoffabnahme online durch Fluoreszenzmessungen von Resazurin zu verfolgen.

Die Messungen erfolgten in einem 1,5 L Bioreaktor (Werkstatt TCI, Universität Hannover). Mit dem großen Reaktorvolumen sollte einem Ausbleichen des Fluorophors durch die häufigen Messungen vorgebeugt werden. In dem Reaktor wurde 1,2 L in KPP-Puffer gelöstes Resazurin mit einer Konzentration von 1 mg/L vorgelegt. Danach wurde das in 30 mL deionisiertem Wasser gelöste Reduktionsmittel Natriumthioglycolat zugegeben.

Um eine gute Auflösung des Spektrums und damit die Unterscheidung zwischen den Fluorophoren Resazurin und Resorufin zu ermöglichen, wurden die Fluoreszenzmessungen mit dem F-4500 durchgeführt. Dieses Gerät wurde über einen Lichtleiter (Lumatec, Denzlingen) an den Bioreaktor angeschlossen. Die Einstellungen wurden aus dem Kapitel 7.2.3 übernommen.

Der Verlauf der Fluoreszenz von Resazurin ist in Abbildung 7.5 durch die Wellenlängenkombination Ex600/Em630 nm dargestellt. Aus der raschen Abnahme der Fluoreszenz ist zu erkennen, daß Resazurin sehr schnell reduziert wird. Auf Grund der Irreversibilität des Vorganges treten danach keine weiteren Veränderungen bei der Fluoreszenz von Resazurin auf.

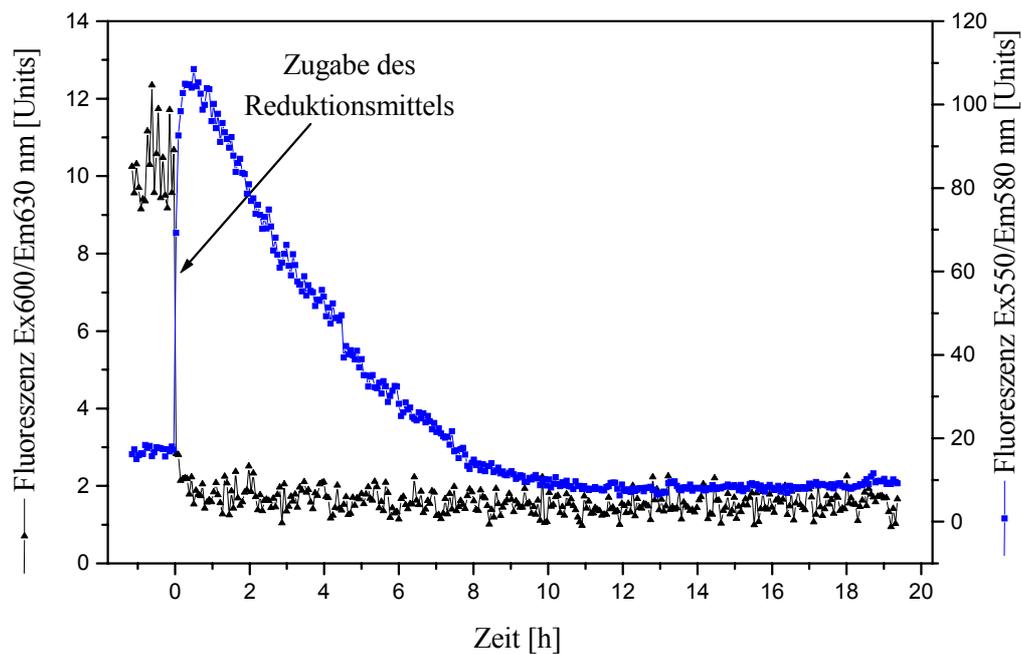


Abbildung 7.5: Fluoreszenz von Resazurin (—▲—) und Resorufin (—■—) nach Zugabe eines Reduktionsmittels

Für die Fluoreszenz von Resorufin ist ein anderer Verlauf zu erkennen. Durch die Zunahme der Resorufinkonzentration im ersten Schritt der Reduktion wird ein schlagartiger Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe des Reduktionsmittels detektiert. Danach nimmt die Fluoreszenz langsam über einen Zeitraum von ca. 12 Stunden wieder ab, da im zweiten Reduktionsschritt das Resorufin weiter reduziert wird. Das Maximum der Fluoreszenz ist für Resorufin deutlich höher als für Resazurin, was mit der höheren Quantenausbeute von Resorufin begründet werden kann [75].

Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, daß eine Online-Detektion der Sauerstoffabnahme durch den Indikator Resazurin möglich ist. Dabei ist Resorufin auf Grund der stärkeren Fluoreszenz besser für die Online-Detektion geeignet.

### 7.2.5 Test zur reversiblen Reduktion von Resazurin

Nach einem Modellversuch zur Online-Detektion von Resazurin soll im folgenden geprüft werden, ob ein Ausbleichen des Fluorophors durch häufiges Oxidieren und Reduzieren auftritt. Da im vorherigen Versuch nachgewiesen werden konnte, daß eine Reduktion von Resazurin mit Natriumthioglycolat nur sehr langsam abläuft, soll für eine wiederholte Oxidation und

Reduktion eine andere Substanz eingesetzt werden. Für diesen Zweck ist das Reduktionsmittel Sulfid geeignet, da mit diesem Stoff eine sehr schnelle Reduktion von Resazurin möglich ist [76]. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer BioView durchgeführt, da dieses Gerät bei Online-Fermentationsprozessen eingesetzt und bei diesem Versuch getestet werden soll. Die Meßeinstellungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Der Versuch wurde in einem 1,5 L Bioreaktor durchgeführt. Nach einer Vorlaufzeit von einer Stunde wurde zu dem in KPP-Puffer gelösten Resazurin eine konzentrierte Natriumsulfid-Lösung zugegeben, so daß sich eine Endkonzentration an Sulfid-Ionen von 1 g/L im Bioreaktor ergab. Nach jeweils 60 Minuten wurde in den Bioreaktor für 10 Sekunden Preßluft eingetragen, die durch 60 Sekunden Rühren bei 1200 Upm im Reaktor verteilt wurde. Für die anschließende erneute Reduktion des Sauerstoffs in der Lösung wurde der Rührer ausgeschaltet, um Sauerstoffeinträge aus Reaktorraum über der Flüssigkeit in das Medium zu minimieren. Durch erneutes Eintragen von Luft konnte der Vorgang der Oxidation und wiederholt werden. Der Verlauf der Fluoreszenz bei Ex550/Em590 nm ist der Abbildung 7.6 zu entnehmen.

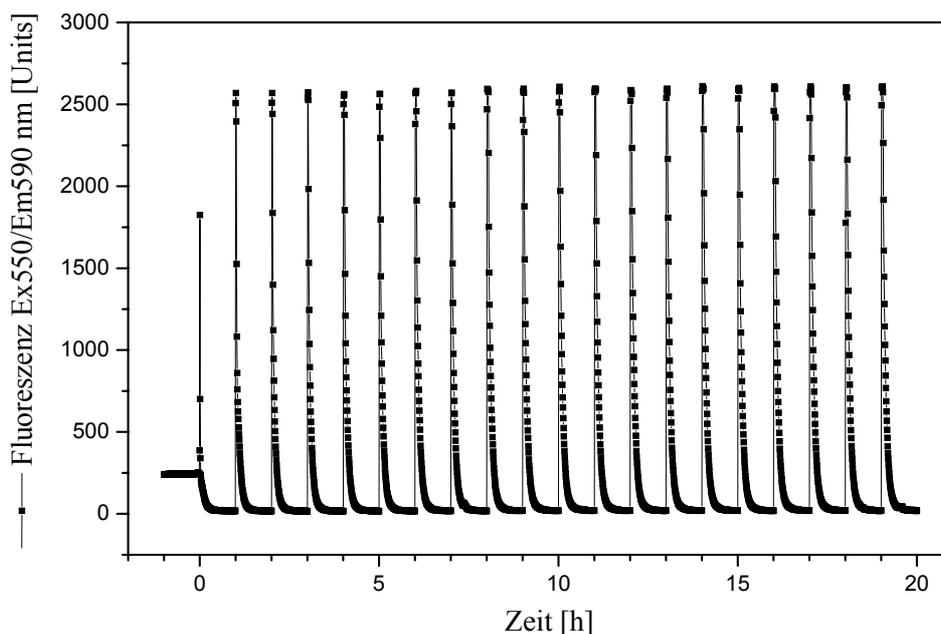


Abbildung 7.6: Fluoreszenz von Resorufin bei wiederholter Oxidation und Reduktion

Bei dieser Fluoreszenzwellenlänge wird Resorufin detektiert, wie in Kapitel 7.2.1 gezeigt werden konnte. Vor der Zugabe des Reduktionsmittels ist bereits eine Fluoreszenz von 250 Einheiten zu erkennen, was durch Verunreinigungen von Resorufin in Resazurin verursacht wird. Nach der Zugabe des Reduktionsmittels steigt die Fluoreszenz nur kurz an und nimmt dann wieder schnell ab. Während Resazurin zu Resorufin reduziert wird, findet bereits

gleichzeitig eine weitere Reduktion des Resorufins zum nicht fluoreszierenden Dihydroresorufin statt. So befinden sich nur geringe Mengen Resorufin in der Lösung, da ein Teil noch nicht reduziert und ein anderer Anteil bereits weiter reduziert wurde. Deshalb ist der erste Fluoreszenzpeak kleiner als die darauf folgenden.

Danach zeigt die Fluoreszenz den erwarteten Verlauf. Durch Einschalten des Rührers steigt die Fluoreszenz an – da Resorufin gebildet wird – und in der nächsten Stunde nimmt die Fluoreszenz wieder ab. Während 20 Stunden ist kein Ausbleichen des Fluorophors durch wiederholtes Oxidieren und Reduzieren festzustellen. Damit kann nachgewiesen werden, daß Resorufin über einen langen Zeitraum stabil bleibt und somit auch für längere Fermentationsprozesse einsetzbar ist.

### **7.3 Anwendung von Resazurin bei Kultivierungen von *Clostridium formicoaceticum***

Nachdem Resazurin in dem vorigen Modellversuchen erfolgreich bei der Detektion von Sauerstoff eingesetzt werden konnte, sollen nun die Anwendungen bei Kultivierungen anaerober Bakterien überprüft werden.

*Clostridium formicoaceticum* ist ein strikt anaerobes, sporenbildendes Bakterium. Es kann zur Herstellung von Calcium-Magnesium-Acetat (CMA) aus Molke genutzt werden. Bei der Abschätzung der Kosten für diesen Prozeß wurde in einer Arbeit von Yang et al. ein Vorteil der fermentativen Herstellung gegenüber herkömmlichen Methoden festgestellt [77].

Der praktische Einsatz von Resazurin soll exemplarisch an Hand der Vitalitätsbestimmung bei Kultivierungen von *C. formicoaceticum* demonstriert werden. Um ein gutes und schnelles Wachstum zu ermöglichen, wird in den ersten Versuchen ein Standardmedium auf Fructosebasis verwendet. Die Anwendbarkeit für die Nahrungsmittelindustrie wird abschließend durch den Einsatz eines Industriemediums aus Molke auf Lactatbasis aufgezeigt.

#### **7.3.1 Kultivierungsbedingungen**

Die Kultivierungen von *Clostridium formicoaceticum* wurden unter den in Tabelle 7.2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Zum Beimpfen des Bioreaktors wurden jeweils 50 mL Vorkultur verwendet, die in einer 500 mL Flasche mit Schraubverschluß (Schott, Mainz) bei 37° C angezüchtet wurden. Als Schutzgas wurde Stickstoff eingesetzt, und der Verschluß wurde mit einem Septum gegen

Luftsauerstoff abgedichtet. Eine genaue Beschreibung des Umganges mit den Vorkulturen von *C. formicoaceticum* sind dem Anhang (Kapitel 10.5) zu entnehmen. Die Bestimmung von Fructose und Acetat erfolgte mittels Enzymtestkits (Boehringer, Mannheim). Die detaillierten Geräteeinstellungen des BioViews sind dem Anhang (Kapitel 10.7.2) zu entnehmen.

Tabelle 7.2: Kultivierungsbedingungen

◆ <b>Betriebsweise</b>	Batch
◆ <b>Organismus</b>	<i>Clostridium formicoaceticum</i>
◆ <b>Kultivierungsanlage</b>	Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen) 1,5 L Stahlfermenter (Werkstatt TCI, Universität Hannover)
◆ <b>Meßdatenerfassung</b>	RISP (Real Time Integration Software Platform, TCI)
◆ <b>Arbeitsvolumen</b>	1,5 L
◆ <b>Medium</b>	DSMZ Fructose-Medium (Kapitel 10.5)
◆ <b>Temperatur</b>	37° C
◆ <b>pH-Wert</b>	8,0
◆ <b>Regelung des pH-Wertes</b>	4 % HCl und 10 % NaOH
◆ <b>Begasung</b>	Keine Begasung
◆ <b>Atmosphäre im Fermenter</b>	Stickstoff
◆ <b>Rührerdrehzahl</b>	50 Upm

### 7.3.2 Kultivierungsverlauf auf einem Fructose-Medium

Durch Zugabe von Resazurin zu dem Medium sollte eine Online-Detektion der Sauerstoffkonzentration in dem Medium ermöglicht werden. Ziel des Versuches war es herauszufinden, ob über die Sauerstoffkonzentration Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen möglich sind.

Dem Kulturmedium wurden keine Reduktionsmittel zugesetzt. Die verwendete Menge an Hefeextrakt von 10 g/L wirkt in der eingesetzten Konzentration bereits reduzierend [78] und verursacht somit beim Autoklavieren des Mediums bereits eine Reduktion des Resazurins zum Resorufin. Eine weitere Reduktion zum Dihydroresorufin findet nicht statt, da für den zweiten Reduktionsschritt ein Sterilisieren unter Schutzgas notwendig wäre. Die Stickstoffatmosphäre

im Bioreaktor wurde nach dem Autoklavieren durch Einleiten von sterilem Stickstoff in den Reaktor erzeugt.

Der Verlauf der Fluoreszenz von Resorufin (Ex550/Em590 nm) sowie die optische Dichte während der ersten 10 Stunden der Kultivierung sind in Abbildung 7.8 dargestellt. Zu Beginn der Kultivierung ist eine hohe Fluoreszenz von Resorufin zu erkennen. Da an dem Metall des Bioreaktors auch nach dem Autoklavieren noch Sauerstoff anhaftet [78], liegt auf Grund des verbliebenen Sauerstoffs das gesamte Resazurin als Resorufin in dem Kulturmedium vor. Deshalb wird vor dem Animpfen des Bioreaktors eine starke Fluoreszenz von Resorufin detektiert.

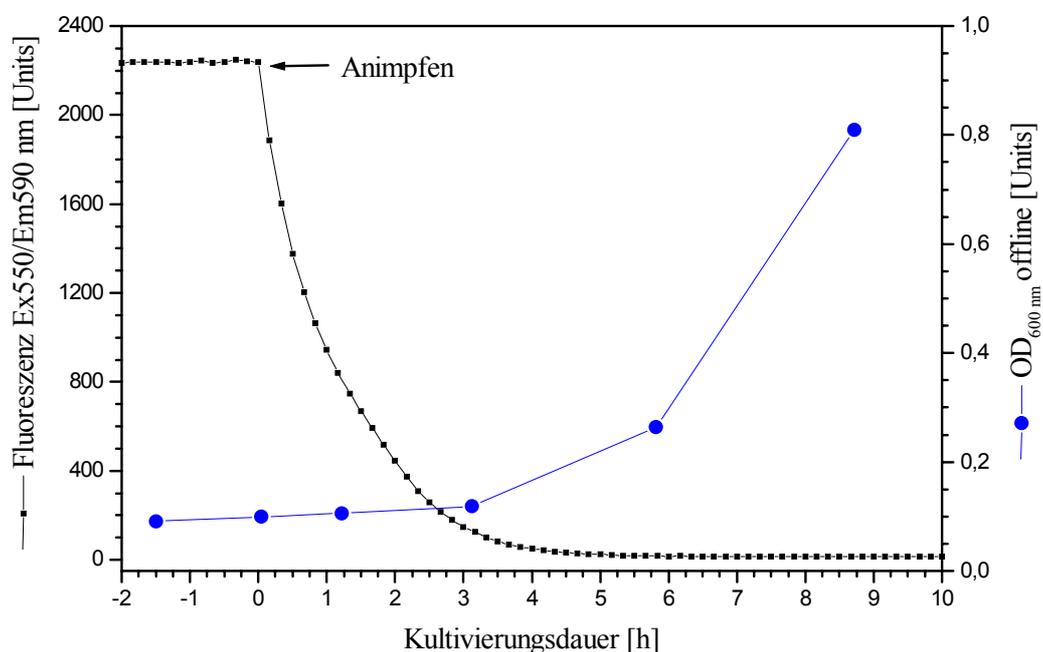


Abbildung 7.7: Verlauf von Fluoreszenz und optischer Dichte bei 600 nm während der ersten 10 Stunden einer Kultivierung von *Clostridium formicoaceticum*

Unmittelbar nach Animpfen des Bioreaktors ist eine schnelle Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen. Einige Anaerobier wie Clostridien sind bei Verwendung eines großen Inokulums in der Lage, selber geringe Sauerstoffreste im Medium zu reduzieren und sich damit das zum Stoffwechsel notwendige, niedrige Redoxpotential zu erzeugen [21]. Dieses kann mit der Abnahme der Fluoreszenz und damit der Sauerstoffkonzentration belegt werden.

Vor Zugabe des Inokulums ist durch den verbliebenen Sauerstoff das Redoxpotential in dem Medium zu hoch, um eine Reduktion von Resorufin zu erreichen. Für ein Anwachsen der Clostridien ist jedoch bereits ausreichend Sauerstoff aus dem Medium entfernt worden. Nach

Zugabe des Inokulums reduzieren die Zellen selber den verbliebenen Sauerstoff, was durch die Abnahme der Fluoreszenz detektierbar ist. Ein signifikanter Anstieg der optischen Dichte ist erst ca. 4-5 Stunden nach Anwachsen der Kultur im Bioreaktor zu erkennen. Damit ist die Fluoreszenz nicht nur sehr gut zur Abschätzung der Zellvitalität zu Kultivierungsbeginn geeignet, sie ist sogar der Methode der Bestimmung der optischen Dichte zu Beginn der Kultivierung weit überlegen. Eine Bestimmung der Vitalität unter dem Mikroskop ist nicht möglich, da die Zellen bei der Probenahme durch Luftsauerstoff absterben. Somit ist die Fluoreszenz als einzige Methode in der Lage, bereits innerhalb der ersten zehn Minuten eine schnelle Abschätzung der Zellvitalität liefern zu können.

Nachdem der Fluoreszenzverlauf während der ersten 10 Stunden der Kultivierung diskutiert wurde, wird in Abbildung 7.8 der vollständige Verlauf der Kultivierung gezeigt. Das exponentielle Wachstum während der Kultivierung dauert etwa von Stunde 10 bis Stunde 19. Nachdem das Substrat Fructose verbraucht ist, gehen die Bakterien sehr schnell in die stationäre Phase über. In dieser Zeit tritt die Sporenbildung ein, die durch einen Mangel an Nährstoffen ausgelöst wird [60]. Die Zeitspanne von der Induktion bis zum Auftreten der freien Sporen kann zwischen 6 und 24 Stunden betragen. Ab Stunde 22 beginnt die optische Dichte wieder abzunehmen, was durch Autolyse der Zellen verursacht werden könnte.

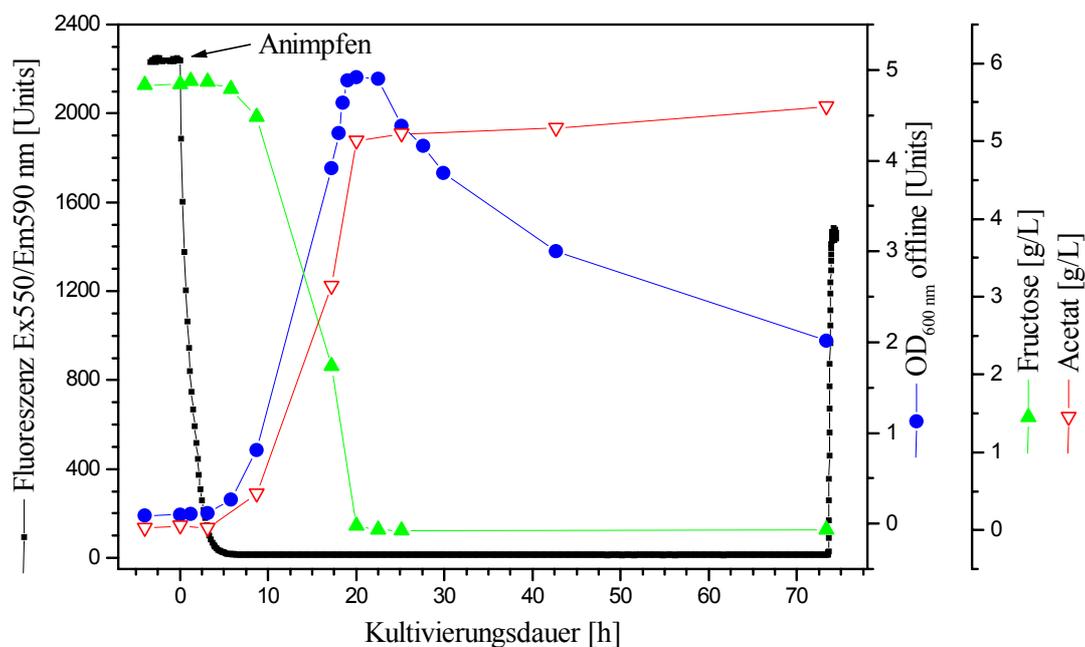


Abbildung 7.8: Verlauf einer Kultivierung von *Clostridium formicoaceticum* auf einem Fructose Medium

Die Ausbeute für die Umsetzung von Fructose zu Acetat je Formelumsatz beträgt 94 %. Dieses stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten überein, bei denen eine fast quantitative Ausbeute für die Umsetzung erreicht wird [79].

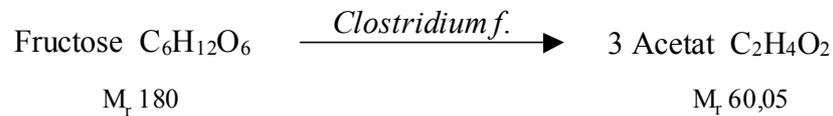


Abbildung 7.9: Umsetzung von Fructose zu Acetat

Um die Reversibilität der Umwandlung zwischen Resorufin und Dihydroresorufin auch in Bakterienkultivierungen belegen zu können, wurde der Bioreaktor ab Stunde 73 mit Luft begast und gerührt. Danach ist ein schneller Anstieg der Fluoreszenz bei Ex550/Em590 nm zu erkennen. Der ursprüngliche Fluoreszenzwert vor Animpfen des Fermenters wird jedoch nicht mehr erreicht. Da die Zellen zu einer starken Abnahme der optischen Durchlässigkeit geführt haben – wie an Hand der  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  ersichtlich ist – wird ein Teil des eingestrahnten Lichtes reflektiert und absorbiert. Deshalb fällt die gemessene Fluoreszenz mit Zellen geringer als vor Beginn der Kultivierung.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß die Fluoreszenz von Resazurin gut zur Abschätzung der Zellvitalität bei Kultivierungsbeginn von anaeroben Bakterien genutzt werden kann. Während mit Hilfe der ersten Abbildung die Vorteile der Fluoreszenz gegenüber der Messung der optischen Dichte vorgestellt werden konnten, wurde im zweiten Teil die Reversibilität der Umwandlung zwischen Resorufin und Dihydroresorufin in Bakterienkultivierungen nachgewiesen.

### 7.3.3 Einfluß der Toxizität von Sauerstoff auf anaerobe Kultivierungen

Im nächsten Versuchsteil soll überprüft werden, welchen Einfluß hohe Konzentrationen an Sauerstoff auf das Anwachsen strikt anaerober Bakterien haben und ob eine Überwachung mittels Fluoreszenz möglich ist.

Zu Beginn dieser Kultivierung wurde im Gegensatz zu der vorherigen Versuchsdurchführung der Sauerstoff nicht durch Begasen mit  $\text{N}_2$  aus dem Medium entfernt. Somit blieb bei diesem Versuch der gelöste Sauerstoff in dem Medium. Durch den normalen Sauerstoffpartialdruck in der Atmosphäre wird ein Redoxpotential von etwa +400 mV in dem Medium eingestellt, was

auf strikte Anaerobier toxisch wirkt [21]. Die weitere Durchführung der Kultivierung erfolgte wie bei dem vorherigen Versuch in Kapitel 7.3.2.

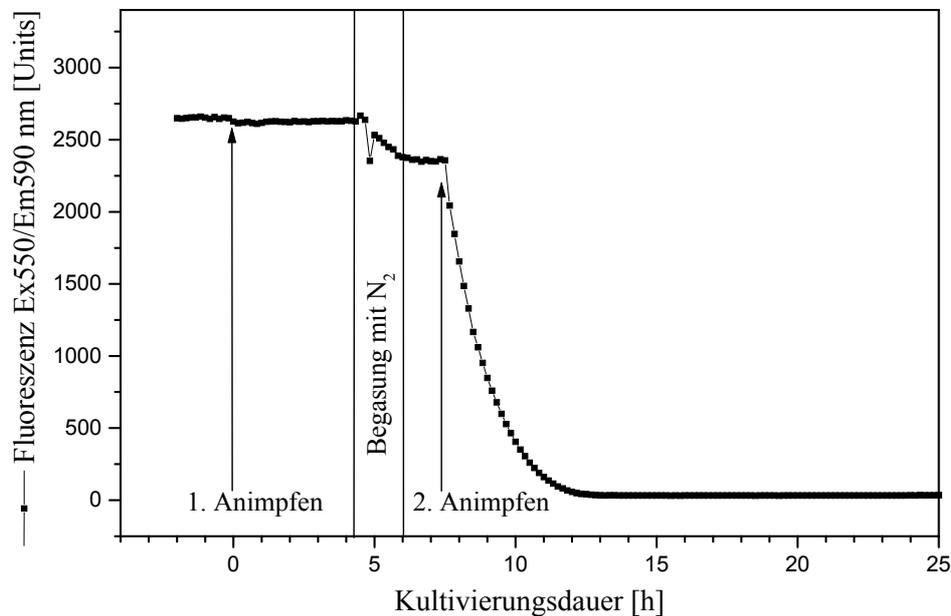


Abbildung 7.10: Einfluß toxischer Konzentration von O<sub>2</sub> auf das Anwachsen von *Clostridium formicoaceticum*

Vor Beginn der Kultivierung ist eine hohe Fluoreszenz von Resorufin bei Ex550/Em590 nm zu erkennen. Das Zufügen des Inokulums in den Bioreaktor hat nur eine sehr geringe Abnahme der Fluoreszenz zur Folge. Während der folgenden vier Stunden ist keine weitere Veränderung in der Fluoreszenz erkennbar. Wie in der vorangegangenen Kultivierung gezeigt werden konnte, hätte ein Anwachsen der Bakterien eine Abnahme des Redoxpotentials und damit eine Reduktion von Resorufin zur Folge. Da dieses nicht geschehen ist, kann daraus geschlossen werden, daß die Zellen nicht anwachsen und wahrscheinlich auf Grund der zu hohen Sauerstoffkonzentrationen abgestorben sind.

Um den Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen, wurde anschließend der Bioreaktor für 90 Minuten mit N<sub>2</sub> begast. Dann wurde die Begasung abgeschaltet und weitere 90 Minuten gewartet. Die Begasung mit Stickstoff führt zu einer Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium und damit zu einer Verringerung des Redoxpotentials im Medium. Dieses ist an der Abnahme der Fluoreszenz von Resorufin zu erkennen. Eine vollständige Reduktion zum Dihydroresorufin findet nicht statt. Daraus kann gefolgert werden, daß die bereits angeimpften Zellen keine Stoffwechselaktivität mehr aufweisen und abgestorben sind.

Nach der Zugabe eines zweiten Inokulums ist nun eine deutliche Reduktion des Resorufins festzustellen. Die neuen Bakterien sind in der Lage, durch ihre Stoffwechselaktivität die in dem Medium verbliebenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen zu reduzieren. Das Absinken des Redoxpotentials führt zur Bildung von Dihydroresorufin und deshalb zu einer Abnahme der Fluoreszenz.

Mit den Ergebnissen konnte eindeutig gezeigt werden, daß hohe Sauerstoffkonzentrationen toxisch auf den Bakterienstamm *Clostridium formicoaceticum* wirken. Durch Messungen der Fluoreszenz konnte dies online beobachtet werden, da die Stoffwechselaktivität vitaler Zellen zu einer Veränderung des Redoxpotentials führen würde. Dies wäre durch eine Abnahme der Fluoreszenz von Resorufin detektiert worden. Eine Abschätzung der Vitalität anaerober Bakterien wie *Clostridium formicoaceticum* ist somit online im Fermentationsprozeß möglich.

#### 7.4 Überprüfung der Ergebnisse bei Verwendung eines Industriemediums

Nachdem die Messungen der Fluoreszenz bei Kultivierungen mit Standardmedien gute Ergebnisse geliefert haben, soll die Praxistauglichkeit der entwickelten Methode bei Verwendung eines Industriemediums unter Beweis gestellt werden.

In einer Arbeit von Yang et al. wird die fermentative Herstellung von Calcium-Magnesium-Acetat (CMA) aus Molke beschrieben [80]. CMA wird in den USA als alternatives Streumittel für Straßen eingesetzt, da es im Gegensatz zu Natriumchlorid keine korrosiven Eigenschaften besitzt. Für die Herstellung wurde eine Cokultur von *Streptococcus Lactis* und *Clostridium formicoaceticum* eingesetzt.



Abbildung 7.11: Fermentative Herstellung von Acetat aus Lactose

Der erste fermentative Schritt, die Herstellung von Lactat aus Lactose, wird in der Molkeindustrie bereits von der BioLac GmbH durchgeführt. Das Bakterium *Clostridium formicoaceticum* ist in der Lage, dieses Lactat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Deshalb sollte als weiterer Praxistest der bisher erhaltenen Ergebnisse eine Kultivierung auf diesem Industriemedium erfolgen. Das von der BioLac gelieferte Kulturenpermeat hat eine Lactatkonzentration von 200 g/L. Die Kultivierungsbedingungen wurden aus Kapitel 7.3.1 übernommen und dem Medium wurde statt der Fructose Lactat aus dem Kulturenpermeat so zugesetzt, daß sich eine Endkonzentration von 10 g/L Lactat ergab. Die Ergebnisse der Fermentation sind in Abbildung 7.12 dargestellt.

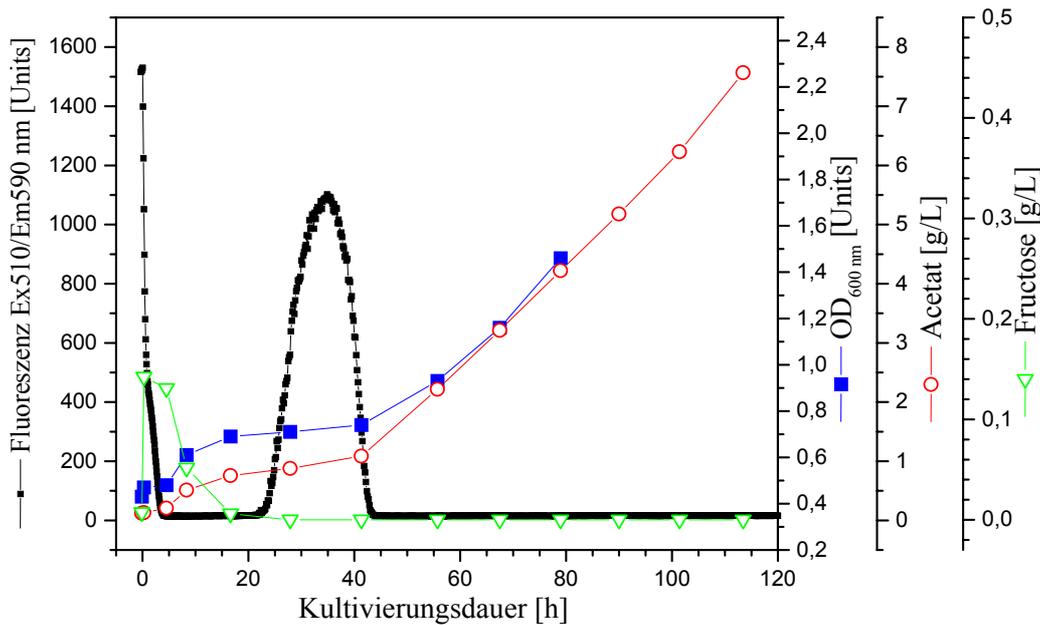


Abbildung 7.12: Verlauf einer Kultivierung von *Clostridium formicoaceticum* mit einem Industriemedium auf Lactatbasis

Wie bei den vorangegangenen Kultivierungen mit einem Medium auf Fructosebasis festgestellt werden konnte, ist auch im Fall der Verwendung eines Industriemediums ein Anwachsen der Bakterien mit einer Verringerung der Fluoreszenz bei Ex550/Em590 nm verbunden. Somit läßt sich auch in diesem Fall die Zellaktivität mit der Fluoreszenz bestimmen.

Im weiteren Kultivierungsverlauf zwischen Stunde 20 und Stunde 40 der Kultivierung ist eine deutliche Stagnation der OD<sub>600 nm</sub> zu verzeichnen und erst danach ist eine erneute Zunahme der optischen Dichte zu erkennen. Dieses deutet auf eine Diauxie hin, also eine Umstellung des Stoffwechsels auf ein neues Substrat. Folglich muß mehr als ein Substrat zu Beginn der Fermentation vorgelegen haben. Dieses kann zum einen Fructose aus der Vorkultur als auch zum anderen ein weiteres Substrat aus dem im Medium vorhandenen Hefeextrakt sein. Das Auftreten der Diauxie erfolgt zeitgleich mit der Verstoffwechslung der letzten Reste Fructose, wie der Abbildung 7.12 zu entnehmen ist.

Ein erneutes Ansteigen der OD<sub>600 nm</sub> ist erst nach etwa 25 Stunden zu erkennen, eine normale Diauxie hingegen dauert nur bis zu 60 Minuten. Dieser lange Zeitraum kann durch eine Versporung der Zellen erklärt werden. Durch die Katabolit-Repression sind die Zellen nicht in der Lage, Enzyme zum Abbau von Lactat zu bilden, solange ein anderes Substrat als Nährstoffquelle verwendet wird. Ist dieses Substrat verbraucht, beginnen die Bakterien auf Grund der fehlenden Möglichkeit zum Abbau anderer Substrate die Bildung von Sporen. Erst

nach dem Freisetzen der Sporen und dem anschließenden Keimen kann das Substrat Lactat abgebaut werden. Dieses konnte durch Mikroskopie von Proben aus dem Fermentationsprozeß bestätigt werden, wobei in dem beobachteten Zeitraum zuerst eine Bildung der Sporen in den Bakterien sichtbar war, die danach aus der Zelle freigesetzt wurden. Erst kurz vor dem Ansteigen der  $OD_{600\text{ nm}}$  war ein Keimen der Sporen zu beobachten.

Der Vorgang der Versporung wurde mit der Fluoreszenzspektroskopie erfaßt. Durch die Bildung der Sporen wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen stark verringert. Deshalb konnten Reste von Sauerstoff im Gasraum des Bioreaktors, die während der gesamten Kultivierung in das Medium diffundieren, nicht mehr durch die Zellen reduziert werden. Die verringerte Stoffwechselaktivität der Zellen wird deswegen durch einen geringen Anstieg der Sauerstoffkonzentration und damit der Resorufin-Fluoreszenz detektiert. Die in das Medium eingetragene Sauerstoffmenge ist jedoch zu gering, um eine toxische Konzentration an Sauerstoffprodukten bilden zu können.

Somit konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Stoffwechselaktivität der Bakterien beim Anwachsen mit der Fluoreszenz meßbar ist, es konnte weiterhin sogar eine Änderung der Aktivität während der Fermentation beobachtet werden. Im beobachteten Fall konnte der Zeitraum der Sporenbildung bis zur Keimung der Sporen genau verfolgt werden.

## 7.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Möglichkeiten zur Überwachung anaerober Prozesse mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden.

Dazu wurden zunächst die 2D-Fluoreszenzspektren von Resazurin und der reduzierten Derivate vorgestellt und interpretiert. Durch Vergleich der Spektren mit der Fluoreszenz eines Komplexmediums konnte nachgewiesen werden, daß keine Überlagerungen der Fluoreszenzen des Mediums und des gewählten Sauerstoffindikators auftreten.

Für die Fluoreszenz von Resazurin wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, aus der eine geeignete Resazurinkonzentration für spätere Fermentationsprozesse ermittelt werden konnte.

In einem Modellversuch konnte sowohl die irreversible Reduktion von Resazurin zu Resorufin, als auch die anschließende Reduktion von Resorufin zu Dihydroresorufin online verfolgt werden. Die Reversibilität der zweiten Reaktion wurde durch wiederholtes Reduzieren und Oxidieren demonstriert, wobei nach 20 Reduktions- und Oxidationsschritten kein Ausbleichen der Fluoreszenz von Resorufin festzustellen war.

Der Nutzen der entwickelten Methode in der Praxis konnte anhand von Kultivierungen des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* gezeigt werden. Mittels der Fluoreszenzspektroskopie war es möglich, die Sauerstoffkonzentration im Bioreaktor qualitativ zu erfassen und ein Anwachsen der strikt anaeroben Bakterien schnell zu erkennen. Bei Verwendung eines Industriemediums konnte sogar eine Umstellung im Stoffwechsel der Zellen – eine Diauxie mit anschließender Versporung – online mit Hilfe der Fluoreszenz beobachtet werden.

## 8 Schlußbetrachtungen

Eine Schwierigkeit bei der effizienten Automatisierung industrieller Produktions- und Aufarbeitungsprozesse ist häufig das Fehlen einer schnellen Online-Analytik. Oft erfordern die angewandten Methoden eine Entnahme von Proben oder liefern die Ergebnisse erst mit einer erheblichen Zeitverzögerung, wodurch eine schnelle Prozeßkontrolle nicht möglichst ist.

Deshalb wurden in dieser Arbeit unterschiedliche spektroskopische Methoden auf ihre Anwendbarkeit zur Prozeßbeobachtung untersucht. Diese optischen Messungen bieten den Vorteil, daß keine Eingriffe in den Prozeß notwendig sind und die Analysenergebnisse in-time innerhalb kurzer Zeit zur Verfügung stehen. Die Einsatzmöglichkeiten von Fluoreszenz- und naher Infrarot-Spektroskopie wurden an den Beispielen der chromatographischen Melasseentzuckerung sowie der Überwachung anaerober Prozesse aufgezeigt.

Für den Prozeß der chromatographischen Melasseentzuckerung wurde auf Basis der Fluoreszenzspektroskopie eine Methode zur Prozeßbeobachtung entwickelt. Mit dem vorgestellten Meßsystem können die Elutionsprofile der Melasseinhaltsstoffe Tyrosin, Serin, Threonin und Asparagin beobachtet werden. Neben der qualitativen Bestimmung der Elution können auch quantitative Aussagen über die Inhaltsstoffe gemacht werden.

Für die aus wirtschaftlicher Sicht interessante Aminosäure Serin wurde das Meßsystem für Online-Messungen am Industrieprozess angepaßt und optimiert. Durch die Verwendung chemometrischer Modelle konnte der Fehler der Vorhersagen für Serin auf 5,8 % gesenkt werden. Das entwickelte System wurde über einen Zeitraum von 18 Monaten für verschieden Melassechargen und für Chromatographiezyklen mit außergewöhnlichen hohen Serinkonzentrationen validiert. In einem abschließenden Vergleich wurde die momentan bei der AMINO GmbH verwendete Prozeßführung und die mögliche, optimierte Prozeßführung durch Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie gegenübergestellt.

Bei den beobachteten Chromatographiezyklen wurden von der bisherigen Prozeßführung nur durchschnittlich 72,2 % der maximal möglichen Serinausbeute erzielt. Durch Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie wäre im selben Zeitraum eine Ausbeute von 99,2 % erreicht worden. Damit konnte gezeigt werden, daß durch den Einsatz der fluoreszenzspektroskopischen Prozeßkontrolle eine wesentlich höhere Produktkonzentration realisiert werden kann. Das in dieser Arbeit entwickelte Meßsystem wurde nach der Validierung dauerhaft am Industrieprozess installiert und wird bei der Prozeßführung zur Bestimmung der Serinkonzentration genutzt.

Als weitere Methode zur Prozeßbeobachtung der chromatographischen Melasseenzuckerung wurde die NIR-Spektroskopie getestet. Damit sollte die Möglichkeiten zur Detektion weiterer für den Prozeß wichtiger Substanzen geprüft werden.

Bei der Untersuchung verschiedener Melasseinhaltsstoffe konnte lediglich für Betain eine charakteristische Bande im NIR-Spektrum gefunden werden. Anhand dieser Bande war eine Kalibration für Betainstandards möglich. Die Überprüfung der erstellten Kalibration erfolgte nach dem Standardzusatzverfahren an zwei Proben aus der Betainfraktion und der Restfraktion, wobei nur geringe Abweichungen in der Bestimmung von Betain trotz der starken Matrixeinflüsse der Eluatproben auftraten.

Die Anwendbarkeit der Methode für die Industrie konnte für einen kompletten Chromatographiezyklus der Melasseaufarbeitung bestätigt werden. Bei einer Klassifikation der Eluatproben mit Betainkonzentrationen über 20 g/L wurde lediglich eine Probe falsch bestimmt. Dies stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber der derzeit angewandten Prozeßführung dar. Damit konnte die Anwendbarkeit der an Standards entwickelten Methode zur Bestimmung von Betain für die industrielle Melasseauftrennung unter Beweis gestellt werden. Durch die Spezifität der NIR-Spektroskopie bei der Detektion von Betain ist das Verfahren nicht nur auf den Prozeß der chromatographischen Melasseenzuckerung beschränkt, sondern wahrscheinlich auch auf andere Prozesse in der Zuckerindustrie übertragbar.

Ziel der Untersuchungen anaerober Prozesse war es, eine Methode zum Nachweis von Sauerstoff in Spurenkonzentrationen auf Basis von Fluoreszenzmessungen zu etablieren.

Zunächst wurden die 2D-Fluoreszenzspektren von Resazurin und der beiden reduzierten Folgeprodukte Resorufin und Dihydroresorufin vorgestellt. Anhand der Fluoreszenzspektren ist eine eindeutige Unterscheidung aller drei Substanzen möglich, was in einem Modellversuch zur Detektion der einzelnen Reduktionsschritte genutzt werden konnte.

Der praktische Nutzen des Sauerstoffnachweises sollte durch Fermentationen des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* belegt werden. Durch Messungen der Fluoreszenz war es möglich, in einem Bioreaktor die Sauerstoffkonzentration online zu bestimmen und damit ein Anwachsen der strikt anaeroben Bakterien innerhalb der ersten zehn Minuten nach dem Animpfen zu erkennen. Bei Verwendung eines Industriemediums als Kohlenstoffquelle konnte sogar eine Umstellung im Stoffwechsel der Zellen – eine Diauxie mit anschließender Versporung – online mit Hilfe der Fluoreszenz erkannt werden.

## 9 Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine Methode zur Online-Detektion von Serin am Prozeß der industriellen Melasseentzuckerung vorgestellt werden.

Da mittels Fluoreszenz neben der Bestimmung von Serin noch einige weitere Aminosäuren detektiert werden können, wäre ein Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie auch zu einem späteren Zeitpunkt der Aufreinigung denkbar, z. B. bei der Abtrennung von Tryptophan oder Tyrosin. Eine Überlagerung der Fluoreszenz dieser beiden Melasseinhaltsstoffe durch andere Fluorophore müßte für den jeweiligen Schritt der Aufreinigung noch untersucht werden.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Serinbestimmung besteht in der regelmäßigen Überarbeitung des verwendeten PLS-Modells. Durch die Erweiterung des Kalibrationsdatensatzes mit jährlich neu analysierten Chromatographiezyklen ließe sich eine stetige Verbesserung der Serinbestimmung verwirklichen. Zusätzlich würden auf diese Weise mögliche essentielle Veränderungen in der Zusammensetzung der Melasse oder der Zuckerrüben berücksichtigt, die im Verlaufe mehrerer Jahre auftreten können [26].

Durch die Verwendung der 2D-Fluoreszenz zur Serinbestimmung kann eine erheblich bessere Festlegung der Serinfraktion und damit Steigerung der Effizienz des Trennprozesses erreicht werden, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Durch Vermeidung von Fraktionierungsfehlern kommt es damit nicht nur zu einem geringeren Energieaufwand, sondern auch zu einer Verminderung des Abwasservolumens und der Salzfracht, da erneute aufwendige Chromatographierungsschritte entfallen. So kann der Einsatz der entwickelten Fluoreszenz-Analytik zur Senkung der Betriebskosten, einer höherer Wertschöpfung und einer besseren Umweltverträglichkeit des Produktionsprozesses genutzt werden.

Für einen Einsatz der NIR-Spektroskopie zur Betainbestimmung wäre eine Validierung der entwickelten Methode wünschenswert. Um die Genauigkeit der Analytik besser nachweisen zu können, müßten die erhaltenen Ergebnisse durch Untersuchungen an weiteren Trennzyklen unterstützt werden. Weiterhin steht ein Online-Einsatz der Methode noch aus, was gerade für eine Anwendung in der Industrie wichtig ist. Eine Überprüfung der Ergebnisse zur Bestimmung von Betain für andere Prozesse aus der Zuckeraufarbeitung wäre ebenfalls sinnvoll, um die Übertragbarkeit der Methode auf andere Prozesse zu belegen und neue Anwendungsgebiete zu eröffnen.

Denkbar wäre auch eine Methodenkopplung von Fluoreszenz und NIR-Spektroskopie, bei der sowohl Fluoreszenz- als auch NIR-Daten gleichzeitig in einem chemometrischen Modell erfaßt

und ausgewertet werden. Damit wären robustere PLS-Modelle möglich, die zu einer genaueren Bestimmung der Analytkonzentrationen führen würden.

Durch den Sauerstoffindikator Resazurin war ein auf Fluoreszenzmessungen basierender Nachweis von Sauerstoff in Spurenkonzentration möglich, der bei Kultivierungen des strikt anaeroben Bakterienstammes *Clostridium formicoaceticum* genutzt werden konnte.

In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, inwieweit die gefundenen Ergebnisse auch auf andere Bakterienstämme übertragbar sind. Hierbei kommen insbesondere andere strikt anaerobe Mikroorganismen in Betracht, deren für das Wachstum benötigtes Redoxpotential nahe am Umschlagpunkt des Indikators liegt. Zu dieser Gruppe gehören die meisten Clostridien.

Bei der Verwendung eines Industriemediums war auf Basis der Fluoreszenz eine Veränderung der Zellaktivität zu beobachten, während der die Bakterien anfangen Sporen zu bilden. Hier wäre es sinnvoll eingehender zu untersuchen, welche weiteren Veränderungen im Zellmetabolismus von *Clostridium formicoaceticum* detektierbar sind. Diese zusätzlichen Informationen würden zu einer besseren Prozeßbeobachtung und damit zu einem besseren Verständnis über den Kultivierungsverlauf anaerober Mikroorganismen führen.

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
Abs	Absorption
°C	°Celsius
CMA	Calcium-Magnesium Acetat
Em	Emission
Ex	Exzitation
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
h	Stunden
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
KPP	Kaliumphosphat
L	Liter
M	molar
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
M <sub>r</sub>	Molekülmasse
mV	Millivolt
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
ND	Neutraldichtefilter
NIR	nahes Infrarot
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PC(s)	Hauptkomponente(n) (principal components)
PCA	Hauptkomponentenanalyse
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoff Exponent)
PLS	Partial Least Squares Regression
rel.	relativ
RT	Raumtemperatur
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RMSEP	Root mean square error of prediction
R	Korrelationskoeffizient
s	Sekunden
s.	siehe
TCI	Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
TK	Trennkolonne
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche

### 10.2 Chemikalien

Betain	Fluka
Borsäure	Merck

Cobalt(II)chlorid	Merck
EDTA	Fluka
Eisen(II)sulfat	Merck
Fructose	Merck
Hefeextrakt	Difco
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kupfer(II)chlorid	Merck
Mangan(II)chlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriummolybdat	Merck
Natriumsulfid	Merck
Natriumthioglycolate	Merck
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Merck
Pyridoxin	Merck
Resazurin	Riedel de Haen
Saccharose	Fluka
Serin	Fluka
Zinksulfat	Merck

### 10.3 Geräte

Bioreaktor	Werkstatt TCI, Universität Hannover
Durchflußmeßzelle	Werkstatt TCI, Universität Hannover
Fluoreszenzsensoren	DELTA Light & Optics BioView sowie Hitachi F-4500
Lichtleiter	Lumatec Typ 300
Meßreaktor 10 mL	Werkstatt TCI, Universität Hannover
NIR-Spektrometer	X-Dap Diodenarray, IKS Optoelektronik Meßgeräte GmbH
pH-Meter	Mettler-Toledo
UV/Vis-Spektrometer	Varian Cary 50
Photometer	Kontron Instruments, Uvicon 922
Quarzglasküvette	Omnilab, QS Quarzglas Suprasil 2·10 mm
Steuereinheit für Bioreaktor	B. Braun Biostat Q
Temperaturfühler	B. Braun Pt-100

### 10.4 Referenzanalytik

Für die Referenzanalytik der Fluoreszenz- und NIR-Messungen wurden verschiedene HPLC-Methoden verwendet. Die Bestimmung von Fructose und Essigsäure der Kultivierungen wurde mit Enzymtestkits der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Im folgenden werden diese Methoden beschrieben.

### 10.4.1 Bestimmung von Aminosäuren in Eluatproben mit der HPLC

#### Lösungen

- Eluent A: 0,05 M Na-Acetat; 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0
- Eluent B: Methanol 54 % und H<sub>2</sub>O (bidest.) 46 %
- Regeneration: 270 mg OPA (Phtaldialdehyd) in 5 mL Ethanol auflösen  
200 µL Mercaptoethanol zufügen und mit 0,4 M Borat-Puffer  
pH 9,5 auf 50 mL auffüllen

#### HPLC-Apparatur und Parameter

- HPLC-Pumpe: ERC Irika 871
- Detektor: Fluoreszenz-Detektor Shimadzu R535
- Autosampler: Spark Promise II
- Degasser: ERC-3322
- Säulenthermostat: ERC-125
- Säulentemperatur: 30° C
- Auswerteinheit: HPLC-Manager-APEX
- Vorsäule: VYDAC 301 SC
- Trennsäule: Reversed phase Waters, resolve C 18,5 µm (3,9·150mm)
- Flow: 1,5 mL/min
- Detektion: Emission 420 nm
- Probenvolumen: 10 µL
- Probenkonzentration: ca. 0,3-1,0 mg/L

### 10.4.2 Bestimmung von Betain und Zuckern mit der HPLC

#### Lösungen

- Eluent: 0,016 M NaOH, membranfiltriert (0,2 µm)
- Regeneration: 0,3 M NaOH, membranfiltriert (0,2 µm)

#### HPLC-Apparatur und Parameter

- HPLC-Pumpe: Knauer HPLC Pumpe
- Detektor: RI Detector ERC-7510 von Erna Optical Works LTD
- Injektor: Knauer Injektions-Ventil Nr. V7213
- Säulenthermostat: Knauer modularer HPLC-Ofen
- Säulentemperatur: 30°C
- Integrator: Shimadzu C-R3A Chromatopac
- Vorsäule: Dionex CarboPac PA 1 Guard column

- Trennsäule: Dionex CarboPac PA 1 (4 \* 250 mm)
- Flow: 1,0 ml/min
- Probenvolumen: 20 µl, membranfiltriert (0,2 µm)
- Probenkonzentration: ca. 0,15 g/100 ml

### 10.4.3 D-Glucose- und D-Fructose-Testkit

Enzymatischer UV-Test von Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 139 106.

#### Prinzip:

D-Glucose und D-Fructose werden bei pH 7,6 durch das Enzym Hexokinase und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) und D-Fructose-6-phosphat unter Bildung von Adenosin-5'-diphosphat phosphoryliert. In Gegenwart einer Dehydrogenase wird G-6-P von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH). Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Glucose-Menge äquivalent. Das entstandene NADH wird auf Grund seines Absorptionsvermögens bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt. Nach Ablauf der Reaktion wird F-6-P durch Phosphoglucose-isomerase in G-6-P überführt. G-6-P reagiert wiederum mit NADP unter Bildung von D-Gluconat-6-phosphat und NADPH. Auch hier ist NADPH die Meßgröße. Die nun gebildete NADPH-Menge ist der Fuctose-Menge äquivalent.

#### Durchführung:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1; Inhalt: NADP <sup>+</sup> , ATP, Puffer pH 7,6	1,000 mL	1,000 mL
Probelösung	-	0,100 mL
Bidest. Wasser	2,000 mL	1,900 mL
Mischen und nach 3 Minuten Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>1</sub> ). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 2 (Dehydrogenase)	0,020 mL	0,020 mL
Mischen und 15 Minuten bis zum Stillstand der Reaktion abwarten. Extinktion der Lösung messen (E <sub>2</sub> ). Anschließend Zugabe von		
Suspension 3 (Isomerase)	0,020 mL	0,020 mL
Mischen und nach 15 Minuten Extinktion der Lösung messen (E <sub>3</sub> ).		

**Auswertung:**

Für Leerwert und Proben werden die Extinktionsdifferenz ( $E_3 - E_2$ ) berechnet. Die Extinktionsdifferenz des Leerwertes wird von der Extinktionsdifferenz der Probe subtrahiert.

Daraus erhält man  $\Delta E_{D\text{-Fructose}}$ .

$$\Delta E_{D\text{-Fructose}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \cdot MG \cdot \Delta E_{D\text{-Fructose}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \text{ [g/L]}$$

mit:

$c$  = Konzentration Fructose [g/L]

$V$  = 3,4 mL; Testvolumen

$v$  = 0,1 mL; Probevolumen

$MG$  = 180,16 g/mol; Molekulargewicht Fructose

$d$  = 1 cm; Schichtdicke der Küvette

$\varepsilon$  = 6,31 [L·mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>]; Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm

**10.4.4 Essigsäure-Testkit**

Enzymatischer UV-Test von Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 148 261.

**Prinzip:**

Essigsäure wird in Gegenwart des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase durch ATP und Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Das Acetyl-CoA reagiert mit Oxalacetat bei Anwesenheit von Citrat-Synthase zu Citrat. Das für die Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion aus L-Malat und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart einer L-Malat-Dehydrogenase gebildet. Dabei wird NAD zu NADH reduziert. Der Bestimmung liegt eine NADH-Bildung zugrunde, die durch Messung der Extinktion bei 340 nm gemessen werden kann. Da bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion ein Gleichgewicht vorliegt, ist die NADH-Menge der Essigsäure-Konzentration nicht direkt proportional.

**Durchführung:**

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1; Inhalt: L-Apfelsäure, Puffer pH 8,4	1,000 mL	1,000 mL
Lösung 2; Inhalt: ATP, CoA, NAD	0,200 mL	0,200 mL
Probelösung	-	0,100 mL
Bidest. Wasser	2,000 mL	1,900 mL
Mischen und nach 3 Minuten Extinktionen der Lösungen messen ( $E_0$ ). Anschließend Zugabe von		
Suspension 3 (Dehydrogenase)	0,010 mL	0,010 mL
Mischen und nach 3 Minuten Extinktion der Lösung messen ( $E_1$ ). Starten der Reaktion durch Zugabe von		
Lösung 4 (Synthetase)	0,020 mL	0,020 mL
Mischen und nach 15 Minuten Extinktion der Lösung messen ( $E_2$ ).		

**Auswertung:**

Zur Berechnung des  $\Delta E_{\text{Essigsäure}}$  dient folgende Formel:

$$\Delta E_{\text{Essigsäure}} = [(E_2 - E_0)_{\text{Probe}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Probe}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Probe}}}] - [(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Leerwert}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}}}]$$

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \cdot MG \cdot \Delta E_{\text{Essigsäure}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} [\text{g/L}]$$

mit:

$c$  = Konzentration Essigsäure [g/L]

$V$  = 3,4 mL; Testvolumen

$v$  = 0,1 mL; Probevolumen

$MG$  = 60,05 g/mol; Molekulargewicht Essigsäure

$d$  = 1 cm; Schichtdicke der Küvette

$\varepsilon$  = 6,31 [L·mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>]; Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm

## 10.5 Kulturmedium *Clostridium formicoaceticum*

Tabelle 10.1: *Clostridium formicoaceticum*-Medium [81]

	Substanz	Konzentration [g/L]
Medium	Fructose	5,0
	Hefeextrakt	5,0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0
	NaHCO <sub>3</sub>	10,0
	Natriumthioglycolate	0,75
	Pyridoxin-HC	1·10 <sup>-3</sup>
	Resazurin	1·10 <sup>-3</sup>
	Mineralsalzlösung SL-4	EDTA
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		2·10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		1·10 <sup>-4</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O		3·10 <sup>-5</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		3·10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O		2·10 <sup>-4</sup>
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O		1·10 <sup>-5</sup>
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O		2·10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O		3·10 <sup>-5</sup>

Die Mineralsalzlösung wurde mit der 1000-fachen Konzentration in destilliertem Wasser angesetzt und bei 4°C gelagert. Zur Herstellung des *C. formicoaceticum* Mediums wurden alle Zusatzstoffe in destilliertem Wasser gelöst und danach mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert.

Die Vorkulturen der Bakterien wurden in 500 mL Flaschen mit Schraubverschluß (Schott, Mainz) kultiviert. Die Flaschen wurden mit Sporen beimpft bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Nach ca. 2 Tagen waren die Sporen in der Vorkultur angewachsen. Danach wurde aus der ersten Vorkultur eine zweite Vorkultur mit den lebenden Bakterien beimpft. Diese Kultur konnte nun nach dem Anwachsen als Inokulum für den Bioreaktor genutzt werden.

Bei der Kultivierung im Bioreaktor auf Lactatbasis wurde die Fructose im *C. formicoaceticum* Medium durch Lactat ersetzt. Bei der Firma Biolac wird durch Fermentation ein Kulturenpermeat hergestellt, das eine Lactatkonzentration von 200 g/L aufweist. Dieses von der Firma Biolac hergestellte Permeat wurde als Ersatz für Fructose als Kohlenstoffquelle dem Kulturmedium zugesetzt.





## 11 Literaturverzeichnis

- [1] Perkampus, H.-H.  
Encyclopaedia of Spectroscopy  
VCH-Verlag 1995
- [2] Osborne B.G.; Fearn, T.; Hindle, P.H.  
Practical NIR Spectroscopy with application in the food and beverage analysis  
Longman Scientific & Technical, 1993
- [3] Paananen, H.A.  
Trends in chromatographic separation of molasses  
*Zuckerindustrie* **122** (1997), 28-33
- [4] Gough, S.; McHale A.P.  
Continuous Ethanol Production from Molasses at 45°C Using Alginate-immobilized  
*Kluyveromyces marxianus* IMB3 in a Continuous-Flow Bioreactor  
*Bioprocess Engineering* **19** (1998), 33-36
- [5] Heikkilä, H.  
Separating sugars and amino acids with chromatography  
*Chemical Engineering*, Vol. **90** (1983) January 24, 50-52
- [6] Hongisto, H.; Loisa, M.  
Finnsugar-Trennverfahren zur Melasseentzuckerung  
*Z. Zuckerindustrie* **27** (1977) Nr. 5, 279-283
- [7] Hongisto, H.  
Chromatographic separation of sugar solutions - the Finnsugar molasses desugarization  
process part I;  
*International Sugar Journal* **79** (1977), 100-104
- [8] Angaben AMINO, 1995
- [9] Wedler, G.  
Lehrbuch der Physikalischen Chemie  
VCH-Verlag, 3. Auflage 1987
- [10] Zander, M.  
Fluorimetrie  
Springerverlag, Heidelberg 1981

- 
- [11] Schwedt, G.  
Fluorometrische Analyse  
Verlag Chemie, Weinheim 1981
- [12] Rendell, D.  
Fluorescence and Phosphorescence  
Thames Polytechnic, ACOL, London 1987
- [13] Guilbault, G.  
Practical Fluorescence  
MarcelDekker Inc., New York, Basel, Hong Kong 1990
- [14] Perkampus  
Lexikon Spektroskopie  
VCH-Verlag, Weinheim 1993
- [15] Volkmann, H.  
Handbuch der Infrarot-Spektroskopie  
VCH-Verlag, Weinheim 1972
- [16] Günzler, H.; Böck, H.  
IR-Spektroskopie – Eine Einführung  
VCH-Verlag, 2. Auflage, Weinheim 1990
- [17] Schmidt, W.  
Optische Spektroskopie – Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker  
VCH-Verlag, Weinheim 1994
- [18] Osborne, G.G.; Fearn, T.  
Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis  
Longman Scientific & Technical, 1986
- [19] Danzer, K.; Hobert, H.; Fischbacher, C.; Jagemann, K.-U.  
Chemometrik – Grundlagen und Anwendungen  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001
- [20] Levett, P.N.  
Anaerobic bacteria – a functional biology  
Open University Press 1990
- [21] Bast, E.  
Mikrobiologische Methoden : eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken  
Spektrum Akademischer Verlag 2001

- [22] Marose, S.  
Untersuchungen zur Anwendung eines Prozessspektralfluorometers für die On-line-Bioprozessbeobachtung, Diplomarbeit, Universität Hannover 1995
- [23] HILMER, J.-M.  
In-situ-Bioprozesskontrolle am Beispiel der In-vivo-Biolumineszenz und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 150
- [24] Chen, R.F; Vurek, G.G.; Alexander, N.  
Fluorescence decay times – proteins, coenzymes and other compounds in water  
*Science* **156** 1967, 949-972
- [25] F. Lottspeich, H. Zorbas  
Bioanalytik  
Spektrum Akademischer Verlag, Berlin 1998
- [26] Sommerfeld, H.  
Modellreaktionen zur Technologie nachwachsender Rohstoffe  
Verlag Shaker 1993
- [27] Sosnitza, P.  
Amperometrische und potentiometrische Biosensoren  
Diplomarbeit, Universität Hannover 1996
- [28] Irtel, F.  
Aufbau und Test von Analysensystemen zur Detektion von Minor Components in Melasse; Diplomarbeit, Universität Hannover 1997
- [29] Koop, T.  
Entwicklung von Analysensystemen für Downstream-Prozesse am Beispiel der Zuckerrübenmelasseentzuckerung; Diplomarbeit, Universität Hannover 1998
- [30] Sosnitza, P.  
Biosensoren für die Aufarbeitung in der Biotechnologie  
Dissertation, Universität Hannover 1999
- [31] Sosnitza, P.; Farooqui, M.; Saleemuddin, M.; Ulber, R.; Scheper T.  
Application of reversible immobilization techniques for biosensors  
*Analytica Chimica Acta* **368** 1998, 197-203
- [32] Irtel, F.  
Neue Analytik für industrielle Aufarbeitungsprozesse  
Dissertation, Universität Hannover 2001

- [33] Norgaard, L.  
Classification and prediction of quality and process parameters of thick juice and beet sugar by fluorescence spectroscopy and chemometrics  
*Zuckerindustrie* **120** 1995, 970-981
- [34] Wolfbeis, O.S.  
The fluorescence of organic natural products; In: S.G. Schulmann, Molecular luminescence spectroscopy – Methods and application, part I  
John Wiley and Sons 1985, 167-370
- [35] Schiweck, H.  
Zusammensetzung von Zuckerrübenmelasse  
*Zuckerindustrie* **119** 1994, 272-284
- [36] Godshall, M.A.; Baunsgaard, D.  
The nature of colorant  
Proceedings of the Sugar Processing Research Conference 2000, 122-137
- [37] Baunsgaard, D.; Munck, L.; Norgaard L.  
Analysis of the effect of crystal size and color distribution on fluorescence measurements of solid sugar using chemometrics  
*Applied Spectroscopy* **54** 2000, 1684-1689
- [38] Baunsgaard, D.; Norgaard, L.; Godshall, M.A.  
Fluorescence of raw cane sugars evaluated by chemometrics  
*Journal of Agricultural Food Chemistry* **48** 2000, 4955-4962
- [39] Baunsgaard, D.; Munck, L.; Norgaard, L.  
Evaluation of the quality of solid sugar samples by fluorescence spectroscopy and chemometrics  
*Applied Spectroscopy* **54** 2000, 438-444
- [40] Harbeck, C.  
Grundlegende spektroskopische Methoden bei industriellen Downstream-Prozessen am Beispiel der Melasseaufarbeitung; Diplomarbeit, Universität Hannover 1999
- [41] Harbeck, C.; Hitzmann, B.; Lindemann, C.; Sosnitza, P.; Faurie, R.; Scheper, T.  
Verwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur online Überwachung der chromatographischen Melasseentzuckerung  
*Chemie Ingenieur Technik* **73** 2001, 861-864

- [42] Solle, D.  
Simulation und online-Messung der industriellen Biotransformation zur Herstellung von Tryptophan; Laufende Dissertation Universität Hannover
- [43] Baunsgaard, D.; Andersson, C.A.; Arndal, A.  
Multi-way chemometrics for mathematical separation of fluorescent colorants and colour precursors from spectrofluorimetry of beet sugar and beet sugar thick juice as validated by HPLC analysis  
*Food Chemistry* **70** 2000, 113-121
- [44] Baunsgaard, D.; Norgaard, L.; Godshall, M.A.  
Analysis of fluorescent colorants and color precursors in cane sugar manufacture using spectrofluorometry and multivariate data analysis  
Proceedings of the Sugar Processing Research Conference 2000, 138-147
- [45] Hartung, J.  
Multivariate Statistik. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik.  
Oldenburg-Verlag 1995
- [46] Meyer, J.H.; Rutherford, S.; Schaffler, K.J.  
The use and potential of near infrared reflectance in the South African sugar industry, Proceeding Int. Conference of Near Infrared Spectroscopy, 6<sup>th</sup> Meeting 1995, 204-207
- [47] Meyer, J.H.  
Near infra-red spectroscopy (NIRS) research in the South African sugar industry  
*International Sugar Journal* **100** 1998, 279-286
- [48] Meyer, J.H.  
Overview over the near-infrared spectroscopy research in the South African sugar industry, Proceedings of the Sugar Processing Research Conference 1998, 144-159
- [49] Clarke, M.A.; Edey, L.A., Scott, C.V.; Miranda, X.M.; McDonalds-Lewis, C.  
Near infrared (NIR) analysis in sugar factories  
Proceedings Sugar Process Research Conference 1993, 244-64
- [50] Pax, R.A.  
NIR: its use and abuse – casestudy of B molasses  
Proc. Conf. of the Aus. Society of sugar cane Technologists, 15<sup>th</sup> Meeting 1993, 202-7
- [51] Heppner, S.; Thielecke, K.; Buchholz, K.; Wullbrandt, D.  
Einsatzmöglichkeiten der NIR-Spektroskopie in der Zuckerindustrie  
*Zuckerindustrie* **125** 2000, 325-330

- [52] Salgo, A.; Nagy, J.; Miko, E.; Boros, I.  
Application of near infrared spectroscopy in the sugar industry  
*Journal of Near Infrared Spectroscopy* 1998, A101-A106
- [53] Mc Gillivray, T.; Wallevand, J.; Jacobson, B.  
NIR analysis of molasses chromatographic separation streams  
*International Sugar Journal* **100** 1998, 546-551
- [54] Mc Gillivray, T.; Wallevand, J.; Jacobson, B.  
Analysis of molasses chromatographic separation streams by NIR  
Proceedings Conference on sugar processing Research, March 1998, 81-92
- [55] Mc Gillivray, T.; Wallevand, J.  
Use of near infrared (NIR) analysis for Monitoring ion exclusion separation profiles  
Proc. Workshop on Separation Processes in the sugar industry, April 1996, 182-195
- [56] Thomas, V.  
A primer on multivariate calibration  
*Analytical Chemistry* **66** 1994, A795-A804
- [57] Schäffler, K.J.; De Gaye, M.  
Rapid near Estimation of multi components in mixed juice and final Molasses: The possibility of day-to-day control of raw sugar factories using NIR  
Proceeding South African Sugar Technologists Association 1997, 153-160
- [58] Weyer, L.G.; Lo, S.C.  
Spectra-structure correlation in the Near-infrared – Handbook of Vibr. Spectroscopy  
John Wiley & Sons 2002, Vol. 3, 1817-1837
- [59] Lever, M.; Randall, K.; Galinski, E.A.  
Near IR spectra of urea with glycine betaine or trimethylamine N-oxide are additive  
*Biochimica et Biophysica Acta* **1528** 2001, 135-140
- [60] Schlegel, H.G.  
Allgemeine Mikrobiologie  
Thieme-Verlag 1992
- [61] Twigg, R.S.  
Oxidation-Reduktion Aspects of Resazurin  
*Nature* **155** 1945, 401-402

- [62] Maeda, H.; Matsu-Ura, S.; Yamauchi, Y.; Ohmori, H.  
Resazurin as an electron acceptor in glucose oxidase-catalyzed oxidation of glucose  
*Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **49** 2001, 622-625
- [63] Siegel, T.W.; Smith, S.R.; Ellery, C.A.; Williamson, J.R.; Oates, P.J.  
An Enzymatic Fluorometric Assay for Fructose  
*Analytical Biochemistry* **280** 2000, 329-331
- [64] Matsu-Ura, S.; Yamauchi, Y.; Ohmori, H.; Maeda, H.  
Blood Glucose determination with the reduction of resazurin as a fluorometric indicator  
*Bunseki Kagaku* **51** 2002, 111-115
- [65] De Fries, R.; Mistuhashi, M.  
Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of Almar Blue assay to <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assay  
*Journal of Clinical Laboratory Analysis* **9** 1995, 89-95
- [66] O'Brian J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F.  
Investigation of Almar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity  
*European Journal of Biochemistry* **267** 2000, 5421-5426
- [67] Thomas, S.B.; Jones, T.I.; Griffiths, D.G.  
Investigations on the resazurin test  
*Dairy Industries* **28** 1963, 812-817
- [68] Davis, J.G.  
The resazurin Test. A review of recent work  
*Dairy Industries* **5** 1940, 18-21
- [69] Smith, C.F.; Townsend, D.E.  
A new medium for determining the total plate count in food  
*Journal of food protection* **62** 1999, 1404-1410
- [70] Stryer, L.  
Biochemie  
Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, 1996
- [71] Rassmussen, E.S.  
Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability  
*In Vitro Molecular Toxicology* **12** 1999, 47-58

- [72] Marose, S.  
Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie  
Dissertation, Universität Hannover 1999
- [73] Kitson, T.M.  
A colourful Journey through the Chemistry of Resazurin-Enzyme interactions  
*Chemistry in New Zealand* **63** 1999, 7-12
- [74] Neumann, M.G.; Schmitt, C.C.; Previtali, C.M.; Bertolotti, S.G.  
Photoreduction of resazurin in the presence of aliphatic amines  
*Dyes and Pigments* **32** 1996, 93-99
- [75] Simpson, D.J.; Unkefer, C.J.; Whaley, T.W.; Marrone B.L.  
A mechanism-Based fluorogenic Probe for the Cytochrom P-450 Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme  
*Journal of Organic Chemistry* **56** 1991, 5391-5396
- [76] Safavi, A.; Rahmani, A.; Naeem Hosseini, V.  
Kinetic-spectrophotometric determination of sulfide by its reaction with resazurin  
*Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **354** 1996, 502-504
- [77] Yang, S.-T.; Tang, I.-C.; Zhu, H  
A novel Fermentation Process for Calcium Magnesium Acetat (CMA) Production from cheese whey  
*Applied Biochemistry and Biotechnology* **34/35** 1992, 569-583
- [78] Ljungdahl, L.G.; Wiegel, J.  
Working with anaerobic Bacteria; In: Industrial Microbiology and Biotechnology  
ASM Press 1999
- [79] Lederberg, J.  
Encyclopedia of Microbiology  
Academic Press 2000, Vol. 1
- [80] Yang, S.-T.; Zhu, H.; Lewis, V.P.; Tang, I.-C.  
Calcium magnesium acetate (CMA) production from whey permeate: Process and economic analysis  
*Resources, Conservation and Recycling* **7** 1992, 181-200
- [81] Deutsche Gesellschaft von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
Catalogue of strains  
DSM, 5<sup>th</sup> edition, 1993

## Lebenslauf

Name	Christian Harbeck
Geburtstag	11.08.1972
Geburtsort	Gehrden
Familienstand	ledig

### *Schulausbildung*

08/1979 bis 06/1992      Abschluß mit Abitur, Helene-Lange Schule (Hannover)

### *Zivildienst*

07/1992 bis 08/1993      Zivildienst im Frederiken-Stift (Hannover)

### *Hochschulbildung*

10/1993 bis 05/1999      Studium der Chemie an der Universität Hannover

10/1995                      Vordiplom in Chemie

10/1995 bis 02/1998      Studium der Wirtschaftswissenschaften an der Universität Hannover

02/1998                      Vordiplom in Wirtschaftswissenschaften

11/1998 bis 05/1999      Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität unter  
Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper

05/1999                      Abschluß als Diplom-Chemiker

06/1999                      Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Technische  
Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr.  
Thomas Scheper