

**Fermentative Gewinnung von Paramylon  
aus *Euglena gracilis* auf Nebenprodukten der  
Stärkeindustrie in einer Pilotanlage**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte  
**Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Joachim Ryll  
geboren am 14.08.1966  
in Bissendorf

Hannover, im Januar 2005

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper  
Korreferent: Prof. Dr. Diethardt Hesse  
Tag der Promotion: 21. Januar 2005

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im November 2004

---

(Joachim Ryll)

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand von Juli 2000 bis September 2003 am Institut für Technische Chemie im Arbeitskreis Biotechnologie unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für das interessante Thema und die guten Arbeitsbedingungen am Institut danken möchte. Ich danke Prof. Dr. Diethardt Hesse für die Übernahme des Korreferates.

Bei Prof. Dr. Flaschel, Dr. Karl Friehs, Dr. Santek und natürlich meinem Kollegen Michael Felski in Bielefeld, die die Grundlagen für diese Arbeit geschaffen haben, möchte ich mich für die freundschaftliche und kooperative Zusammenarbeit bedanken.

Dem Kooperationspartner Emsland-Stärke und Projektleiter Dr. Martin Lotz danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten und Unterstützung in Emlichheim. Martina, Antje und Silvia danke ich für die Stickstoffmessungen, Anke für die Koordination meiner Dienstreisen und dem ganzen Forschungs- und Betriebslabor der Emsland-Stärke für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt Gerold Eggengor, dessen Mitarbeit, Rat und Erfahrung diese Arbeit sehr erleichtert hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Vermietern in Emlichheim – Herrn und Frau Spickmann, die mit Interesse meine Arbeit unterstützten und mit Hilfe diverser Leckereien über manche Frustmomente hinweg halfen.

Allen Graftschaftern ein herzliches Danke für die schöne Zeit in Emlichheim.

Bei Dr. Hofer am OCI bedanke ich mich für die Anfertigung und Erläuterung der NMR-Spektren. Der TCI-Werkstatt und Wilhelm Behnsen danke ich für die Arbeiten an den Fermentern, Ivo Havlik und Michael Dors für die Hilfe bei Computer- und RISP-Problemen und Angelika für die „kreative Verwaltung meiner Reisekosten“.

Bernhardt Cochanski möchte ich für die vielen Tipps und Jan-Gerd Frerichs und Thomas Brückerhoff für die Zusammenarbeit mit dem Insitu-Mikroskop danken.

Besonderer Dank gilt Oliver Schweder, dessen Hilfe am BioView-Sensor viel zu der Arbeit beigetragen hat. Alex und Arne danke ich für die Hilfe bei der Mikrofotographie (und für's Blumengießen), Kirstin für die Untersuchung des Paramylon, Frauke für die Korrekturen und Dr. Cornelia Kasper für Tipps, Korrekturen und Gummibärchen.

Danke an das ganze TCI.

Weiterhin danke ich für die finanzielle Förderung des Projektes durch das Bundesministerium für Forschung und Bildung.

## Abstract

Joachim Ryll

### Fermentative production of Paramylon from *Euglena gracilis* in by-products of starch industry in a pilot plant

The unicellular organism *Euglena gracilis* is able to change its metabolism if sufficient nutrients are available in media from phototrophy to heterotrophy. Under heterotrophic conditions the production of the store carbohydrate Paramylon (a polysaccharide with  $\beta$ -1,3-linked glucose molecules) is increasing. Paramylon and several  $\beta$ -1,3-glucans from other organism are known for their immunostimulating effect. Because of these effects several applications of Paramylon for functional food, cosmetics and pharmacy are conceivable. In contrast to other  $\beta$ -glucan sources (bacteria, yeast) the concentration of Paramylon in *Euglena gracilis* is high (about 70 % of dry matter) and the downstream processing is not elaborate.

A 4000 L pilot plant was established at Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim (in cooperation with the University of Bielefeld) and the complete process from fermentation, downstream processing to the dry product was carried out in a technical scale.

Potato fruit juice could be used as a fermentation media and alternatively potato protein liquor (PPL) is available. Because of the high amount of proteins, minerals and vitamins in the media, there is no need for additional nutrients apart from glucose. To observe the fermentation without the risk of infection online-monitoring by 2-D-fluorescence spectroscopy (BioView-Sensor) and insitu-microscopy was performed in a 30 L laboratory plant in Hannover.

The concentration of biomolecules like some amino acids could be observed and the chronological variation of these concentrations implicates the increasing biomass. The changes from lag phase to exponential growth and the end of exponential phase (end of fermentation) are apparent. With the insitu-microscope it is possible to look inside the bioreactor during the fermentation process. Shape and agility of the organism are an indication of the conditions in the reactor. These methods deliver data about cell growth, eventually infections and status of the fermentation without sampling and could be used also in an industrial plant.

**Keywords:** Paramylon,  $\beta$ -1,3-glucan, *Euglena gracilis*, 2-D-fluorescence spectroscopy, insitu-microscopy, online-monitoring, potato fruit juice

# Zusammenfassung

Joachim Ryll

## Fermentative Gewinnung von Paramylon aus *Euglena gracilis* auf Nebenprodukten der Stärkeindustrie in einer Pilotanlage

Der einzellige Organismus *Euglena gracilis* kann den Stoffwechsel von Phototrophie zur Heterotrophie ändern, wenn genügend Nährstoffe im Medium verfügbar sind. Unter heterotrophen Bedingungen steigt die Produktion der Reservekohlehydrats Paramylon (ein Polysaccharid mit  $\beta$ -1,3 verknüpften Glucosemolekülen). Paramylon und einige weitere  $\beta$ -1,3-Glucane aus anderen Organismen sind für immunostimulierende Effekte bekannt. Aufgrund dieser Wirkung sind mehrere Anwendungen für Paramylon im Bereich Functional Food, Kosmetik und Pharmazie vorstellbar. Im Gegensatz zu anderen Quellen von  $\beta$ -Glucan (Bakterien, Hefe) ist die Paramylonkonzentration in *Euglena gracilis* hoch (ca. 70 % der Trockenmasse) und der Aufarbeitungsprozess nicht sehr aufwendig.

Bei der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim wurde (in Kooperation mit der Universität Bielefeld) eine 4000 L Pilotanlage aufgebaut und der gesamte Prozess von der Fermentation über die Aufarbeitung zum Endprodukt in technischen Maßstab durchgeführt.

Als Fermentationsmedium kann Kartoffelfruchtwasser und alternativ Potato Protein Liquor (PPL) eingesetzt werden. Wegen des hohen Gehalts an Proteinen, Mineralien und Vitaminen im Medium sind keine zusätzlichen Nährstoffe außer Glucose notwendig.

Zur Überwachung der Fermentation ohne Infektionsrisiko wird ein online-Monitoring mit 2-D-Fluoreszenzspektroskopie (BioView-Sensor) und Insitu-Mikroskopie in einer 30 L Laboranlage in Hannover eingesetzt. Die Konzentration von Biomolekülen wie z.B. einigen Aminosäuren kann so verfolgt werden, wobei die zeitliche Veränderung einen Hinweis auf anwachsende Biomasse gibt. Die Übergänge von der Lag-Phase zum exponentiellen Wachstum und zum Ende der exponentiellen Phase (Fermentationsende) sind erkennbar. Mit dem Insitu-Mikroskop ist es möglich während der Fermentation direkt in den Bioreaktor zu schauen. Form und Beweglichkeit des Organismus geben Hinweise auf die Bedingungen im Fermenter. Diese Methoden liefern ohne Probenahme Daten über Zellwachstum, evtl. Infektionen und den Status der Fermentation und sind auch auf eine industrielle Anlage übertragbar.

**Stichworte:** Paramylon,  $\beta$ -1,3-Glucan, *Euglena gracilis*, 2-D-Fluoreszenzspektroskopie, Insitu-Mikroskopie, online-Monitoring, Kartoffelfruchtwasser

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Kartoffelfruchtwasser	3
2.2. Das Augentierchen <i>Euglena gracilis</i>	5
2.3. Bioreaktoren	7
2.4. optische Sensoren in der Biotechnologie	12
2.4.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	13
2.4.2. Einflüsse auf die Fluoreszenz	13
2.4.3. Darstellung von Fluoreszenzspektren	15
2.4.4. BioView-Sensor	18
2.5. MALDI-Massenspektrometrie	19
3. Material und Methoden	21
3.1. Fermentation	21
3.1.1. Verwendeter Organismus	21
3.1.2. Stammhaltung von <i>Euglena gracilis</i>	21
3.1.3. Zellzahlbestimmung	23
3.1.4. Steriltest	25
3.1.5. Bestimmung der Glucosekonzentration	26
3.2. Kultivierung im Technikum Hannover	27
3.2.1. Aufbau der Laboranlage	27
3.2.2. BioView-Sensor	29
3.2.3. Insitu-Mikroskop	32
3.3. Eingesetzte Kulturmedien	33
3.3.1. Kultivierung in einem Medium auf Basis von Kartoffelfruchtwasser	33
3.3.2. Fermentation mit Medium auf Basis von Potato Protein Liquor	35
3.4. Zellaufschluss und Aufarbeitung	35
3.4.1. Aufarbeitung mit Natriumdodecylsulfat (SDS)	36
3.4.2. Enzymatische Extraktion mit Proteasen	36

---

3.5. Fermentation im Technikum Emlichheim	37
3.5.1. Pilotanlage Emlichheim	38
3.5.2. Belüftung der Anlage	41
3.5.3. Sterilisation der Anlage	42
3.5.4. Kampagnebetrieb	44
3.5.5. Enzymatische Glucosebestimmung	45
3.5.6. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl	46
3.5.7. Zellaufschluss mit Hochdruckhomogenisator	47
3.6. Produktanalytik	48
4. Ergebnisse	50
4.1. Medienvorbereitung in der Laboranlage	50
4.1.1. Kartoffelfruchtwasser als Fermentationsmedium	50
4.1.2. Potato Protein Liquor als Medium	57
4.1.3. Zellaufschluss mit Ultraschall und Aufarbeitung	57
4.2. Pilotanlage Emlichheim in der 1. Projektkampagne 2000/2001	59
4.2.1. Kampagnebetrieb an der Pilotanlage Emlichheim	63
4.2.2. Aufschluss und Aufarbeitung	72
4.3. Online-Analytik in der Laboranlage	75
4.3.1. 2-D-Fluoreszenzspektroskopie	75
4.3.2. Insitu-Mikroskop	86
4.4. 2. Kampagne an der Pilotanlage Emlichheim	90
4.5. Untersuchung halbkontinuierlicher Verfahren mit der Laboranlage Hannover	95
4.6. Analytik des Paramylon	101
5. Zusammenfassung	106
6. Literaturverzeichnis	110
7. Abkürzungsverzeichnis	114
8. Anhang	117



## 1. Einleitung und Zielsetzung

Biotechnologie ist laut OECD-Definition:

die Anwendung wissenschaftlicher und technischer Prinzipien zur Stoffumwandlung durch biologische Agenzien mit dem Ziel der Bereitstellung von Gütern und Dienstleistungen. Unter biologischen Agenzien versteht man Bakterien, Algen, Pilze aber auch Zellkulturen. Biotechnologie ist üblicherweise gekennzeichnet durch hohe Aufwendungen für die technische Anlage und vor allem hohe Kosten für die Aufarbeitung und Reinigung der Produkte, wohingegen der eigentliche Betrieb im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren z.B. der chemische Synthese oft günstiger ist. Biotechnologie eignet sich daher besonders zur weiteren Verwertung biologischer Rest- bzw. Abfallstoffe im Rahmen wertschöpfender Maßnahmen, wo die Ausgangssubstanzen preisgünstig zur Verfügung stehen.

Bei der Verarbeitung pflanzlicher Rohstoffe fallen große Mengen an Reststoffen, wie Fasern, Schalen und nicht zuletzt Pflanzensäfte an, die meist als Abfall entsorgt werden, obwohl sie als Grundlage für eine weitere biotechnologische Nutzung dienen könnten. Die in diesen Materialien enthaltenen Kohlenhydrate, Mineralien und Vitamine können zur Fermentation von Mikroorganismen verwendet werden.

Bei der Produktion von Kartoffelstärke fallen große Mengen des sogenannten Kartoffelfruchtwassers an. Hierbei handelt es sich um den flüssigen Rest, der nach Abtrennung der Stärke und Faserstoffe aus den geriebenen Kartoffeln übrig bleibt. Durch den hohen Gehalt an Mineralstoffen, Aminosäuren und Vitaminen stellt Kartoffelfruchtwasser ein gutes Fermentationsmedium dar, das in großer Menge kostengünstig zur Verfügung steht. Gemeinsam mit der Arbeitsgemeinschaft Fermentationstechnik der Universität Bielefeld und der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim wird im Rahmen eines vom Bundesministerium für Forschung und Bildung geförderten Projektes [Förderkennzeichen BMBF 0339927] ein Prozess entwickelt mit dem *Euglena gracilis* unter heterotrophen Bedingungen in einem Medium auf der Basis von Kartoffelfruchtwasser kultiviert werden kann. Im Gegensatz zum phototrophen Zustand bildet der Organismus unter diesen Bedingungen größere Mengen von dem Speicherkohlenhydrat Paramylon, das zu den  $\beta$ -1,3-Glucanen gehört. Wegen ihrer immunstimulierenden und zellregenerativen Wirkung sind  $\beta$ -Glucane für die Pharmazie, Kosmetik aber auch als Nahrungsmittelergänzung bzw. Futtermittelzusatz interessant [1, 2, 3, 4].

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Rahmen dieser Kooperation mit der Aufgabe - mit Hilfe der Laborergebnisse aus Bielefeld - einen Fermentationsprozess für eine 4000 L-Pilotanlage der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim zu entwickeln. Der Prozess wird im Hinblick auf eine mögliche Produktionsanlage ausgelegt und beinhaltet die mikrobiologischen Aspekte des Organismus *Euglena gracilis*, die Untersuchung der zur Verfügung stehenden Medien auf der Basis von Kartoffelfruchtwasser sowie den gesamten Ablauf von der Medienaufbereitung über die Fermentation, Zellaufschluss bis zur Aufarbeitung und Reinigung des Endprodukts. Das Scale-up soll von Schüttelkulturen über eine 30 L-Laboranlage bis zur 4000 L-Pilotanlage durchgeführt werden.

Für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens stellen Medienaufbereitung, Zellwachstum, Paramylonausbeute und eine möglichst einfache aber effektive Aufarbeitung die entscheidenden Parameter und damit die Schwerpunkte dieser Arbeit dar.

Weiterhin soll eine online-Prozessanalytik auf Basis der 2-D-Fluoreszenzspektroskopie und der In-situ-Mikroskopie zur Überwachung und evtl. Steuerung einer Fermentationsanlage entwickelt und die Möglichkeiten einer Produktanalytik des Paramylons untersucht werden. Die praktischen Arbeiten wurden im Zeitraum von Juli 2000 bis September 2003 sowohl am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover als auch im Technikum der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim angefertigt. Während des Kampagnebetriebes von August- Januar fanden die Arbeiten fast ausschließlich in Emlichheim statt und in der übrigen Zeit je nach Dringlichkeit in Hannover oder Emlichheim.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Kartoffelfruchtwasser

Stärkekartoffeln haben einen Stärkeanteil von mindestens 14- 20 %, die durch Reiben und Auswaschen von den Faserstoffen abgetrennt wird. Bedingt durch den hohen Wassergehalt der Kartoffel fallen dabei große Mengen Kartoffelfruchtwasser an. Kartoffelfruchtwasser enthält neben Reststärke noch ca. 25 g/L Kartoffelproteine, freie Aminosäuren, Mineralien und Vitamine [5, 6, 7]. Zusätzlich enthält die Knolle auch noch Alkaloide und Proteaseinhibitoren, die vor Schädlingsbefall schützen. Durch den Gehalt an Nährstoffen würde das Abwasser ohne vorherige Reinigung zur Eutrophierung der Gewässer führen, weshalb es vor der Entsorgung umfangreich gereinigt werden muss. Der hohe Nährstoffgehalt macht es aber auch als Nährmedium für Fermentationen interessant.

Das Kartoffelfruchtwasser (KFW) wird in einer Umkehrosiose filtriert und aufkonzentriert und danach zur Eiweißgewinnung geleitet. Hier wird durch Injektion von Heißdampf das enthaltene Protein bei ca. 112 °C weitgehend hitzeokoaguliert und abgetrennt. Das Protein, das hier als Wertstoff gewonnen wird (Viehfutter, Düngemittel etc.), würde in der nachfolgenden Eindampfung ausflocken und die Leitungen verkleben.

Das verbleibende Kartoffelfruchtwasser wird mit Prozesswasser vermischt und eingedampft (Potato Protein Liquor PPL). PPL hat noch einen Eiweißgehalt von ca. 20 % bei ca. 50 % Trockensubstanz (Analyse LUFA Oldenburg) und wird ebenfalls als Viehfutter und Düngemittel eingesetzt. Das Kondensat aus der Eindampfung gelangt in die Kläranlage und wird von dort zum Teil wieder in den Wasserkreislauf eingespeist bzw. in den Fluss Vechte geleitet. Das folgende Diagramm (Abb. 1) zeigt den derzeitigen Wasserkreislauf im Werk der Emsland-Stärke GmbH im Stammwerk Emlichheim im Landkreis Grafschaft Bentheim mit der geplanten Fermentationsanlage (siehe auch Darstellung im Anhang).

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf den Umsatz während einer Kampagne, die üblicherweise von August bis Ende Januar läuft.

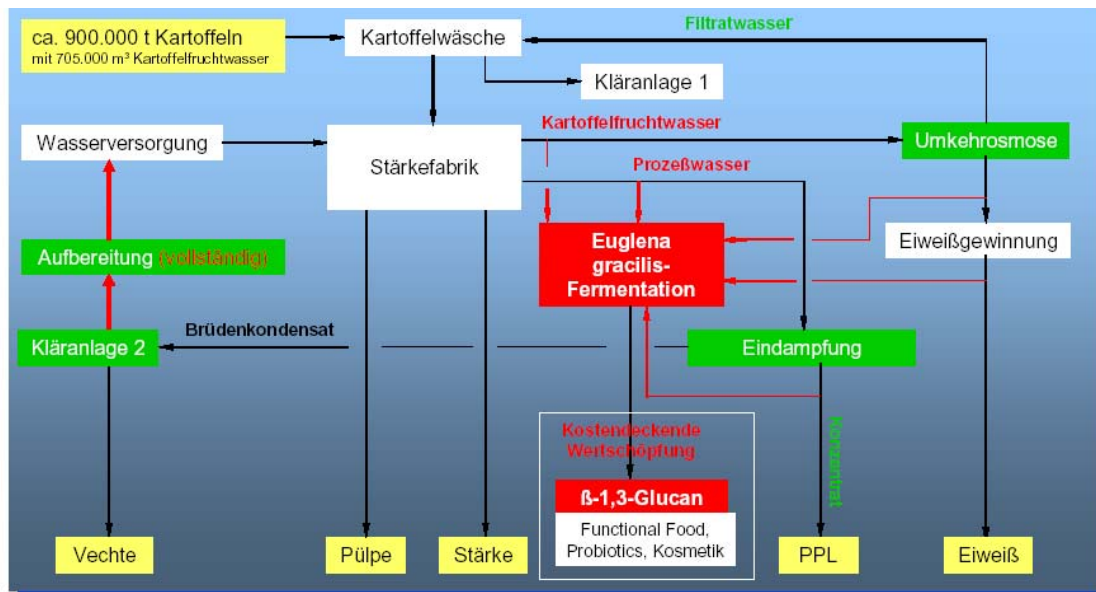


Abb. 1: Wasserkreislauf der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim mit der geplanten Fermentation [8]

## 2.2. Das Augentierchen *Euglena gracilis*

Die Gattung *Euglena* stellt nach van den Hoek [9] den Prototyp der Klasse der Euglenophyceae dar, die als Euglenophyta eine eigene Abteilung mit rund 40 Gattungen und 800 Arten bilden. Charakteristisch sind einzellige, eukaryontische, meist limnische Flagellaten mit zumeist zwei anterioren Geißeln, die ausgeprägte sowohl positive als auch negative phototaktische Mobilität zeigen. Die Chloroplasten sind von drei Hüllmembranen umgeben und enthalten bei autotropher Anzucht Chlorophyll a und b sowie einige Carotinoide.

Aufgrund der Fähigkeit zur Photosynthese wird *Euglena gracilis* (Abb. 2) oft auch als Grünalge bezeichnet. Wegen ihrer aktiven Bewegung und der vielfach heterotrophen Lebensweise innerhalb der Gattung, sowie der Unterschiede im zellulären Aufbau zu den Algen ist die Taxonomie der Gattung *Euglena* noch immer strittig.

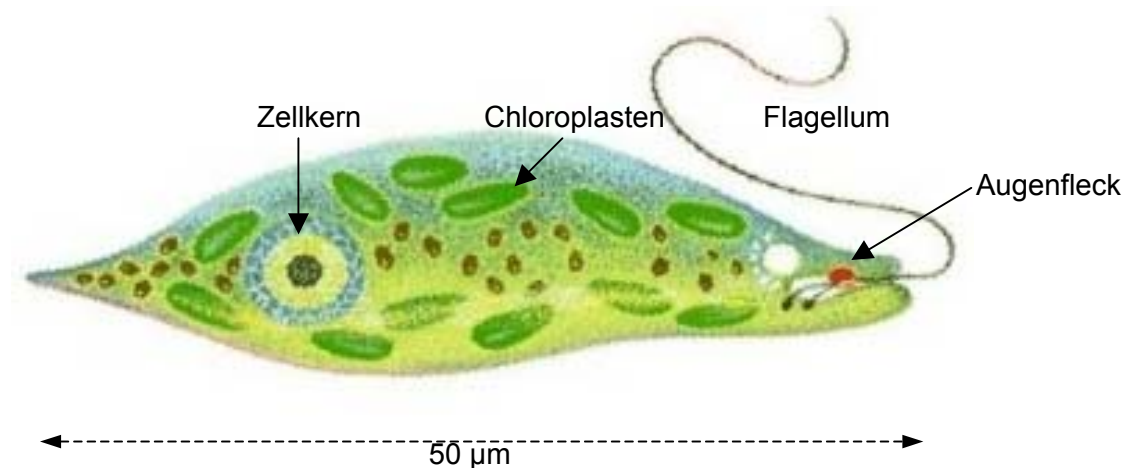


Abb. 2: Skizze von *Euglena gracilis*

Vieles spricht für die Endosymbionten-Theorie, nach der eine Symbiose mit einer Alge bestand, von der im Lauf der Evolution nur noch die Chloroplasten vorhanden sind. *Euglena gracilis* lebt unter normalen Bedingungen photoautotroph kann aber bei Lichtmangel den Stoffwechsel zur Heterotrophie ändern und verliert innerhalb von acht Generationen das gesamte Chlorophyll [9]. Bei ausreichender Nährstoffversorgung wird das Speicherkohlenhydrat Paramylon in Form kompakter Partikel von ca. 2-3 µm Durchmesser gebildet. Unter heterotrophen Bedingungen kann bei hoher Nährstoffdichte die Zelle vollständig mit Paramylonkörpern gefüllt werden (Abb. 3).



Abb. 3: *Euglena gracilis* unter heterotrophen Bedingungen mit Paramylonkörpern (1000x Vergr.)

Paramylon gehört wie Amylose zu den Glucanen (Polyglucosen). Im Gegensatz zur Stärke ( $\alpha$ -1,4-Glucan) weist Paramylon eine  $\beta$ -1,3-Verknüpfung der einzelnen Glucosemoleküle auf. Die Struktur ist unverzweigt linear.

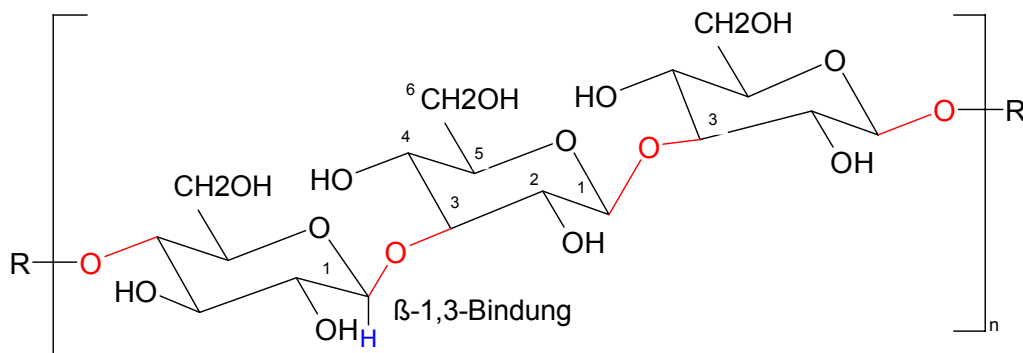


Abb. 4: Ausschnitt aus einer  $\beta$ -1,3-Glucankette (Paramylon)

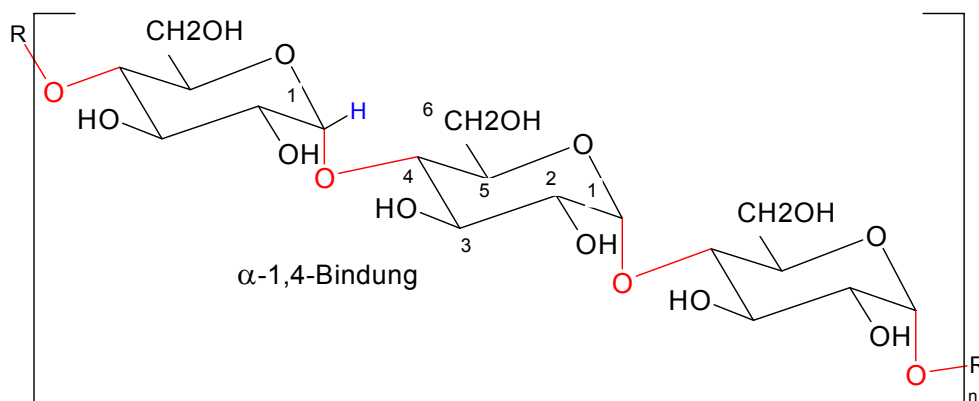


Abb. 5: Ausschnitt aus einer  $\alpha$ -1,4-Glucankette (Amylose)

Andere bekannte  $\beta$ -Glucane wie z.B. aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzen 1,6-Verzweigungen zwischen den einzelnen Ketten - ähnlich dem Amylopektin, das eine  $\alpha$ -1,4-1,6-Struktur hat.

In der Natur kommen  $\beta$ -Glucane in einigen Getreidearten und Pilzen aber auch bei diversen Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen vor. Daher rührt vermutlich die aktivierende Wirkung dieser Substanzen auf unser Immunsystem. Bereits seit etwa 1950 sind die immunomodulatorischen Eigenschaften einiger  $\beta$ -1,3-Glucane bekannt [1, 10-14] und auch Paramylon und seine Derivate haben in verschiedenen Studien [2, 3, 4, 15] eine Stimulation der unspezifischen Immunreaktion gezeigt. Daher besteht ein potentielles Einsatzgebiet im Bereich der Pharmazie und als „Functional food“ bzw. Nahrungsergänzung/Tierfutterzusatz. Aufgrund der zellregenerierenden Wirkung sind  $\beta$ -Glucane auch für die Kosmetik interessant und werden bereits in Hautcremes u.ä. eingesetzt. Da es für den menschlichen Organismus unverdaulich ist, wirkt es nicht zuletzt als Ballaststoff, die in unserer industriell gefertigten Nahrung häufig in zu geringem Maße vorhanden sind.

### 2.3. Bioreaktoren

Der Bioreaktor ist ein System, in dem optimale Bedingungen für die gewählten Biokomponenten (Zellen, Enzyme) eingestellt werden können, sowie das Eindringen unerwünschter Kontaminanten unterbunden werden kann [16] .

Den größten Einfluss auf die Bedingungen im Bioreaktor haben:

- pH (Wachstumsoptimum)
- Temperatur
- Sauerstoffgehalt
- Scherkräfte durch Mischtechnik
- Licht (bei phototrophen Organismen)
  
- Medienzusammensetzung:
  - ◆ Makronährstoffe (vor allem C, N, P, S, Na, K, Ca, Fe,... )
  - ◆ Spurenelemente (Se, Mn, Co, Zn,...)
  - ◆ essentielle Aminosäuren
  - ◆ Vitamine

## Wachstum im Bioreaktor

Die Formalkinetik setzt sich zusammen aus den biologischen Reaktionen in den Zellen und der reaktionstechnischen Kinetik (Stofftransport etc.). Sie beschreibt das komplexe Zusammenspiel zwischen Reaktor und Zellbiologie [16].

Formalkinetik des Zellwachstums und der Produktbildung

Man muss kennen:

- Reaktortyp
- Stamm
- physiologischer Zustand
- Vorgeschichte/ Vorkultur
- Morphologie
- Umwelt

Modelle, die dieses Wissen umfassen, bezeichnet man als strukturierte Modelle. Bei undefinierten Bedingungen wird das Geschehen mit unstrukturierten Modellen als Funktion der Prozessvariablen (Substrat, Produkt, etc.) beschrieben, die Zellen sind "black boxes". In realen Systemen wird eine modellmäßige Erfassung immer schwieriger: Phänomene wie Mutationen oder Plasmidverlust können nur mit sehr komplexen strukturierten Modellen erfasst werden.

Basisgrößen zur Beschreibung der Formalkinetik des Zellwachstums sind:

Zellmassenkonzentration:  $X$

Zellzahlkonzentration:  $n$

Unbeschränktes Wachstum heißt: Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung:

$2^0 ; 2^1 ; 2^2 ; \dots ; 2^m ; 2^{m+1}$  Zellen

Es gilt: bei  $t = t_0$  sind  $n_0$  Zellen vorhanden

bei  $t = t'$  haben sich  $m$  Teilungen ergeben und  $n$  Zellen sind vorhanden mit

$$n = n_0 \cdot 2^m$$



Auflösen nach  $m$  durch Logarithmieren ergibt die Anzahl der Teilungen in der Zeit zwischen  $t_0$  und  $t'$ :

$$m = \frac{\log n - \log n_0}{\log 2}$$

Die Zahl der Teilungen  $m$  pro Zeiteinheit bezeichnet man als die Generationszeit  $\left( \frac{m}{t' - t_0} \right)$

Da die Zellmassenkonzentration von Interesse ist, gilt:

$$R_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{mit:} \quad R_x = \text{Wachstumsgeschwindigkeit}$$

$$\frac{dx}{dt} = \text{Änderung der Zellmassenkonzentration mit der}$$

Zeit

$$\mu = \text{spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h}^{-1}\text{]}$$

### Ungehindertes Wachstum

Die Wachstumsgeschwindigkeit ist für eine ungehindert wachsende Kultur konstant, so dass

$$\text{gilt:} \quad \mu = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x}$$

Auch hier kann man  $x_0$  als Anfangskonzentration wählen ( $t = 0: x = x_0$ ):

$$\text{Dann folgt nach Integration: } \ln \frac{x}{x_0} = \mu \cdot t$$

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t} \quad \text{exponentielles Wachstumsgesetz}$$

Man definiert analog zur Halbwertszeit des radioaktiven Zerfalls eine Verdopplungszeit  $t_D$ , nach der sich die Zellkonzentration verdoppelt hat:

$$2x_0 = x_0 \cdot e^{\mu t_D} \Rightarrow \mu = \frac{\ln(x(t_2)/x(t_1))}{t_2 - t_1}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_D} \Rightarrow t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Diese Verdopplungszeit wird bei Zweiteilung auch Generationszeit genannt (gilt analog auch für die Zellzahlkonzentration  $n$  als Zellzahl pro Volumen).

## Reales Wachstum im Satzreaktor

In der Realität lässt sich eine Satzkultur in Einzelschritte unterteilen:

Trägt man die Zellmassenkonzentration (d.h. Zellmasse/Zellvolumen) gegen die Zeit auf, erhält man 7 Abschnitte. Als Randbedingungen sind zu beachten: Einfacher Organismus, ein Substrat (dieses limitiert, sobald es verbraucht ist).

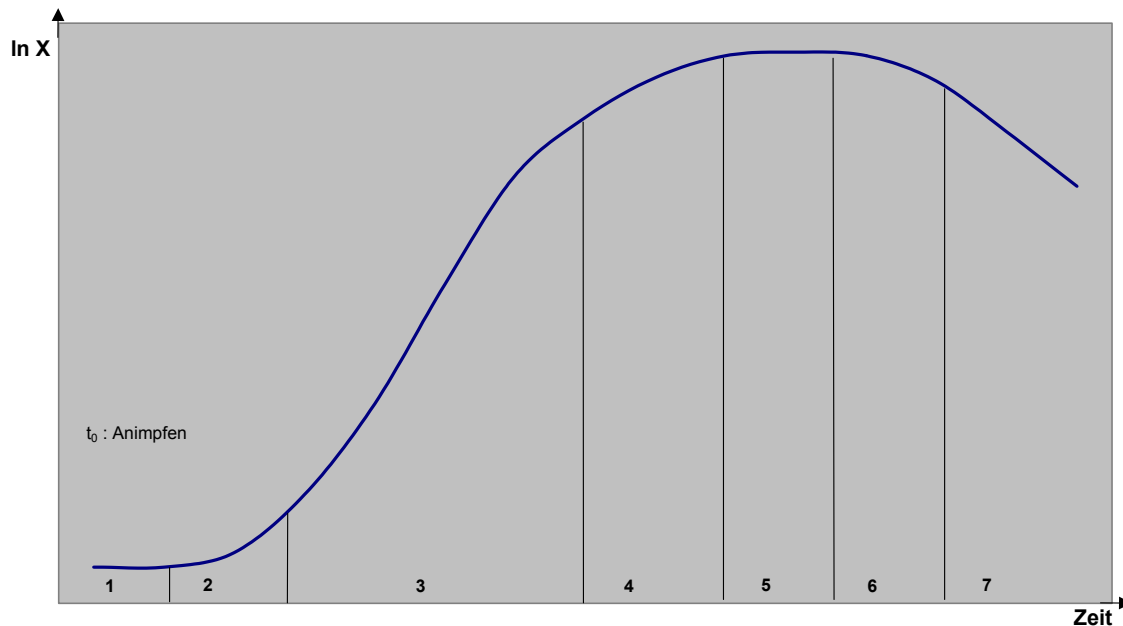


Abb. 6: Wachstumskurve eines Mikroorganismus

Die Lebensbedingungen der Zellen ändern sich mit der Zeit, d.h. die Wachstumsgeschwindigkeit ändert sich in den einzelnen Phasen.

### 1: Lag-Phase

Durch Umsetzen in eine andere Umgebung wird das Zellwachstum zuerst stark verlangsamt (neue Substrate, andere Verdünnung, pH-Wert-Änderung, Scherbeanspruchung, Zellen kommen evtl. aus der Ruhephase der Vorkultur). Die Zellen sollten daher nach Möglichkeit so überführt werden, dass diese Effekte nicht zu gravierend sind. Die Lag-Phase ist je nach Bedingungen unterschiedlich lang. Die Zellzahlkonzentration  $n$  ändert sich kaum, wohl aber die Zellmassenkonzentration  $X$  (RNA- und Proteinproduktion).

### 2:

Die ersten Zellen beginnen, sich "normal" zu teilen. Diese Phase dauert solange, bis alle Zellen in die exponentielle Wachstumsphase übergegangen sind.

**3: Exponentielles Wachstum**

Hier liegt nicht limitiertes Wachstum vor. Alle Zellen wachsen schnellstmöglich. Die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  ist erreicht. In dieser Phase gelten die Gesetze des unlimitierten Wachstums (s.o.) streng! Es gilt aber allgemein:  $\mu = f(t)$

**4:**

Die Substratkonzentration beginnt sich so zu verringern, dass Limitierung einsetzt. Evtl. wirken sich auch Stoffwechselprodukte hemmend aus. Zelltod tritt ein. Das Zellgewicht der einzelnen Zellen nimmt ab, da Speicherstoffe abgebaut werden. Oft ist die Teilungsrate noch groß, so dass das Zellgewicht kleiner wird. Die Zellzahlkonzentration erscheint daher länger in der exponentiellen Phase als die Zellmassenkonzentration.

**5: stationäre Phase**

Geschwindigkeit der Vermehrung und des Absterbens sind gleich. Zellzahl bzw. Zellmasse erscheint nach außen konstant. In dieser Phase sind die maximale Zellmassenkonzentration und Zellzahlkonzentration erreicht.

**6:**

Allmählich überwiegt die Absterberate. Zellmassen- und Zellzahlkonzentration sinken.

**7:**

Hier beginnt die exponentielle Absterberate, bei der eine bestimmte Absterbegeschwindigkeit erreicht wird.

## 2.4. Optische Sensoren in der Biotechnologie

Optische Sensoren werden vermehrt zur Prozessbeobachtung in der Biotechnologie eingesetzt, da sie nicht invasive und kontinuierliche Messungen erlauben. Die folgende Tabelle zählt die wichtigsten Vor- und Nachteile dieser Methoden auf.

Tabelle. 1: Vorteile und Probleme von optischen Sensoren für die Bioprozessbeobachtung [17]

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

### 2.4.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Als Fluoreszenz wird eine Form von Luminiszenz bezeichnet, bei der innerhalb von  $10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  s nach der Anregung (durch Einwirkung von sichtbarem oder ultraviolettem Licht bzw. Röntgen- od. Elektronenstrahlen) die absorbierte Energie in Form von Strahlung wieder abgegeben wird.

Fluoreszenz wird häufig bei kondensierten aromatischen Verbindungen beobachtet, die elektronisch leicht anregbare  $\pi$ -Elektronen aufweisen. Fluoreszierende Moleküle werden als Fluorophore bezeichnet. Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung werden sie innerhalb von  $10^{-15}$  s in einen elektronisch angeregten, energiereichen Zustand überführt. In der folgenden inneren Umwandlung (Vibrations- und Rotationsübergänge) erfolgt unter Temperatúrausgleich mit der Umgebung innerhalb von etwa  $10^{-13}$  s der strahlungslose Übergang zum ersten angeregten Zustand. Die Desaktivierung zum Grundzustand kann neben strahlungsloser Energieabgabe durch Emission eines Lichtquants erfolgen, die als Fluoreszenz bezeichnet wird [18].

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

Im Gegensatz zur indirekten Absorptionsmessung wird das emittierte Licht direkt gemessen, woraus eine um zwei bis drei Größenordnungen höhere Empfindlichkeit resultiert [19]. Die Intensität der Fluoreszenz steht in verdünnten Lösungen im linearen Zusammenhang mit der Konzentration des Fluorophors. Neben stoffspezifischen Größen (z. B. der Quantenausbeute und dem molaren Absorptionskoeffizienten) sind aber auch gerätespezifischen Größen (z. B. die Schichtdicke der Messzelle) von Bedeutung. Daher wird die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) angegeben.

Bei einer Fluoreszenzmessung werden im Idealfall nur Fluorophore erfasst, ohne dass andere Moleküle das Ergebnis beeinflussen. Diese Spezifität wird noch dadurch vergrößert, dass die Fluorophore sich durch unterschiedliche Anregungswellenlängen (Exzitation, Ex) und Fluoreszenzwellenlängen (Emission, Em) unterscheiden können.

### 2.4.2. Einflüsse auf die Fluoreszenz

In Tabelle 2 werden die vielfältigen Wechselwirkungen der Fluorophore mit ihrer Umgebung aufgelistet, die im Verlauf einer Kultivierung Fluoreszenzmessungen beeinflussen können [21-23]. Bei steigender Temperatur sinkt die Quantenausbeute und es kommt zur Abnahme der Fluoreszenzintensität. Eine Protonierung biogener Fluorophore verändert häufig deren Fluoreszenzeigenschaften (Intensität, Lage der Fluoreszenzpeaks).

Durch Gasblasen im Medium werden optische Messungen gestört. Deshalb haben Begasung und Rührerdrehzahl Einfluss auf die Fluoreszenzmessung. Auch Veränderungen von Dichte, Polarität und Viskosität des Mediums wirken sich in Bezug auf die Messwerte aus. Im Verlauf von Kultivierungen können Fluorophore in unterschiedliche Lösungsumgebung gelangen (z.B. bei der Verwendung oder Entstehung von Emulsionen), was die Fluoreszenzeigenschaften verändern kann.

Durch die Zunahme der Biomasse vergrößert sich die Trübung, und das Streulicht nimmt zu. Damit wird die Eindringtiefe des Anregungslichtes und auch die mittlere freie Weglänge des Emissionslichtes verringert. Fluoreszenzlöschung kann durch neutrale Moleküle (z.B. Sauerstoff), Anionen (z.B. Iodide, Bromide, Nitrate) oder Kationen (z.B.  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), aber auch durch Zellmembranen erfolgen. Eine besondere Form der Fluoreszenzlöschung (*concentration quenching*) kann auftreten, wenn die Konzentration des Fluorophors oberhalb des Sättigungsbereiches liegt.

Bei Küvettenmessungen können hohe Fluorophorkonzentration eine Abschwächung der messbaren Emission bewirken, da die emittierte Strahlung von Molekülen der selben Substanz absorbiert wird (*Inner-filter-Effekt*).

Als Kaskadeneffekt wird die Reabsorption emittierter Fluoreszenzstrahlung in Anwesenheit verschiedener Fluorophore bezeichnet, die eine geringere Konzentration des zuerst angeregten Stoffes vortäuscht.

Tabelle 2: Einflüsse auf die Fluoreszenzmessung

Temperatur
pH-Wert
Rührerdrehzahl, Begasung
Dichte, Polarität, Viskosität des Mediums
Lösungsmittel
Streulicht
Fluoreszenzlöschung
<i>Inner-filter</i> -Effekt
Kaskadeneffekt

### 2.4.3. Darstellung von Fluoreszenzspektren

Die Darstellung der RFI in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge bei gegebener, fester Anregungswellenlänge wird als Fluoreszenz-Emissionsspektrum bezeichnet, dieses Spektrum wird in der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie erhalten.

Bei der 2-D-Fluoreszenzspektroskopie wird der gesamte Anregungs- und Emissionsbereich erfasst. Es werden bei verschiedenen äquidistanten Anregungswellenlängen Fluoreszenz-Emissionsspektren aufgenommen. Die Darstellung kann als Kontur-Plot (Abb. 7) mit Höhenlinien ähnlich einer topographischen Karte oder als anschauliches 3D-Diagramm erfolgen (Abb. 8). Bereiche gleicher RFI erhalten den gleichen Farbton. Die niedrigsten RFI sind blau dargestellt, mit zunehmenden Intensitäten erfolgt ein Übergang über grün nach rot. Im 3D-Diagramm können kleinere Peaks verdeckt werden, weshalb im Folgenden die Fluoreszenzspektren meist als übersichtliche Kontur-Plots dargestellt werden. Sie erlauben eine schnelle Charakterisierung komplexer Fluorophorgemische. Einflüsse auf die Fluoreszenz einzelner Fluorophore können im Gesamtzusammenhang betrachtet werden. Überlagerungen und Verschiebungen von Fluoreszenzmaxima werden erkannt. Im Vergleich zu den Literaturwerten der reinen Substanzen verschiebt sich in der Mischung die Lage der Fluoreszenzmaxima durch Überlagerungen (z.B. von NADH und Pyridoxin).

Tab. 3: Exzitations- und Emissionswellenlängen biogener Fluorophore [24, 25]

Fluorophor	Exzitations- /Emissionswellenlänge [nm <sub>Ex</sub> /nm <sub>Em</sub> ]
FMN, FAD	365/520 , 450/530
NADH	340-363/435-470
NADPH	340/460
Pyridoxin	324/390
Tryptophan	287/348
Tyrosin	275/303
Phenylalanin	260/282

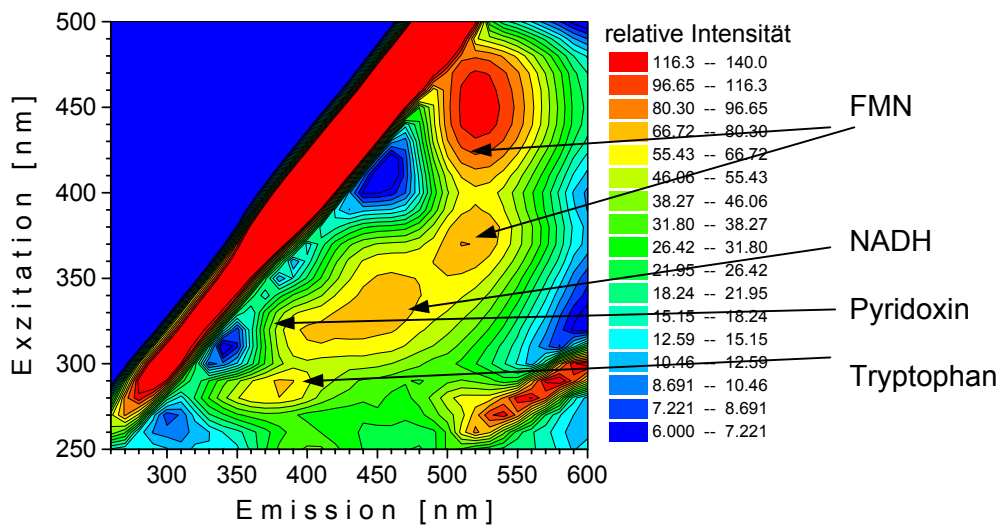


Abb. 7: 2-D-Fluoreszenzspektrum von  $3 \cdot 10^{-7}$  M Flavinmononucleotid (FMN),  $1 \cdot 10^{-6}$  M (L)-Tryptophan,  $1 \cdot 10^{-6}$  M Pyridoxin und  $1 \cdot 10^{-4}$  M Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) in einer Küvette gemessen (Hitachi F 4500).

In den 2-D-Fluoreszenzspektren fällt besonders die Rayleigh-Streuung als Diagonale gleicher Emissions- und Exzitationswellenlänge auf. Daneben taucht in Abb. 7 auch Streulicht bei der doppelten Emissionswellenlänge auf. Dies entsteht durch höhere Streuordnungen der in den Monochromatoren verwendeten Gitter.



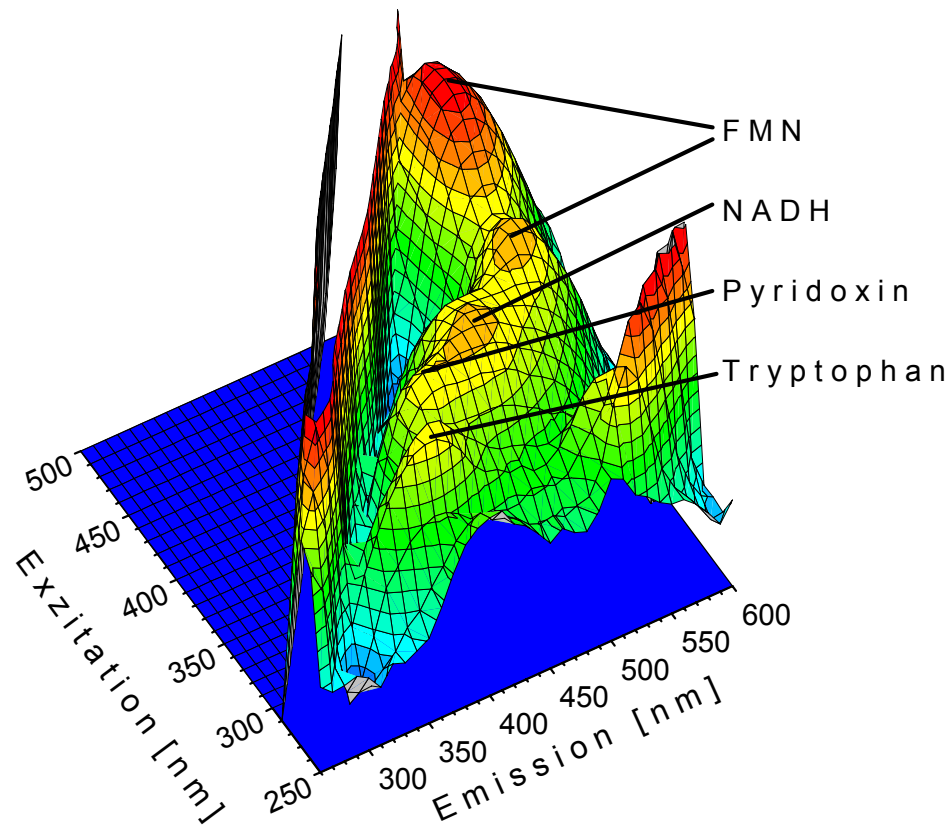


Abb. 8: 3-D-Darstellung von  $3 \cdot 10^{-7}$  M Flavinmononucleotid (FMN),  $1 \cdot 10^{-6}$  M (L)-Tryptophan,  $1 \cdot 10^{-6}$  M Pyridoxin und  $1 \cdot 10^{-4}$  M Nicotinamidadenindinucleotid (NADH)

Von den Aminosäuren weisen nur Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) eine ausgeprägte Fluoreszenz auf. Eingebunden in Proteinen ist meist nur noch die Tryptophanfluoreszenz detektierbar, die im Vergleich zur reinen Aminosäure zu geringeren Emissionswellenlängen (308-350 nm) verschoben ist [25]. Freie Aminosäuren haben eine höhere Fluoreszenz als in Proteinen gebundene, so dass bei der Lysis von Zellgewebe die RFI-Werte ansteigen können.

Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten können für jedes Wellenlängenpaar im zeitlichen Verlauf über die gesamte Fermentation dargestellt werden und ermöglichen eine Kontrolle über die Vorgänge im Fermenter. Zellwachstum und Änderungen im Metabolismus der Zellen werden erkennbar [17, 20].

#### 2.4.4. BioView-Sensor

Für die online-Messungen im Fermenter wird der BioView-Sensor (Delta Light & Optics) eingesetzt [26,27,28]. Bedingt durch den unterschiedlichen Aufbau der verwendeten Spektrometer und den verschiedenen Messbedingungen, unterscheiden sich die Spektren. Der BioView-Sensor verwendet keine Gitter, sondern Filtrerräder als Monochromatoren. Die Filterkombinationen werden so eingestellt, dass keine gleichen Emissions- und Exzitationswellenlängen gemessen und dadurch die Streulichtbanden verhindert werden.

In einem Medium wie Kartoffelfruchtwasser sind eine Vielzahl verschiedener Stoffe vorhanden, so dass die sichere Zuordnung der Peaks zu einzelnen Substanzen kaum möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit sind weniger absolute Werte sondern viel mehr die Veränderungen über die Zeit von Interesse. Wobei die Werte im Bereich der Flavine, NADH und Aminosäuren als Indikator für Stoffwechselaktivität und Zellwachstum dienen.

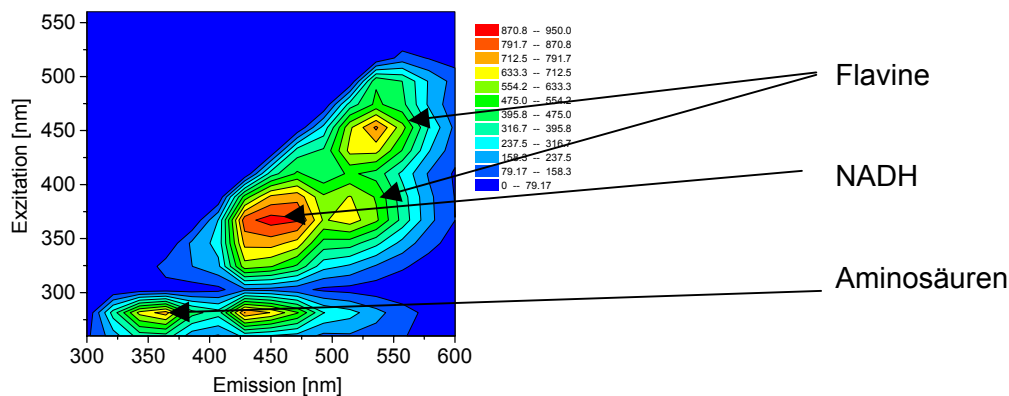


Abb. 9: Fluoreszenzspektrum (BioView-Sensor) in der stationären Phase einer Fermentation mit *Euglena gracilis*

Durch eine zeitliche Auflösung der Fluoreszenzmessungen werden Veränderungen im Verlauf der Fermentation erkennbar. Der Verlauf des Aminosäuresignals gibt einen Hinweis auf das Anwachsen der Biomasse und damit der Zelldichte, während das NADH- und Flavinsignal für die Stoffwechselaktivität steht.

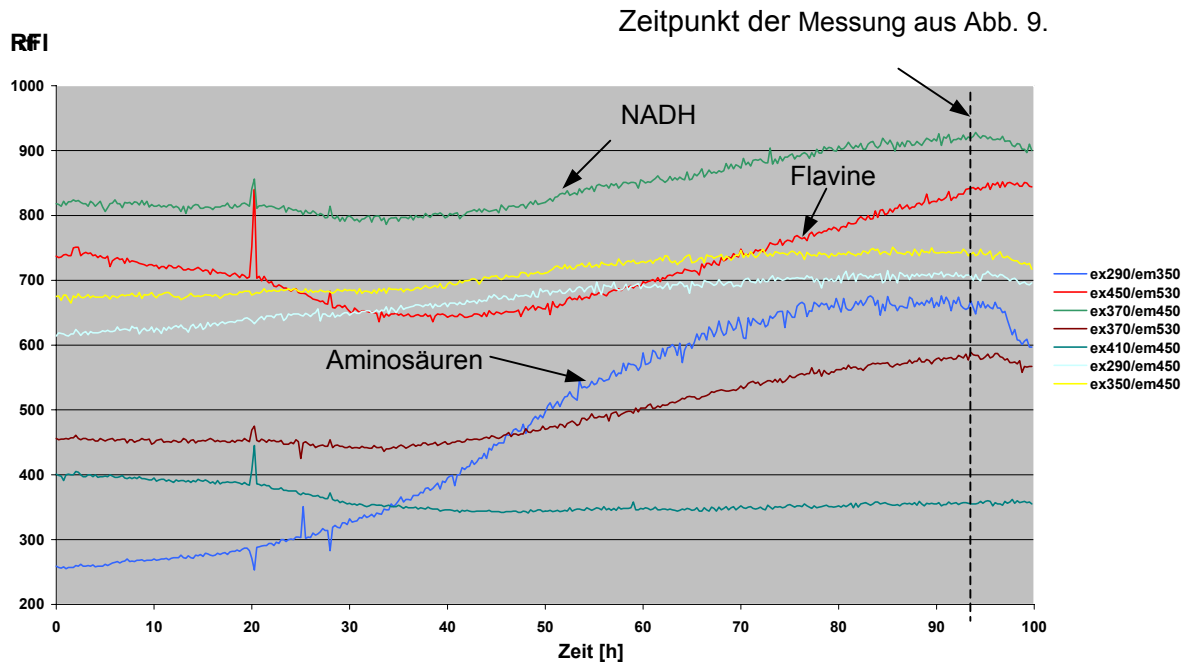


Abb. 10: Fluoreszenzverlauf über den gesamten Fermentationszeitraum

## 2.5. MALDI-Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie werden gasförmige Ionen mit unterschiedlichen physikalischen Techniken nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt. [29].

MALDI-Massenspektrometrie (engl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) ist ein Verfahren zur Ionisation von Molekülen. Es erwies sich seit seiner Entwicklung in den 80er Jahren als besonders effektiv für die Massenspektroskopie an großen Molekülen und Polymeren. Durch die hohe Empfindlichkeit und die Anwendbarkeit auf Makromoleküle und Komplexe ist die MALDI-MS insbesondere in der Biologie wie auch in vielen chemischen Analysen von Bedeutung.

MALDI beruht auf der Kokristallisation von Matrix und Analyt mit einem 100 - 100.000fachen molaren Überschuss an Matrix. Als Matrixsubstanzen werden kleine organische Moleküle - meist Benzoesäurederivate - gewählt, die bei der verwendeten Laserwellenlänge (z.B. Stickstoff-Laser bei 337 nm) Energie stark absorbieren. Mit kurzen, starken Laserimpulsen von 2-5 ns ( $10^6$ - $10^7$  W/cm<sup>2</sup>) erfolgt die energetische Anregung, die nach Relaxation im Kristallgitter zu explosionsartigen Teilchenablösungen an der Oberfläche des Kristalls führt. Durch die Verbindung mit der Matrix wird eine Fragmentierung von massereichen Molekülen verhindert.

Essentiell für eine MALDI-Messung ist die Probenpräparation und das Auftragen auf das Target. Der Ionisierungsmechanismus bei MALDI ist noch nicht vollständig geklärt (Abb. 11).

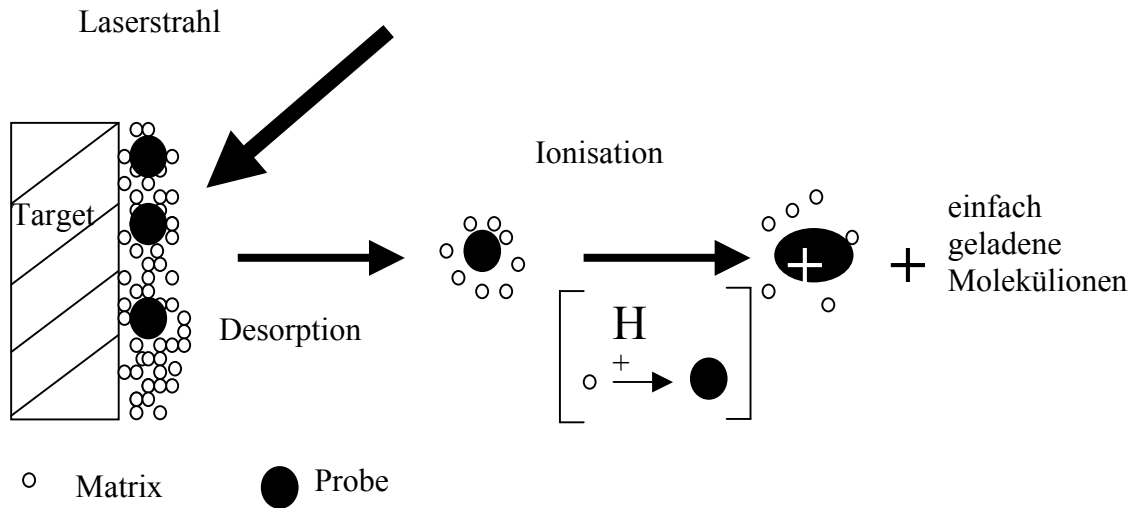


Abb. 11: Schematische Darstellung der Ionenbildung in einer MALDI-Ionenquelle [26]

Die Trennung und Detektion der Ionen erfolgt über ein Flugzeitmassenspektrometer (Time of flight, TOF). Als positive Ionen werden i.A. einfach geladene Ionen vom Typ  $M^+H^+$  oder  $M^+Na^+$  gebildet, mit geringerer Intensität sieht man evtl. auch zwei- oder dreifach geladenen Ionen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Fermentation

##### 3.1.1. Verwendeter Organismus

Für die Fermentation wird der Stamm 1224-5/25 *Euglena gracilis* Klebs der Sammlung für Algenkulturen Göttingen verwendet (SAG), die im phototrophen Zustand in Kulturröhrchen mit ca. 5 mL flüssiger Kultur geliefert werden. Die Kultur wird auf zwei 300 mL Kulturkolben mit 100 mL Nährlösung aufgeteilt und zur Stammhaltung nach den Vorgaben der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik der Universität Bielefeld eingesetzt [30].

Die frische, phototrophe Kultur wird in einer synthetischen Nährlösung unter heterotrophen Bedingungen bei 28 °C kultiviert und stellt innerhalb von einer Woche den Stoffwechsel entsprechend um. Das Chlorophyll der Zellen wird vollständig abgebaut, so dass sich die Färbung der Kulturlösung von grün zu gelblich verändert. Die gelbe Färbung wird durch Carotinoide verursacht [30, 31].

Auch nach Zeiträumen von mehreren Monaten unter heterotrophen Bedingungen können die Zellen bei ausreichendem Lichteinfall innerhalb weniger Stunden wieder Chlorophyll aufbauen und ihren Stoffwechsel umstellen.

##### 3.1.2. Stammhaltung von *Euglena gracilis*

Herstellung der Nährlösung für die Stammhaltung:

Die verschiedenen Bestandteile werden zum Teil als Stammlösungen angesetzt oder als Feststoff demineralisiertem Wasser zugesetzt [32]. Evtl. ausgefallene Stoffe gehen beim anschließenden Autoklavieren wieder dauerhaft in Lösung.

Tab. 4: Analyse der Nährlösung

pH-Wert	3,3
el. Leitfähigkeit	2800 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Gesamtstickstoff	1500 mg/L
Trockensubstanz	2,9 %

**Stammlösungen:**

Substanz	Konz. der Stammlösung	Zugabe zum Medium
1. Vitamin B1 (Thiamin)	10 mg / 100 mL	6 mL / L
2. Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	10 mg / 100 mL	0,5 mL / L
3. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	40 g / L	10 mL / L
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	14 g / L	10 mL / L
5. $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,1 g / L	10 mL / L
6. Stammlösung. aus verschiedenen Spurenelementen:		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1100 mg / L	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	580 mg / L	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	180 mg / L	
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	24 mg / L	⇒ 10 mL / L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	77 mg / L	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	29 mg / L	
$\text{NaNO}_3$	74 mg / L	
7. Feststoffe:		
$\text{MgCO}_3$	0,4 g / L	
Glucose	15 g / L	
Harnstoff	0,4 g / L	
L-Glutaminsäure	5 g / L	
L-Asparaginsäure	2 g / L	
L-Äpfelsäure	5 g / L	
Glycin	2,5 g / L	
Bernsteinsäure	0,1 g / L	
$\text{CaCO}_3$	0,1 g / L	

Für die Stammhaltung werden 5 mL Kulturlösung unter sterilen Bedingungen in 300 mL Kulturkolben mit 100 mL Medium gegeben. Die Kolben werden mit Silikonkappen (Sigma), die den Kolben abdichten aber einen sterilen Luftaustausch gewährleisten, verschlossen und in einem abgedunkelten Schüttelschrank (B. Braun Certomat) bei 28 °C und 120 rpm inkubiert. Die Kulturen werden in einem Rhythmus von 3 Tagen auf frisches Medium überimpft. Unter diesen Bedingungen erreichen die Kulturen eine Zelldichte von ca. 20 Mio. Z/mL und zeigen unter dem Mikroskop eine deutliche Mobilität.

Die Paramylonausbeute beträgt ca. 20 g/L und der Anteil des Paramylons an der Biotrockenmasse etwa 70 %.

Beim Überimpfen werden die lebenden Kulturen unter dem Mikroskop (Olympus BC 41) sowohl auf Zelldichte, Mobilität und Paramylongranula als auch auf Fremdorganismen wie z.B. Bakterien und Hefen untersucht.

Anhand der Beweglichkeit der lebenden Zellen lässt sich gut abschätzen, ob die Fermentationsbedingungen und das Medium geeignet sind. Bei guten Bedingungen zeigen die Zellen aktive Bewegung und ihre typische, zylindrische Form. Details der Zellen wie z.B. die Paramylonkörper aber auch Bakterien sind bei 400facher Vergrößerung und Phasenkontrast gut zu erkennen.

### 3.1.3. Zellzahlbestimmung

Als Messgröße  $x$  für die kinetische Betrachtung wird die Zellzahl unter der Voraussetzung gesunder und mit Paramylonkörpern gefüllter Zellen gewählt, worauf bei der täglichen, mikroskopischen Untersuchung der Fermentationsproben besonders geachtet wird. Bei anderen Messgrößen wie z.B. der optischen Dichte wird der Zustand der Zellen nicht in diesem Maße berücksichtigt.

$$\text{spez. Wachstumsrate} \quad \mu = \frac{\ln(x(t_2)/x(t_1))}{t_2 - t_1} \quad [\text{h}^{-1}]$$

$$\text{Verdopplungszeit} \quad \mu = \frac{\ln 2}{t_2 - t_1} = \frac{\ln 2}{t_D} \rightarrow t_D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [\text{h}]$$

Zur Bestimmung der Zellzahl werden Haemocytometer verwendet. Für *Euglena gracilis* sind Zählkammern des Typs Neubauer (improved) zu verwenden (Thoma optional). In Abb. 12a ist das Zählfeld schematisch dargestellt. Abb. 12b stellt einen Bildausschnitt dar. Die 9 Quadrate aus denen sich die Zählkammer zusammensetzt haben eine Fläche von je 1 mm<sup>2</sup> und die Höhe der Flüssigkeitsschicht in der Kammer beträgt 0,1 mm. Im mittleren Quadrat weist die Kammer eine feinere Rasterung mit einem Linienabstand von 50 µm auf.

Bei der Probenahme muss durch Schwenken des Kultur- oder Probengefäßes eine homogene Verteilung der Zellen erreicht werden. Mit einer sterilen Pipette wird aus dem Kultivierungsgefäß eine Probe entnommen (mind. 1000 µL) und in ein geeignetes Gefäß überführt. Für die Zellzählung und zur Aufnahme von Fotografien werden die Zellen mit Isopropanol abgetötet bzw. betäubt, da eine Zählung aufgrund der Bewegung bei aktiven Zellen unmöglich ist.

In einem Eppendorf Reaktionsgefäß werden hierfür 1000  $\mu\text{L}$  Probe mit 20  $\mu\text{L}$  Isopropanol versetzt und vermischt. Der Verdünnungseffekt ist dabei vernachlässigbar klein und die Bewegung der Zellen ausreichend eingeschränkt.

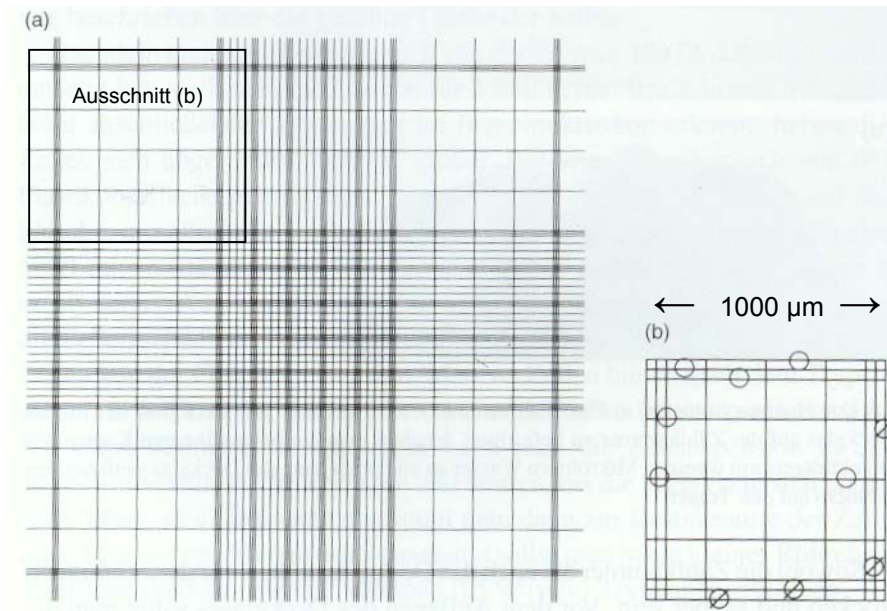


Abb. 12: Schematische Ansicht eines Neubauer Haemocytometers

Das leicht befeuchtete Deckglas wird auf die Zählkammer aufgelegt (anhauchen). 100  $\mu\text{L}$  der homogenen Probe werden auf das Haemocytometer aufgetragen, so dass lediglich die Zählfelder bedeckt sind (tritt Flüssigkeit in die Rillen muss die Zählkammer gesäubert und das Auftragen wiederholt werden).

Bei 100-facher Vergrößerung werden die Zählfelder unter dem Mikroskop ausgezählt. Gezählt werden alle Zellen, die sich innerhalb des Zählfeldes oder auf den Kanten zu den eng schraffierten Feldern befinden (siehe Abb. 12b). Bei hohen Zelldichten werden die Proben entsprechend verdünnt.

Das jeweils höchste und niedrigste Zählergebnis der vier Quadranten eines Zählbereichs wird gestrichen und die beiden restlichen addiert. Aus den Ergebnissen der beiden Zählbereiche einer Zählkammer wird der Mittelwert gebildet.

Das Ergebnis ist mit dem Faktor  $10^4$  zu multiplizieren und gibt die Zahl der Zellen je Milliliter an.



#### 3.1.4. Steriltest

Die Kulturen werden regelmäßig durch Ausplattieren auf Standard 1-Agar (Merck) auf Infektionen überprüft.

In 1 Liter demineralisiertem Wasser werden 36 g Standard-1 Agar durch Erwärmen gelöst und anschließend autoklaviert. Die noch heiße (ca. 60 °C) und flüssige Lösung wird unter einer sterilen Arbeitsbank auf sterile Petrischalen ausgegossen, so dass ein dünner, gleichmäßiger Film entsteht. Die Platten werden nach dem Abkühlen und Erstarren über Nacht in einen Brutschrank bei 37 °C inkubiert und infizierte Platten mit Koloniebildung ausgesondert. Danach können die Agarplatten in einem Plastikschauch verpackt werden und sind so einige Monate bei Raumtemperatur haltbar.

Für den Test der Kulturlösung wird unter einer Clean-Bench eine Animpföse aus Platin ausgeglüht und damit eine Probe aus dem Kulturkolben bzw. Probengefäß aufgenommen. Die Probe wird auf eine Petrischale mit Standard-1 Agar ausgestrichen und diese mit Parafilm versiegelt. Falls Zweifel bezüglich der Sterilität bestehen, werden 100 µL der Probe mit einer sterilen Pipette aufgetragen und ausplattiert.

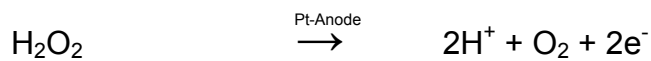
Die Schale wird im dunklen Brutschrank bei 37 °C über 24 Stunden inkubiert. Bakterien oder Hefen sind als deutliche Kolonien zu erkennen, während *Euglena gracilis* unter diesen Bedingungen keine oder nur sehr kleine Kolonien bildet.

Bei ausreichender Beleuchtung wächst *Euglena gracilis* auch auf Agar und kann bei Raumtemperatur als Dauerkultur gehalten werden. Die Zellen stellen ihren Stoffwechsel um und wachsen als phototrophe Kultur auf dem Agar.

Mit Parafilm versiegelte Platten bleiben so über Wochen als Reservekulturen verwendbar.

### 3.1.5. Bestimmung der Glukosekonzentration

Neben den online-Daten werden auch regelmäßig Proben genommen, die für die Glucosemessung und für die mikroskopische Untersuchung benötigt werden. Die Messungen der Glukosekonzentrationen erfolgen mit dem Biochemistry Analyzer (YSI 2700 Select, Fa. Yellow Springs Instruments). Die Messung mit diesem Gerät beruht auf der enzymatischen Oxidation von  $\beta$ -D-Glukose. Die auf einer Membran immobilisierte Glukoseoxidase setzt die enthaltene  $\beta$ -D-Glukose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid um. Über einen Stromfluss (Messung des Potentials des Wasserstoffperoxids an einer Platinelektrode) kann die Glukosekonzentration indirekt bestimmt werden.



Da die Biomasse die Kanüle des Gerätes verstopfen würde, wird der zellfreie Überstand nach einer Filtration zur Glucosemessung verwendet.

Die Messungen erfolgen im Bereich von 0 bis max. 20 g/L Glukose. Aufgrund der Anfangskonzentration an Glucose von bis zu 25 g/L werden die Probe vor der Messung 1/10 mit entmineralisiertem Wasser verdünnt. Bei der Messung wird gleichzeitig auch der Lactatgehalt gemessen, der bei der Fermentation von *Euglena gracilis* eigentlich keine Bedeutung hat. Die Bildung von Lactat kann unter den Versuchsbedingungen nur durch Fremdorganismen verursacht werden.

## 3.2. Kultivierung im Technikum Hannover

### 3.2.1. Aufbau der Laboranlage

Die Laboranlage besteht aus einem Biostat UD (B. Braun Biotech.) mit 30 L Arbeitsvolumen, der zur Datenaufnahme an das RISP-System angeschlossen ist (Real Time Integrating Software Platform, Inst. f. Techn. Chemie, Universität Hannover). Die Daten für u.a. pH-Wert, pO<sub>2</sub>, Rührerdrehzahl, Temperatur und die Abgaswerte für O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> werden alle 10 Sekunden aufgenommen und über einen Zeitraum von einer Minute gemittelt und kontinuierlich aufgezeichnet.

Im 30 L-Bioreaktor wird für Fluoreszenzmessungen in einen der seitlichen Ports ein Adapter mit einem Quarzglasfenster eingebaut, in den der Lichtleiter des Fluoreszenzspektrometers eingesetzt werden kann. Alle seitlichen Ports, über die Probenahme, Fluoreszenzmessungen, pH- und pO<sub>2</sub>-Messungen erfolgen, sind nebeneinander in der gleichen Höhe des Fermenters angebracht.

Die Reaktoren werden mit einem Temperaturfühler (Pt-100), einer pH-Elektrode (Broadley-James) und einer Sauerstoffelektrode (Mettler-Toledo) zur Prozessüberwachung ausgestattet. Die pH-Elektrode wird jeweils vor dem Autoklavieren mit entsprechenden Pufferlösungen kalibriert. Die pO<sub>2</sub>-Elektrode wird nach der Sterilisation des Fermenters zunächst an die Steuereinheit angeschlossen. Nach der 6-stündigen Polarisationszeit wird die Kalibrierung der pO<sub>2</sub>-Elektrode durchgeführt. Der Abgasstrom wird über das Verteilersystem Mux-100 (Hartmann & Braun) zum Abgasanalysegerät EGAS 2 mit kombiniertem CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Analysator (URAS 14 + O<sub>2</sub> B. Braun) geführt. Die detektierten Daten werden ebenfalls vom RISP-System aufgezeichnet und zur Prozesskontrolle verwendet.

Weiterhin ist ein 2-D-Fluoreszenzspektrometer (BioView-Sensor, DELTA Light & Optics) und bei einigen Fermentationen auch ein Insitu-Mikroskop angeschlossen

Die Belüftung erfolgt mit Pressluft, die über Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm (Pall) in der Zu- und Abluftstrecke gefiltert wird.

Zur Sterilisation der Anlage werden alle Messelektroden/Sonden eingebaut und die Sterilfilter in die Belüftungseinheit eingesetzt. Der Fermenter wird mit Medium und 15 mL Antischaumzusatz (Siliconpolymer) gefüllt und über den Heizmantel für 20 Minuten auf 121 °C erhitzt.

Die Sterilisation wird von der Steuereinheit automatisch geregelt und überwacht. Der Fermenter wird anschließend auf 28 °C abgekühlt und die Messelektroden angeschlossen.

Nach der Kalibration der Sauerstoffsensoren wird die Anlage auf die Fermentationsbedingungen mit einer Begasungsrate von  $0,5 \text{ V/V}_m$  und Rührerdrehzahl von 100 RPM eingestellt und vor dem Animpfen zur Überprüfung der Sterilität über 24 Stunden betrieben.

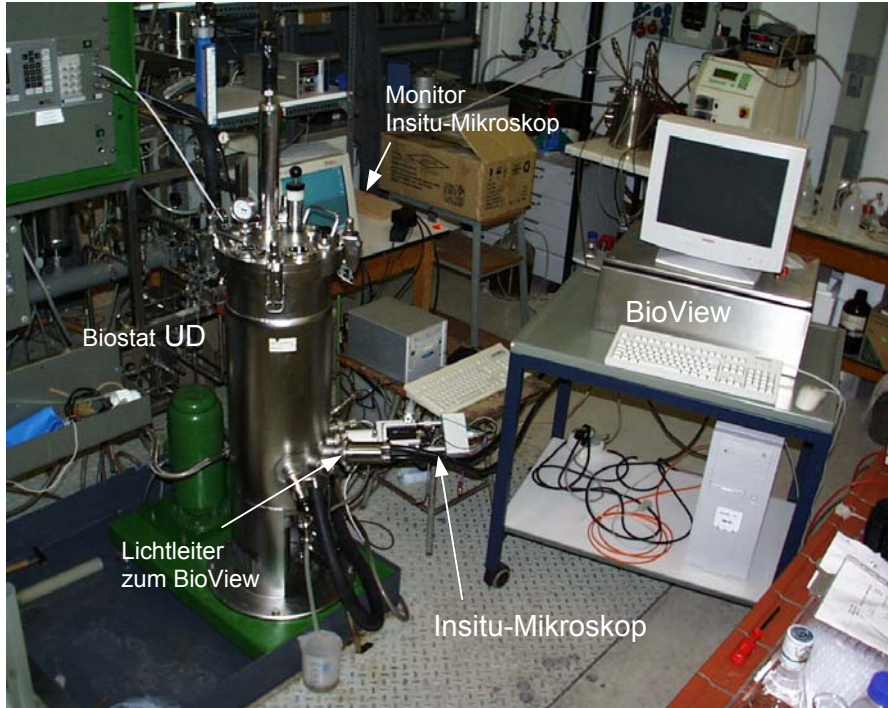


Abb. 13: Aufbau der 30 Liter-Laboranlage

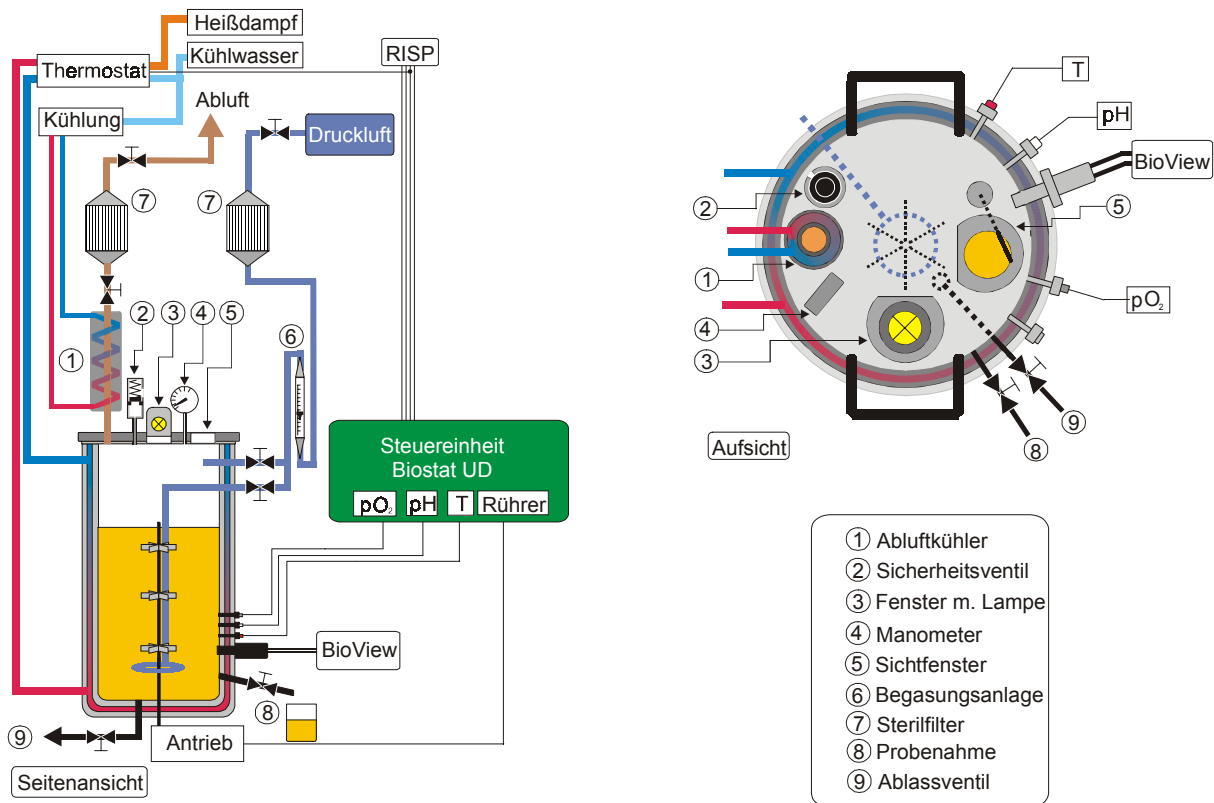


Abb. 14: Skizze der Laboranlage

Für einige Versuche wird auch ein Biostat C mit 10 L Arbeitsvolumen eingesetzt, um mit geringerem Medienvolumen und höheren Animpfdichten arbeiten zu können. Die Messausrüstung und Anordnung der Stutzen ist identisch mit dem Biostat UD.

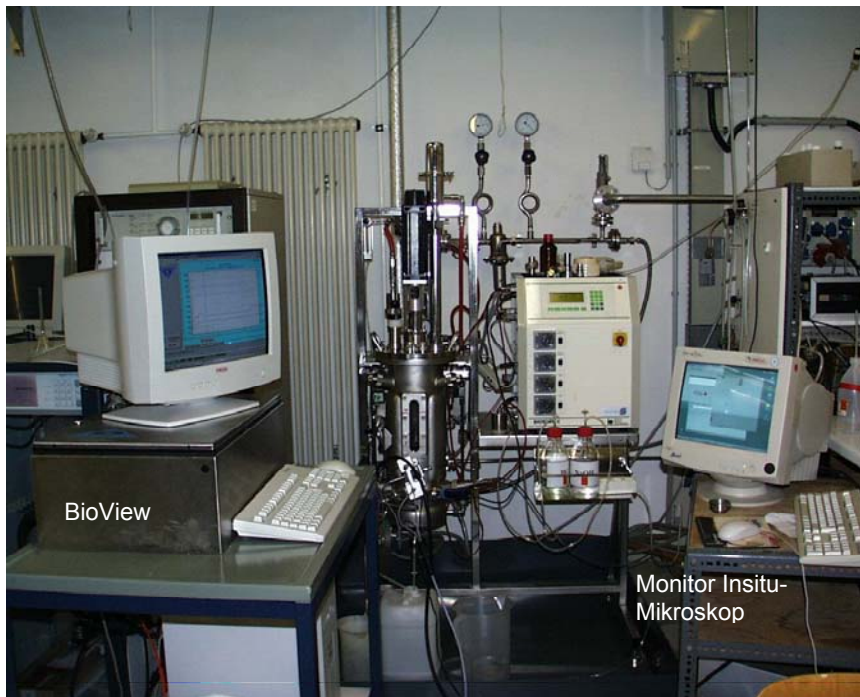


Abb. 15: Aufbau der Versuchsanlage mit Biostat C

### 3.2.2. BioView-Sensor

Als Fluoreszenzmessgerät wird ein BioView-Sensor (DELTA Light & Optics) verwendet, der die Aufnahme eines kompletten Spektrums in weniger als einer Minute ermöglicht. Der BioView-Sensor ist speziell für industrielle Anwendungen geeignet und durch eine Edelstahlbox gegen Erschütterungen sowie Feuchtigkeit geschützt. Zwei Filterräder mit je 16 Filtern werden zur Auswahl der Exzitations- und Emissionswellenlängen verwendet, woraus ein zweidimensionales Fluoreszenzspektrum resultiert. Der Messbereich reicht von 270 nm bis 550 nm für Exzitations- und von 310 nm bis 590 nm für Emissionswellenlängen.

Durch die Aufnahme eines gesamten 2-D-Fluoreszenzspektrums werden 150 Messpunkte je Spektrum erfasst. Der experimentelle Aufbau für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Die Messungen der relativen Kulturfluoreszenz erfolgen in-situ über einen Lichtleiter und einen Adapter im Bioreaktor, der das Medium und den Lichtleiter durch eine Quarzglasscheibe trennt.

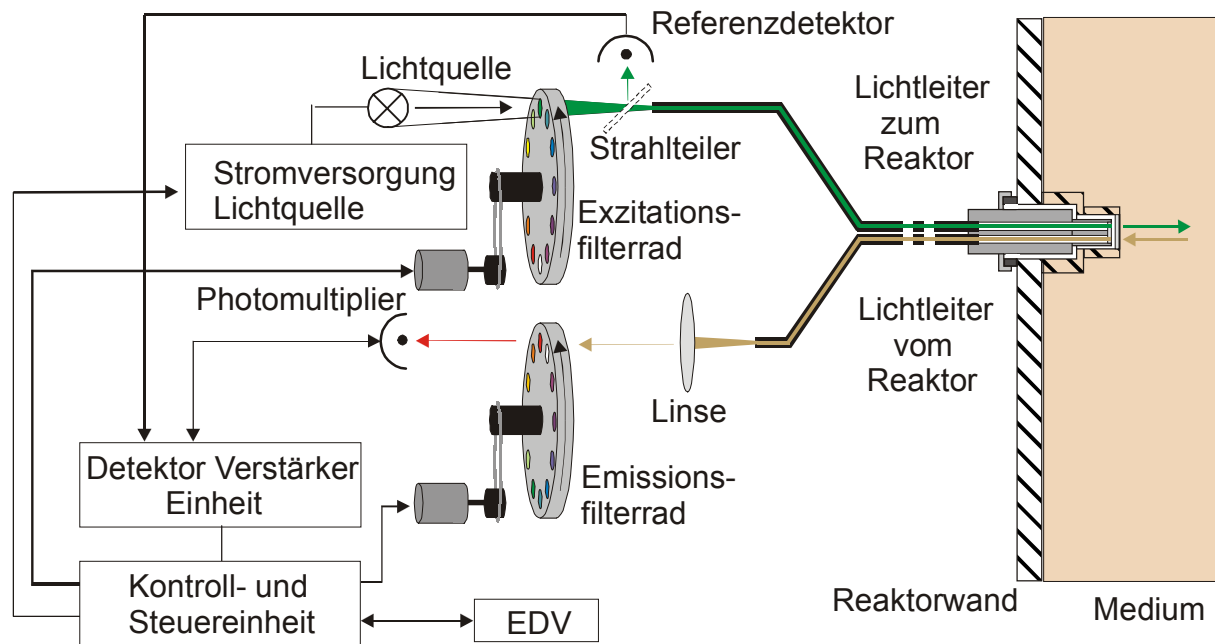


Abb.16: Skizze der BioView-Anordnung

Die Auswahl der Wellenlänge des Exzitationslichtes erfolgt beim BioView-Sensor über Schmalband-Interferenzfilter mit einer Bandbreite von 20 nm, wobei eine Xenon-Blitzlichtlampe als Lichtquelle dient. Das Exzitationslicht wird über einen Lichtleiter des zweiarmigen Flüssiglichtleiters (Lumatec) zum Bioreaktor geführt und das emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über den zweiten Lichtleiter zurück zum BioView-Sensor. Die Detektion des Emissionslichtes erfolgt über Interferenzfilter und einen Photomultiplier. Die Messungen und die Datenaufnahme werden von einem Computer gesteuert.

Die Filter für das Exzitations- und Emissionslicht können beim BioView-Sensor unabhängig voneinander ausgewählt werden. Zusätzlich kann sowohl bei der Exzitation als auch bei der Emission ein Neutraldichtefilter (nd-Filter, Neutralfilter) verwendet werden.

Für einige Offline-Messungen wird das Fluoreszenzspektrometer F-4500 (Hitachi) verwendet, das zwei Gittermonochromatoren mit wählbarer Spaltbreite besitzt, so dass die Wellenlängen von Exzitation und Emission unabhängig voneinander eingestellt werden können. Die Bandbreite der Wellenlängen ist ebenfalls frei wählbar, als Lichtquelle dient eine Xenonlampe. Die Detektion des Emissionslichtes erfolgt über einen Gittermonochromator und Photomultiplier.

Für Offline-Messungen von Kultivierungsproben werden Küvetten aus Quarzglas (10 mm, Fa. Hellma) verwendet, die quer zum Anregungslicht in das Fluoreszenzspektrometer eingesetzt werden.

Für die Küvetten-Messungen werden die in Tabelle 5 angegebenen Einstellungen gewählt.

Tabelle 5: Einstellungen des F-4500

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Exzitationswellenlänge	250 – 550 nm
Emissionswellenlänge	260 – 600 nm
Schrittweite der Ex-/Em-Wellenlänge	10 / 10 nm
Bandbreite der Ex-/Em-Wellenlänge	10 / 20 nm
Photomultiplierspannung	700 Volt
Scan-Geschwindigkeit	12.000 nm/min

Ausführliche Beschreibungen zu den Spektrometern und Fluoreszenzspektren finden sich bei Marose [17] und Lindemann [20].

### 3.2.3. Insitu-Mikroskop

Obwohl der Verlauf einer Fermentation über die RISP-Daten und den BioView-Sensor verfolgt werden kann, ist es gerade bei einem großen Organismus wie *Euglena gracilis* von Vorteil auch die Physiologie der Zellen zu betrachten. Zu diesem Zweck wird das Insitu-Mikroskop eingesetzt, das am Institut für Technische Chemie entwickelt wurde [33]. Das Insitu-Mikroskop wird über einen Standardport in den Reaktor eingebaut und sterilisiert. Über eine CCD-Kamera kann dann in den Reaktor hineingeschaut und Bilder bzw. Videosequenzen aufgenommen werden [34]. Das Gerät liefert ein schwarz-weiß Bild mit 400facher Vergrößerung auf dem alle Details der Organismen zu erkennen sind.

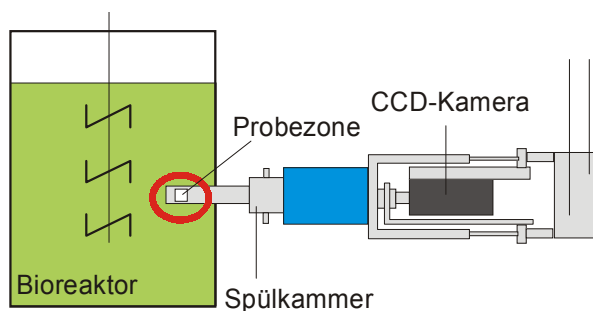


Abb. 17a: Skizze des Insitu-Mikroskops

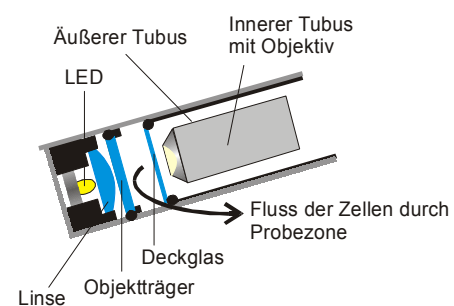


Abb. 17b: Detailansicht der Probezone

Die Hülse der Probenzone ist im vorderen Bereich über einen O-Ring zum Bioreaktor abgedichtet, so dass sie falls nötig zur Reinigung in eine Spülkammer zurückgezogen werden kann, ohne die Sterilität der Anlage zu gefährden.

Die Reinigung erfolgt durch Isopropanol und anschließende Sterilisation mit Heißdampf. Die Probezone wird für die Beobachtung von *Euglena gracilis* auf eine Höhe von 30  $\mu\text{m}$  geschlossen, da die ausgesprochen aktiven Zellen sonst nicht in dem fokussierten Bereich zu halten sind.

Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass die Probezone außerhalb der Messungen weit geöffnet und gut durchspült wird, da die Zellen sonst anwachsen können.





Abb.18: Detailansicht der Laboranlage mit dem Insitu-Mikroskop

Im Gegensatz zu den normalen Mikroskopaufnahmen, bei denen die Zellen mit Isopropanol abgetötet werden, kann es bei diesen Aufnahmen zu Bewegungsunschärfe durch die Eigenbewegung des Organismus kommen.

Die Probezone wird soweit geschlossen, dass keine nennenswerte Strömung besteht und die Bewegungen und das Verhalten des Organismus ohne Störungen beobachtet werden kann. Im Fall einer bakteriellen Infektion sind die einzelnen Keime vor allem durch ihre Bewegung zu erkennen. Die Live-Bilder auf dem Monitor sind daher erheblich besser zu bewerten als die einzelnen Fotos.

Das Auflösungsvermögen der Optik ist auch ohne Phasenkontrast ausreichend, um Details in den Zellen und im Fall einer Infektion die Bakterien zu sehen.

### **3.3. Eingesetzte Kulturmedien**

#### **3.3.1. Kultivierung in einem Medium auf Basis von Kartoffelfruchtwasser**

Auf Grundlage vorhergehender Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Bielefeld wird als Basis für das Kulturmedium Kartoffelfruchtwasser der Emsland-Stärke GmbH verwendet, das nach der Eiweißfällung (eKFW) entnommen wird [31]. Das eKFW wird im Werk in Emlichheim abgefüllt und nach Hannover transportiert. Das Kartoffelfruchtwasser wird bei  $-18\text{ °C}$  gelagert und bei Bedarf im Kühlraum bei  $4\text{ °C}$  aufgetaut, da es sonst schnell verkeimen würde.

Für die Fermentation wird das eKFW autoklaviert und das ausfallende Restprotein durch eine Mikrofiltration entfernt, wobei einige für *Euglena* wachstumshemmende Substanzen mit entfernt werden. Ohne diese Behandlung wird nur geringes Zellwachstum erreicht, was vermutlich auf die Alkaloide Solanin, Chakonin und andere Substanzen zurückzuführen ist, mit denen sich die Kartoffelknolle gegen mikrobiellen Befall schützt.

Üblicherweise wird zur Medienverdünnung demineralisiertes Wasser verwendet. Da dies im Technikum der Emsland-Stärke nicht in den benötigten Mengen zur Verfügung steht bzw. für den Prozess unnötige Kosten verursachen würde, wird bei diesem Prozess Leitungswasser verwendet. Durch Verdünnung auf 40 % und Zugabe von 20 g/L Glucose wird das Medium für die Fermentation von *Euglena gracilis* konditioniert.

Mit diesem Medium werden bei reinem Batch-Betrieb die besten Ergebnisse auf Kartoffelfruchtwasserbasis in Bezug auf Zellwachstum und Paramylonausbeute erreicht. Über einen Zeitraum von mehreren Monaten wird eine Kultur von *Euglena gracilis* wie die Stammkultur unter heterotrophen Bedingungen mit diesem Medium im Kulturkolben gehalten, ohne dass Mangel- bzw. Degenerationserscheinungen auftreten.

Tab. 6: Analyse des eKFW-Medium

pH-Wert	5,5
el. Leitfähigkeit	5050 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Gesamtstickstoff	700 mg/L
Trockensubstanz	2,7 %

Als Inokulum für den Laborfermenter werden 3 x 300 mL eKFW-Medium in 1000 ml Kulturkolben mit 50 mL Stammkultur angeimpft und 3 Tage im Schüttelschrank inkubiert. Unter dem Mikroskop und durch Ausplattieren auf Standard 1-Agar werden die Kulturen auf Infektionen überprüft. Die Zelldichte liegt im Bereich von ca. 7-9 Mio. Z/mL und die Aktivität der Zellen ist vergleichbar mit den Kulturen in der Nährlösung.

Anschließend werden die Vorkulturen in einem sterilen Kolben mit Animpfkanüle vereinigt und der mit 20 L Medium gefüllte Bioreaktor über ein steriles Septum angeimpft. Die Zelldichte im Fermenter beträgt dabei ca. 300 000 – 400 000 Z/mL.

Bei 150 U/min und einer Belüftung von 10 L/min (0,5  $V/V_m$ ) werden die Fermentationen über einen Zeitraum von 4 Tagen betrieben und erreichen wie im Kulturkolben etwa 9 Mio. Z/mL. Die Verdopplungszeit beträgt 16 Stunden bei einer Lag-Phase von etwa 12 Stunden. Die Produktausbeute liegt bei 8-9 g/L und das Verhältnis von Produkt zu BTM beträgt 70 %.

### **3.3.2. Fermentation mit Medium auf Basis von Potato Protein Liquor**

Da die Produktion von Kartoffelstärke im Kampagnebetrieb abläuft, steht das Kartoffelfruchtwasser nur in der Zeit von August bis Januar zur Verfügung. Um auch in anderen Zeiträumen arbeiten zu können, werden Versuche mit dem Konzentrat Potato Protein Liquor (PPL) unternommen. Dieses Konzentrat wird im Werk Emlichheim durch Eindampfen des Kartoffelfruchtwassers gewonnen.

In Vorversuchen hat sich eine Lösung aus 2 % PPL in Leitungswasser mit 20 g/L Glucose als Alternative zum eKFW erwiesen. Aufgrund der enthaltenen Faserstoffe und anderer Verunreinigungen wird auch dieses Medium durch Mikrofiltration gereinigt. Die Kultivierung in der Vorkultur und im Biostat erfolgt wie beim eKFW.

### **3.4. Zellaufschluss und Aufarbeitung**

Die Kulturlösung aus der Fermentation wird mit einer Durchflusszentrifuge (Heraeus Biofuge 28 RS) bei einer RZB von 500g aufkonzentriert. Aufgrund von Größe und Gewicht der Zellen sind höhere Beschleunigungen nicht notwendig. Die Zellen sedimentieren vollständig ab und der Bodensatz in der Zentrifuge lässt sich noch leicht aus dem Rotor entfernen. Bei höheren Werten verfestigt sich das Pellet und ist erheblich schwieriger aus dem Rotor bzw. aus den Zentrifugenbechern zu entfernen. Das Zentrifugat wird soweit notwendig zu einer fließfähigen Suspension verdünnt und mit einer Ultraschallsonde (B. Braun Labsonic U mit Standardsonde 5T) bei 300 W in einer 300 mL Rosettenzelle aufgeschlossen. Nach 10 Minuten beträgt der Aufschlussgrad nahezu 100 %. Vereinzelt intakte Zellen bleiben auch bei längerer Anwendung erhalten. Die Suspension wird abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3S) und das Rohzentrifugat für die weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Für die Zentrifugation der Paramylonkörper sind höhere Beschleunigungswerte von 1000 g notwendig. Auch in diesem Fall führt eine weitere Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung nur zu einer Verfestigung des Zentrifugenpellets.

### **3.4.1. Aufarbeitung mit Natriumdodecylsulfat (SDS)**

Paramylon ist auch in heißem Wasser nahezu unlöslich, so dass proteinhaltige Zellreste und Lipide mit dem Tensid Natriumdodecylsulfat (Laurylsulfat) ausgewaschen werden können, ohne dabei Produkt zu verlieren. Reststärke und Pflanzenfasern aus dem Medium werden dabei ebenfalls entfernt.

Das Rohzentrifugat wird mit der zehnfachen Menge 1 % SDS-Lösung resuspendiert und 2-3 Stunden auf 100 °C erhitzt. Die Suspension wird zentrifugiert, dekantiert und mit dest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt und bei anhaltender, gelblicher Verfärbung durch einen Reinigungsschritt mit Aceton ergänzt, um die Carotinoide zu entfernen.

Bei 100 °C wird im Trockenschrank über 48 Stunden getrocknet und die zum Teil sehr festen Pellets aus der Zentrifuge im Mörser zu Pulver gemahlen.

Das Produkt ist ein weißes, stärkeähnliches Pulver. Paramylon ist in Wasser und den meisten Lösungsmitteln außer Dimethylsulfoxid (DMSO) unlöslich.

### **3.4.2. Enzymatische Extraktion mit Proteasen**

Alternativ zum Tensid wird auch eine enzymatische Aufarbeitung mit der Protease Alkalase (Novozyme) durchgeführt.

Die aufgeschlossene Zellsuspension wird bei einer RZB von 1000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 2 % Alkalaselösung suspendiert und 3 Stunden bei 50 °C temperiert. Die Reinigung erfolgt wie bei der SDS-Aufarbeitung. Falls noch immer Verunreinigungen enthalten sind, kann die Behandlung mit Alkalase wiederholt werden. Die Produktqualität unterscheidet sich nicht von der Aufarbeitung mit SDS.

### 3.5. Fermentation im Technikum Emlichheim

Für die Verwendung als Fermentationsmedium bestehen drei Entnahmemöglichkeiten im Wasserkreislauf der Emsland-Stärke GmbH (siehe auch Anhang).

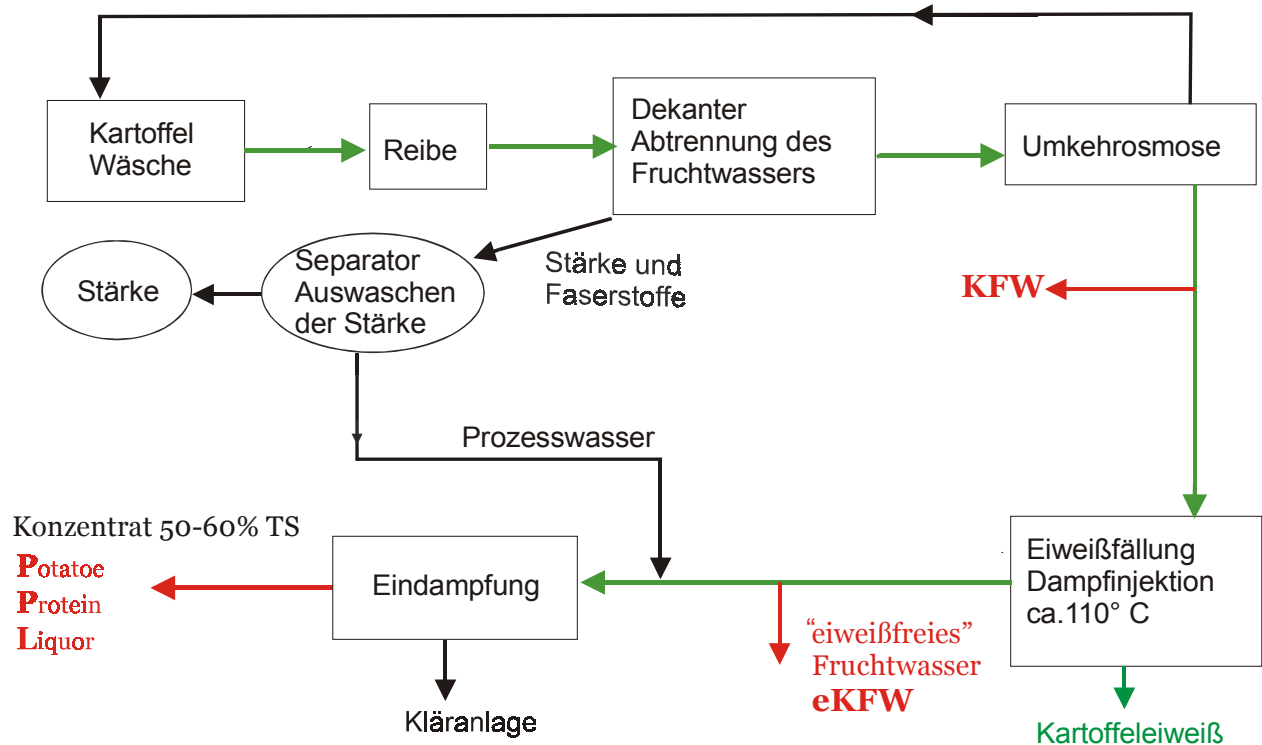


Abb. 19: Fließschema der Stärkeproduktion mit den verschiedenen Basismedien

Das Kartoffelfruchtwasser (KFW) nach der Umkehrosmose enthält noch die gesamte Eiweißfracht und ist nicht weiter thermisch behandelt. Vitamine und sonstige Begleitstoffe aber auch wachstumshemmende Substanzen sind unverändert enthalten.

In der Eiweißfällung wird durch Dampf-injektion eine Temperatur von ca. 110 °C erreicht, wodurch ein großer Teil der Proteine denaturiert und ausgefällt wird. Das hier entnommene eKFW lässt sich erheblich leichter filtrieren, obwohl es noch nicht eiweißfrei ist. Dies wird für die Fermentation durch eine Ultrafiltration bzw. Proteinfällung bei 121 °C erreicht.

Alle vorhergehenden Untersuchungen der Uni Bielefeld wurden mit eKFW als Basis durchgeführt.

Während Hefen und Bakterien problemlos in reinem Kartoffelfruchtwasser wachsen, sterben *Euglena* Zellen ab bzw. stellen das Wachstum ein.

Ohne eine weitere Behandlung sind diese Medien für *Euglena gracilis* nicht einsetzbar. Auch das eKFW muss noch vom Resteiweiß befreit werden bevor es als Medium eingesetzt werden kann.

Weiterhin besteht noch die Möglichkeit das Konzentrat Potato Protein Liquor (PPL) zu verwenden, das durch Eindampfen einer Mischung aus Kartoffelfruchtwassers und Prozesswasser auf eine Trockensubstanz von ca. 60 % gewonnen wird.

### 3.5.1. Pilotanlage Emlichheim

Der Pilotfermenter wurde 1985 als 5000 L Blasensäule (Airliftreaktor) mit Außenschlaufe zur Gewinnung von Single Cell Protein und Industrialkohol aus *Saccharomyces cerevisiae* gebaut [35, 36] und besteht aus 3 zylindrischen Rohren, Entgasungsdom und austauschbaren Anströmboden, die mittels Flanschverbindungen verbunden sind. Die Außenschlaufe mit ca. 1000 L Inhalt wird nicht mehr verwendet und abgebaut. Aufgrund der einfachen Bauweise ohne bewegliche Teile (Rührer) ist dieser Reaktortyp gut für große Volumina geeignet, weniger wartungsintensiv und preisgünstiger [37, 38].

Die Belüftung erfolgt wahlweise über eine Düse mit darüber liegender Siebplatte bzw. durch einen Rundboden mit Begasungsring.

Da die Anlage im Belüftungsboden keinen Heizmantel aufweist, wird dieser Bereich mit elektrischen Heizbändern beheizt. Die Probenahme erfolgt durch ein Drehschieber/Kugelventil am Reaktorboden, das über eine Heißdampfleitung gespült und sterilisiert werden kann. Inwieweit dieses Ventil ein langfristiges Einwachsen von Fremdkeimen verhindern kann, ist fraglich.

Tab. 7: Technische Daten des Fermenters

Höhe	Durchmesser	Wandstärke	Inhalt	zul. Druck	Betriebsdruck
9172 mm	702 mm – 990 mm	5 mm	4000 L	1,5 bar	0,3 bar

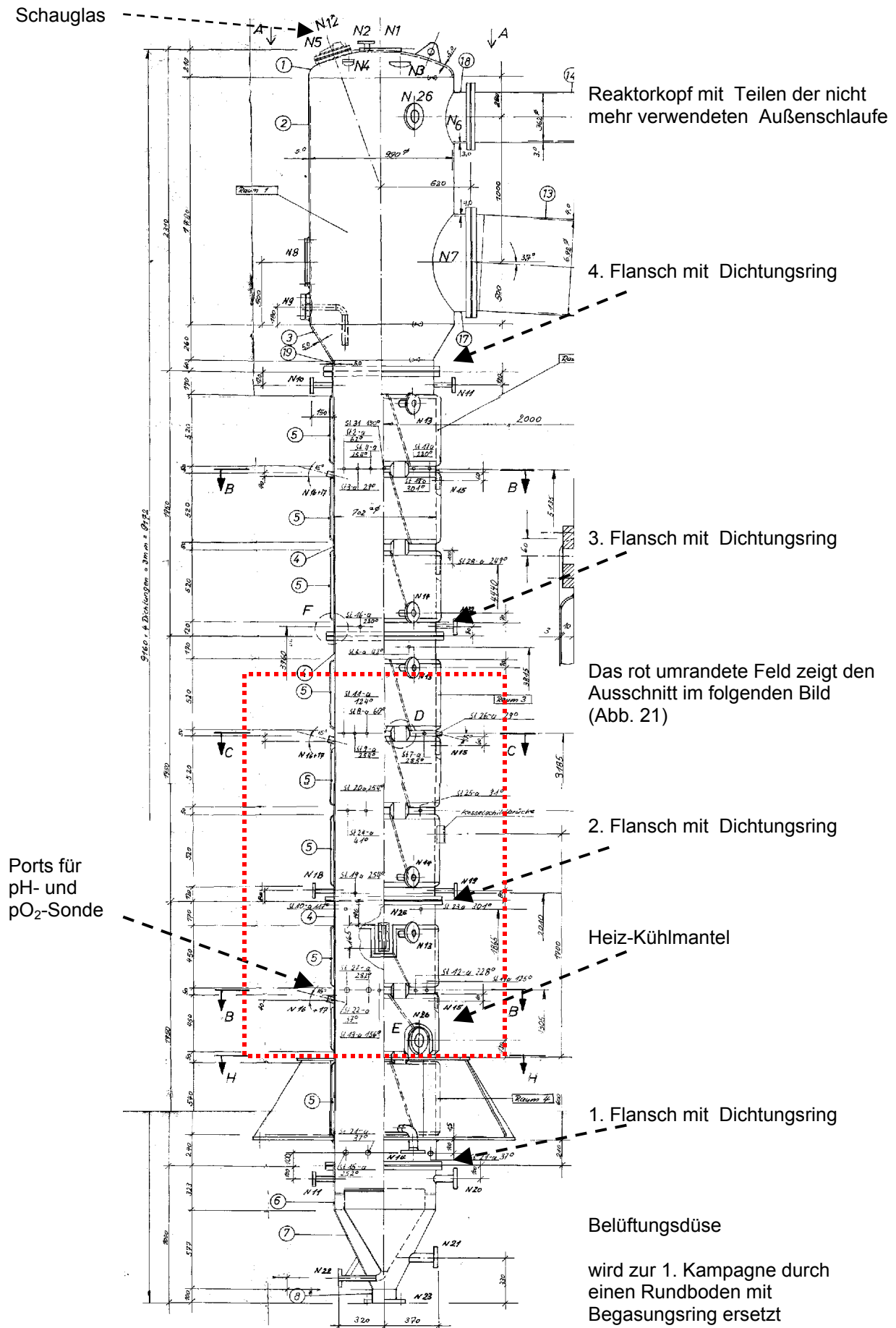


Abb. 20: Skizze des Fermenters mit Belüftungsdüse

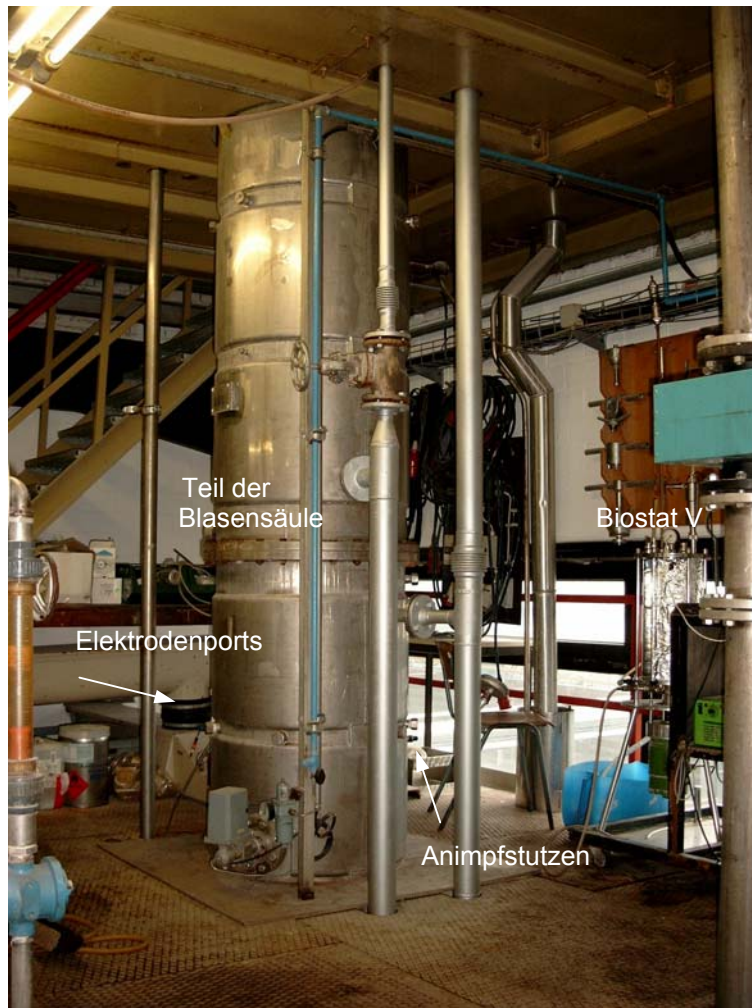


Abb. 21: Blick auf die 1. Arbeitsebene der Pilotanlage

Als Inokulum für die Pilotanlage dient ein Biostat V-Reaktor mit 10 L Arbeitsvolumen. Der Glaszylinder wird für die heterotrophe Fermentation mit Alufolie lichtdicht verkleidet.

Die Fermentationsbedingungen werden wie beim Laborverfahren auf 28 °C, 100 U/min und 0,5 V/V<sub>m</sub> eingestellt.

Der Biostat-Reaktor ist mit einem Temperaturfühler und pH-Elektrode ausgestattet. Eine pO<sub>2</sub>-Elektrode und Abgasanalytik ist nicht vorhanden. Dieser Fermenter wird nicht nur als Inokulum für den Pilotfermenter, sondern auch für Untersuchungen zu Mediumzusammensetzung und Kultivierungsbedingungen verwendet.

Zum Animpfen der Pilotanlage wird über sterile Septen und Animpfkanülen eine Schlauchleitung gelegt. Die Abgasleitung des Biostat V wird geschlossen wodurch der Druck im Biostat ansteigt. Wenn der Gegendruck im Fermenter von 0,3 bar erreicht ist, wird die Schlauchleitung geöffnet und die Kultur aus dem Biostat in den Fermenter gepumpt.



Als Startkultur werden 200 L Medium angesetzt und in den sterilen Fermenter gepumpt. Das Animpfverhältnis mit dem Biostat V als Inokulum beträgt etwa 1/20 und die Startzelldichte bei den üblichen Zelldichten von 6 Mio. Z/mL beträgt etwa 250 000 – 300 000 Z/mL. Aufgefüllt wird der Fermenter, wenn die 200 L Startkultur auf eine Zelldichte von mindestens 4 Mio. Z/ml angewachsen ist. In der Praxis war der Fermenter zu diesem Zeitpunkt schon durch Fremdkeime kontaminiert.

Ein direktes Animpfen des vollständig aufgefüllten Fermenters ist mit dem Inokulum von 10 L nicht sinnvoll, da die Zelldichte zu gering und die Lag-Phase zu lange dauern würde.

### 3.5.2. Belüftung der Anlage

Der Fermenter wurde ursprünglich für die Fermentation von Hefen und daher auch für entsprechen hohe Belüftungsraten von über 150 Nm<sup>3</sup>/h ausgelegt. Die kleinste Flussrate, die am Manometer der Anlage ablesbar ist, beträgt 10 Nm<sup>3</sup>/h.

Für die Kultivierung von *Euglena gracilis* werden nicht mehr als 10 Nm<sup>3</sup>/h benötigt, so dass die Belüftung mit dem Ringbegaser durchgeführt wird. Mit der Begasungsdüse besteht die Möglichkeit, das Medium aufgrund des geringen Gegendrucks in die Leitung zurückfließen könnte. Eine Rückschlagklappe und ein Drehschieberventil ca. 2 m vor dem Fermenter verhindern das weitere Zurückfließen des Mediums in die Luftleitung.

Die Belüftung der Anlage erfolgt mit einem Trockenläuferkompressor, der ölfreie Pressluft liefert. Über einen Druckminderer wird ein Vordruck von 4 bar für die Normblende eingestellt. Mit 2 Vorfilter von 25 und 5 µm Porenweite werden Staub- und sonstige Partikel entfernt. Der Sterilfilter ist ein Oberflächenfilter aus dichtgepacktem Flies (Ultrafilter). Im Lauf der Arbeiten tauchen ständige Sterilitätsprobleme auf, die laut Herstellerangabe an der zu geringen Strömungsbelastung des Filters bei der geringen Begasungsrate liegen. Daher wird in der 2. Projektkampagne ein kleineres Filterelement mit einer definierten Porenweite von 0,2 µm (Pall) eingesetzt.

Der Druck im Fermenter wird über das Kopfdruckventil auf 0,3 bar während des Betriebs eingestellt, wodurch ein Einwachsen von Fremdkeimen verhindert werden soll. Die Abluft wird durch eine auf 121 °C beheizte Strecke geführt, die ein Wandwachstum in den Fermenter hinein unterdrückt. Ein Teil der Abluft kann über eine Abzweigung zur O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> - Abgasanalytik geleitet werden (Uras 3 G und Magnos 3, Hartmann und Braun).

### 3.5.3. Sterilisation der Anlage

Das Substrat Kartoffelfruchtwasser wird in einem Vorlagebehälter verdünnt mit Glucose vermischt und über eine Mohnpumpe in den Fermenter befördert. Die Sterilisation erfolgt anfangs in einer Heizwendel durch Dampfneinjektion.

Die Temperatur in der 13 m langen Heizstrecke beträgt ca. 140 °C und die Verweilzeit bei den üblichen Durchflussraten von 200 L/h etwa 4 Minuten. Das heiße Medium wird über einen Plattenwärmetauscher auf ca. 30 °C abgekühlt und gelangt so in den Fermenter. Das Medium kann über einen 3-Wege Hahn vor dem Wärmetauscher zurück in den Vorlagebehälter geführt werden. In dieser Stellung wird es im Kreislauf gefahren, bis die notwendige Sterilisationstemperatur erreicht ist. Beim Umschalten kann es zum Druck- und damit Temperaturabfall kommen, der das Eindringen von Keimen ermöglichen könnte.

Mit diesem Verfahren ergeben sich weiterhin Probleme mit der Sterilität aufgrund der vermutlich zu geringen Verweilzeit. Das Medium wird in der 2. Kampagne daher nicht mehr thermisch, sondern über einen Flüssigkeitssterilfilter (Pall) sterilisiert. Der Vordruck an der Dampfduüse, die auch weiterhin zum Sterilisieren der Substratleitung benötigt wird, wird auf 1,5 bar reduziert. Ein höherer Druck könnte das Filterelement zerstören.

Zum Sterilisieren der Anlage wird zuerst Heißdampf durch die Luftleitung in den Fermenter geleitet. Dampfcondensat kann am Ablassventil des Sterilfiltergehäuses und durch einen Drehschieber am tiefsten Punkt der Luftleitung entweichen. Nach 30 Minuten wird die Dampfzufuhr und der Drehschieber vor dem Fermenter geschlossen. Danach werden über die Dampfduüse der Substratleitung, einen Drehschieber am Reaktorboden und einen Drehschieber im Fermenterkopf Dampf eingeleitet und die Substratleitung sowie der Fermenter sterilisiert. Der Kopfdruck wird hierfür auf 1,5 bar eingestellt. Dampfcondensat wird über den Kondensatablass im Reaktorboden und einen Dreiwegehahn am tiefsten Punkt der Substratleitung abgelassen. Die Sterilisationszeit beträgt ebenfalls 30 Minuten. Die Temperatur wird an mehreren Punkten der Leitungen und des Fermenters mit Thermokreide und einem Kontaktthermometer überprüft und beträgt über 120 °C.

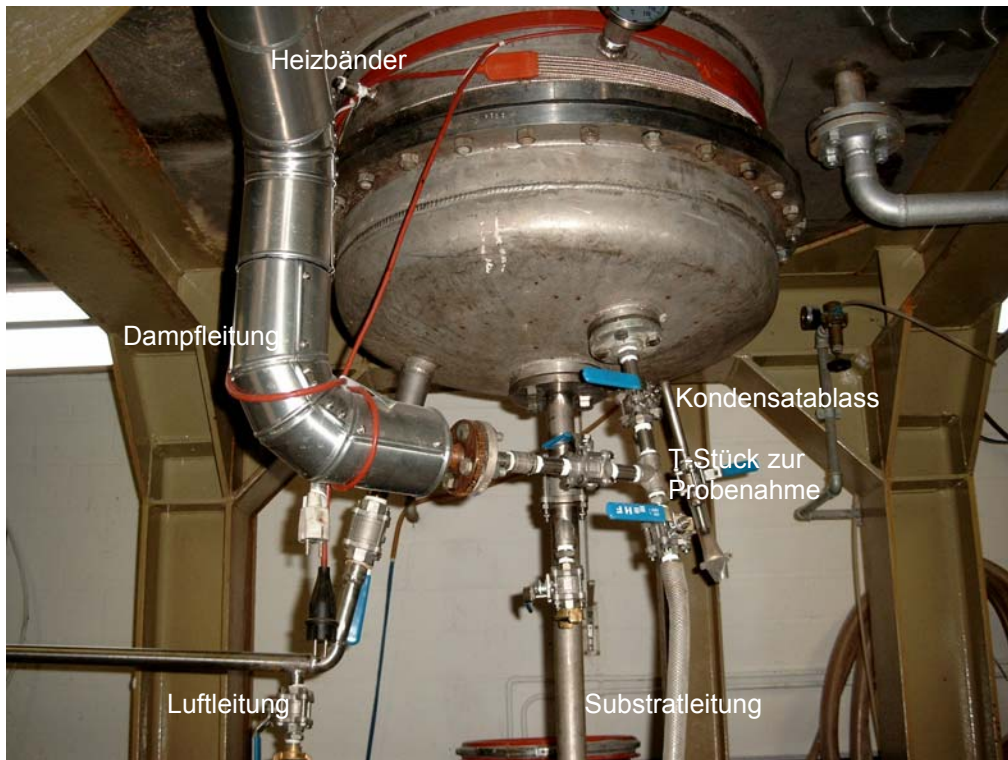


Abb. 22: Reaktorboden mit Versorgungsleitungen

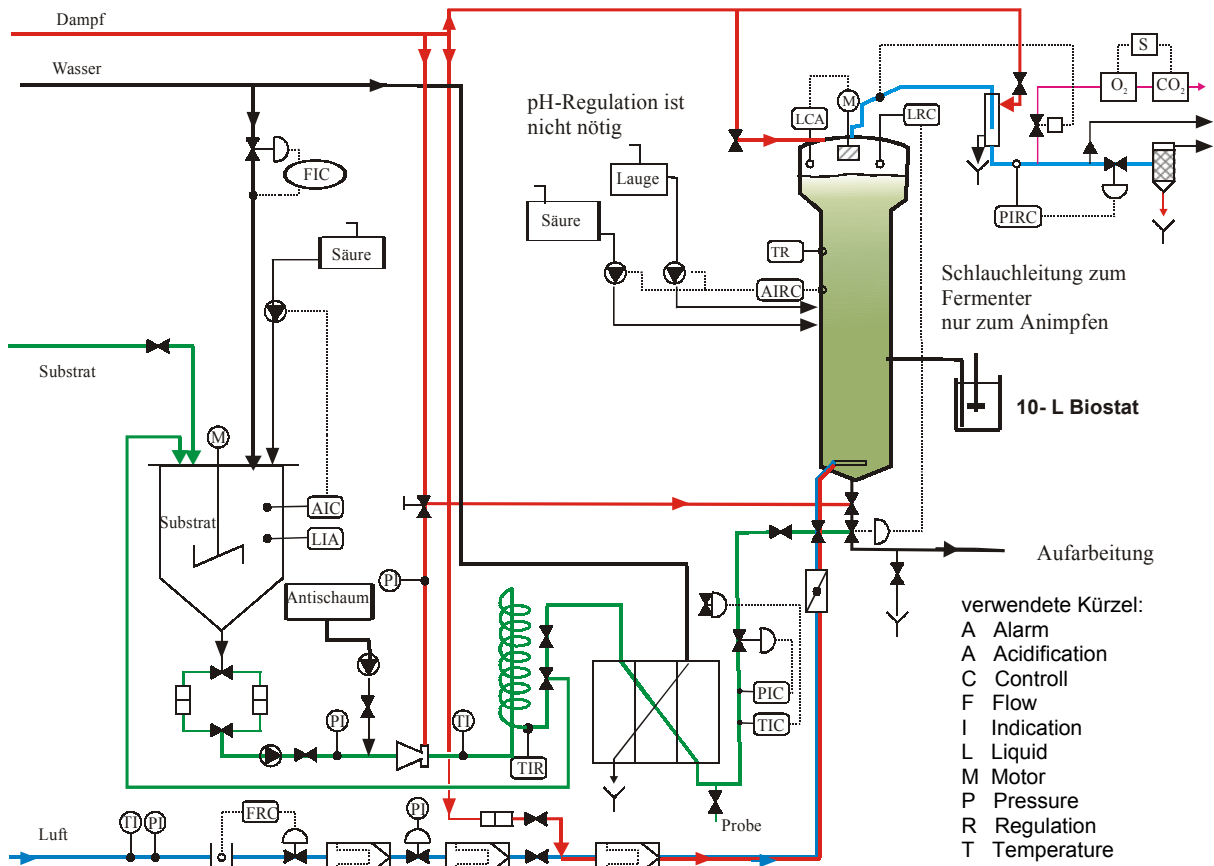


Abb. 23: Fließschema der Pilotanlage zu Projektbeginn Juli 2000

### 3.5.4. Kampagnebetrieb mit KFW

Für die Füllung der Pilotanlage werden ca. 2000 - 3000 L Medium benötigt, die nicht nach dem Laborverfahren im Autoklaven hergestellt werden können. Daher wird zu Beginn der 1. Projektkampagne 2001 ein Test mit der im Werk vorhandenen Ultrafiltrationsanlage (UF) durchgeführt. Die Anlage wird mit Konzentrat aus der Umkehrosiose-I-Anlage gespeist (KFW). Sie besteht aus 2 Blöcken, die in Reihe geschaltet sind und jeweils aus 4 Modulen, die nacheinander durchströmt werden. Jeder Block besitzt einen eigenen internen Kreislauf. Das Konzentrat des 1. Blocks ist der Zulauf des 2. Blocks. Das Konzentrat des 2. Blocks wird verworfen, die beiden Permeate werden vereint.

Die Qualität des KFW-Mediums lässt sich über den Gehalt an Gesamtstickstoff nach Kjeldahl recht zuverlässig abschätzen. Bei Werten über  $\approx 1.000 \text{ mg N}_{\text{ges}}/\text{L}$  ist normalerweise kein Wachstum zu erwarten.

Nach 50 %iger Verdünnung des Permeats (1 Teil KFW-Permeat plus 1 Teil Wasser) entspricht der Gehalt an Gesamtstickstoff etwa dem im Labormedium und auch das Wachstum und die Paramylonproduktion von *Euglena gracilis* sind zu Beginn der Versuche im August 2001 gleich gut.

Der Gehalt an Gesamtstickstoff im verdünnten KFW-Medium steigt im Verlauf der Kampagne 2001/2002 von anfänglich 600 mg/L auf über 2000 mg/L und dieses Medium wirkt wachstumshemmend auf *Euglena gracilis*, so dass es nicht mehr zur Fermentation geeignet ist. Daher wird ab Januar 2002 als Grundlage für das Fermentationsmedium nur noch Kartoffelfruchtwasser nach der Eiweißfällung (eKFW) eingesetzt, das ebenfalls über die UF-Anlage filtriert wird. Auch bei diesem Medium treten Schwankungen in der Qualität auf, die jedoch keine so gravierenden Auswirkungen haben wie beim KFW.

Mit dieser Anlage kann auch aus PPL, das auf 4 % verdünnt wird, ein Medium zur Fermentation gewonnen werden.

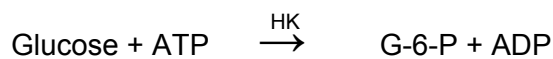
Für die Herstellung kleinerer Mengen wird ein einzelnes Ultrafiltrationsmodul im Technikum installiert, mit dem auch das Medium für eine 200 L Startkultur im Pilotfermenter filtriert werden kann.

Als Kohlenhydratquelle wird ein Glucosesirup (Cerestar) mit einer Trockensubstanz von 75 % eingesetzt.

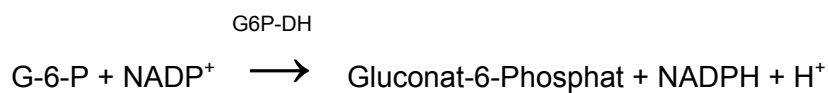
### 3.5.5. Enzymatische Glucosebestimmung

Die Bestimmung des Glucosegehalts der Proben aus den Fermentationen wird mit einem Enzymtest (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

Der Test beruht auf der Phosphorylierung von Glucose und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch das Enzym Hexokinase (HK) zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) und Adenosin-5'-diphosphat (ADP):



G-6-P wird in Gegenwart von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat ( $\text{NADP}^+$ ) zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert, wobei reduziertes NADPH entsteht:



Die entstehenden  $\text{H}^+$ -Ionen werden durch eine Pufferlösung abgefangen. Die Menge an NADPH ist äquivalent zum Glucosegehalt und kann aufgrund der Absorption bei 340 nm photometrisch bestimmt werden (Dr. Lange LP 6).

Durchführung:

Die filtrierte Probe wird verdünnt, so dass der Glucosegehalt im Messbereich liegt. Zu Beginn der Fermentation mit 20 g/L Glucose ist eine Verdünnung von 1/50 - 1/100 notwendig.

200  $\mu\text{l}$  der verdünnten Probe werden mit 2,8 mL Pufferlösung (Triethanol-Puffer) in eine Küvette pipettiert und gemischt. Bei 340 nm wird die Extinktion  $E_1$  gemessen.

Durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  Enzymgemisch wird die Reaktion gestartet und die Extinktion  $E_2$  nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten gemessen. Der Blindwert wird auf die gleiche Weise mit dest. Wasser bestimmt.

Die Berechnung erfolgt nach:

$$\Delta E = E_2 - E_1 - \Delta E_{\text{blind}}$$

Die Konzentration ergibt sich aus:

$$c = \frac{V \cdot M \cdot Verd.}{e \cdot d \cdot V_p \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad \text{in g/L}$$

V = Testvolumen (3,02 mL)

V<sub>p</sub> = Probevolumen (0,2 mL)

M = Molmasse (180,16 g/mol)

Verd. = Verdünnung

d = Schichtdicke der Küvette (1cm)

e = molarer Extinktionskoeffizient von NADPH (6,3 L/mmol • cm bei 340 nm)

### 3.5.6. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl

Die Bestimmung des Gesamtstickstoff erfolgt in einer Apparatur (Büchi) nach dem Kjeldahl-Verfahren. Bei Temperaturen zwischen 320-480 °C werden organische Bestandteile mit Schwefelsäure katalytisch aufgeschlossen und der Stickstoff nach einer alkalischen Destillation als Ammoniak freigesetzt und in einer Vorlage aus Salzsäure aufgefangen. Der Gehalt an NH<sub>3</sub> wird durch Titration mit Natronlauge bestimmt.

Durchführung:

5 g Probe werden eingewogen und mit 20 mL konzentrierter Schwefelsäure sowie Katalysatortabletten in den Aufschlusskolben gegeben. Das Gemisch wird 120 Minuten im Aufschlussgerät erhitzt und nach dem Erkalten mit 100 mL Wasser verdünnt und mit Natronlauge alkalisch gemacht. Durch Wasserdampfdestillation wird NH<sub>3</sub> in eine Vorlage aus 0,1 molarer HCl und einigen Tropfen Mischindikator überführt. Die überschüssige Säure wird mit 0,1 m NaOH rüchtitriert.

Der Gehalt wird berechnet nach:

$$c = \frac{(V_{HCl} \cdot f \cdot V_{NaOH}) \cdot 0,1 \cdot MG}{EW} \quad \text{in g/L}$$

V<sub>HCl</sub> = Volumen der 0,1 m HCL in mL

f = Faktor der Salzsäure

V<sub>NaOH</sub> = Verbrauch Natronlauge in mL

MG = Molmasse Stickstoff (14,08 g/mol)

EW = Probeneinwaage in g

### 3.5.7. Zellaufschluss mit Hochdruckhomogenisator

Da der Zellaufschluss mit Ultraschall einige Probleme aufwirft und hier Mengen von bis zu 100 Liter aufkonzentrierter Zellsuspension erwartet werden, wird ein Hochdruckhomogenisator (French-Press) eingesetzt, mit dem auch große Mengen bearbeitet werden können.

Ab 600 bar werden die Zellen aufgeschlossen, wobei vereinzelt noch intakte Zellen verbleiben. Bei einem Druck von 1000 bar ist der Aufschluss auch bei einmaligem Durchlauf vollständig. Mit dem eingesetzten Gerät (Niro Soavi Mod. Panda) können kontinuierlich ca. 10 L/h aufgearbeitet werden. Das Gerät ist auch für industrielle Maßstäbe erhältlich und hat sich im Vergleich mit Systemen anderer Hersteller als robust und funktionssicher erwiesen. Die Fermenterbrühe wird durch Separation (Westfalia-Separator) zu einer noch fließfähigen Flüssigkeit konzentriert und mit 2 g/L SDS, Pulver oder Lösung, versetzt. Nach dem Aufschluss setzt sich das Paramylon nach einigen Minuten am Boden des Auffangbehälters ab, so dass der Überstand abgesaugt bzw. zentrifugiert werden kann. Durch Waschen mit 80 °C heißem Wasser werden die Eiweißbestandteile aus Zellresten und überschüssiges SDS entfernt. Eine längere Einwirkzeit der SDS-Lösung wie beim Laborverfahren ist in diesem Fall nicht notwendig.

Nach 4-5 Waschenvorgängen erhält man einen reinweißen Rückstand, der 48 Stunden bei 100 °C getrocknet wird.

Bei Fermentationen mit bakterieller Infektion wird mehr SDS (bis zu 5 g/L) benötigt und es sind auch weitere Reinigungsschritte notwendig. Für eine kommerzielle Anwendungen könnte dieses Produkt nicht verwendet werden aber für die Ausarbeitung der besten Aufarbeitungsstrategie und für die Produktanalytik ist es gut geeignet. Trotz der hohen Keimbelastung lässt sich ein sehr sauberes Produkt gewinnen.

Alternativ wird auch hier die Aufarbeitung mit dem Enzym Alkalase durchgeführt. Bei der enzymatischen Aufarbeitung wird die Suspension nach dem Aufschluss abzentrifugiert und der Rückstand 3 Stunden bei 50 °C in einer 2 % igen Lösung der Protease behandelt, um Zellbestandteile herauszulösen. Das Rohprodukt wird abzentrifugiert und mehrfach mit heißem Wasser gewaschen. Bei den bakteriell kontaminierten Proben sind bis zu 3 Reinigungsschritte mit Alkalase notwendig.

Obwohl *Euglena gracilis* auch wachsartige Substanzen in der Zellwand produziert, ist eine Behandlung mit Lipasen, die von der Arbeitsgruppe aus Bielefeld vorgeschlagen wurde, nicht notwendig. Die Qualität der Produkte aus den beiden Aufarbeitungsmethoden ist annähernd gleichwertig.

Auch bei den spektroskopischen Untersuchungen zeigen sich kaum Verunreinigungen, so dass Infrarot- und Kernresonanzspektren der Proben aufgenommen werden können. Die mit Tensid bzw. Enzym aufgearbeiteten Proben zeigen dabei keine nennenswerten Unterschiede.

### 3.6. Produktanalytik

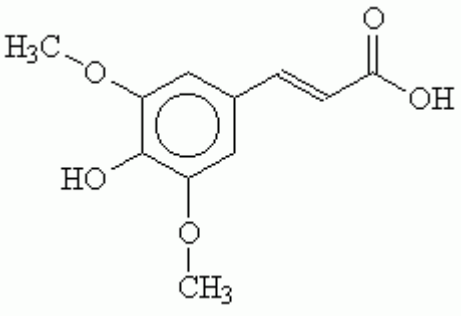
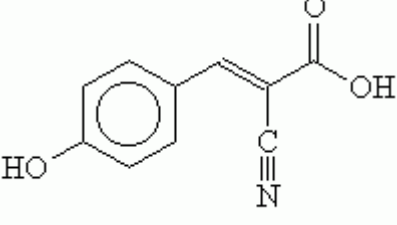
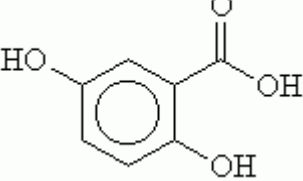
#### MALDI-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der MALDI- (Matrix assisted laser desorption ionisation) Technik soll die Masse der Paramylonmoleküle und die Anwesenheit von höher molekularen Verunreinigungen (z.B. Proteinen) untersucht werden. Das Paramylon wird in Konzentrationen von 0,5-10 mg/mL in Dimethylsulfoxid (DMSO) im Ultraschallbad gelöst und auf MALDI-Slides aufgetragen, die bereits mit einer Schicht der jeweils verwendeten Matrix (Tab. 8) versehen sind. Die Matrices werden in Konzentrationen von ca. 10 mg/mL in TFA/ACN gelöst. Nach dem Trocknen wird eine weitere Schicht der Matrix aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet (Sandwich-Präparation). Die Messung erfolgt in einem MALDI-TOF-Gerät (Shimadzu Kratos 3). Als Kalibrierstandard werden je 1mg/mL Rinderinsulin und BSA (Bovine serum albumin) eingesetzt, die in Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gelöst sind und auf die gleiche Weise präpariert und gemessen werden.

Die besten Ergebnisse werden mit Gentisinsäure als Matrix für das Paramylon erreicht, während sich Sinapinsäure oder  $\alpha$ -Cyanozimtsäure für die Kalibration mit Insulin oder BSA bewährt haben. Dabei werden nicht nur der  $M^+$ -Peak, sondern auch höhere Masse/Ladungs-Peaks gemessen.



Tab. 8: verwendete MALDI-Matrices

Name	Struktur	Formel	Masse
Sinapinsäure (SA) 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure		$C_{11}H_{12}O_5$	225.22
alpha-cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA)		$C_{10}H_7NO_3$	190.18
Gentisinsäure 2,5-dihydroxy-benzoesäure (DHB)		$C_7H_6O_4$	155.13

### Kernresonanzspektren und Infrarotspektren

Die NMR-Daten werden am Institut für Organische Chemie Hannover aufgenommen. Das Paramylon wird in deuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst, die Konzentration beträgt 25 mg/mL. Die  $^1\text{H}$ -Spektren werden mit einem 400 MHz-Gerät und Trimethylsilan als internem Standard aufgenommen, während die  $^{13}\text{C}$ -Spektren bei 100 MHz ohne TMS gemessen werden.

Die IR-Spektren werden mit einem Golden-Gate ATR-System (Attenuated Total Reflection) gemessen, wobei die Reinsubstanz direkt auf einen Kristall gepresst und die Totalreflexion gemessen wird.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Medienvorbereitung in der Laboranlage

#### 4.1.1. Kartoffelfruchtwasser als Fermentationsmedium

Die phototrophen Kulturen (Abb. 24) werden im synthetischen Nährmedium unter Lichtabschluss angezogen und stellen ihren Stoffwechsel nach ca. einer Woche um. Die Zellen bauen das Chlorophyll vollständig ab und können bei genügender Nährstoffzufuhr unter heterotrophen Bedingungen gehalten werden. Sie behalten trotzdem die Fähigkeit zur Photosynthese. Unter diesen Bedingungen wird vermehrt das Speicherkohlenhydrat Paramylon aufgebaut, von dem sich die Zelle bei Nährstoffmangel ernährt (Abb. 25.).

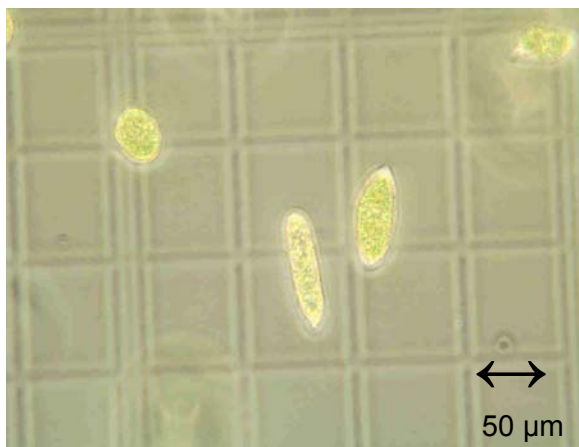


Abb. 24: *Euglena gracilis* (400x Vergr.)  
im phototrophen Zustand

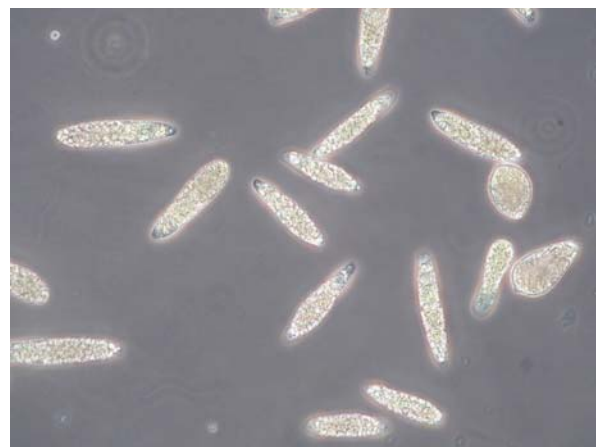


Abb. 25: *Euglena gracilis* (400x Vergr.)  
im heterotrophen Zustand

Die heterotrophe Kultur hat daher den Vorteil, dass wesentlich höhere Konzentrationen an Paramylon im Vergleich zu phototrophen Kulturen gewonnen werden und außerdem würde das Vorhandensein des Chlorophylls ein zusätzliches Aufarbeitungsproblem darstellen. Weiterhin kann in normalen Fermentationsanlagen aus Edelstahl gearbeitet werden, solange kein Licht durch Sichtfenster o.ä. einfallen kann.

Die Zellen sind wie im phototrophen Zustand langgestreckt und bewegen sich unter dem Mikroskop per Geißelschlag schnell durch das Sichtfeld. Details der Zellen lassen sich bei 400facher Vergrößerung und Phasenkontrast sehr gut erkennen.

Form und Bewegung der Zellen stellen bei der Bewertung einer Kultur bzw. einer Fermentation daher auch ein wichtiges Kriterium dar. Anhand der Beweglichkeit der lebenden Zellen lässt sich gut abschätzen, ob die Fermentationsbedingungen und das Medium geeignet sind. Die Zellen zeigen aktive Bewegung und ihre typische, zylindrische Form bleibt

erhalten. Unter Stressbedingungen nehmen die Zellen eine kugelförmige Gestalt an und bewegen sich nur wenig (Abb. 26). Stress kann durch Nährstoffmangel, chemische Substanzen, pH-Wert, Sauerstoffmangel aber auch durch Temperaturveränderung oder zu starkes Rühren hervorgerufen werden (Scherstress).

Eine pH-Regelung ist bei der Fermentation von *Euglena gracilis* nicht notwendig. Der pH-Wert steigt während der Fermentation mit wachsender Zelldichte gleichmäßig an, was für eine gute Entwicklung der Kultur auch notwendig ist und als Indikator für das Wachstum genutzt werden kann. Durch eine Regelung auf gleichbleibenden pH wird das Wachstum des Organismus nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Bielefeld sogar behindert.

Im definierten Nährmedium erreichen die Kulturen eine Zelldichte von über 20 Mio. Z/ml. Die Paramylonausbeute beträgt ca. 20 g/L und der Anteil des Paramylons an der Biotrockenmasse etwa 70 %. Die Generationszeit beträgt unter diesen Bedingungen etwa 11 Stunden. Für den wirtschaftlichen Einsatz ist das Medium zu teuer, so dass ein Medium auf Basis von Kartoffelfruchtwasser gesucht wird, in dem ähnliche Zelldichten bzw. Paramylonkonzentrationen erreicht werden.

Unbehandeltes Kartoffelfruchtwasser ist zur Fermentation von *Euglena gracilis* ungeeignet. Obwohl verschiedene Hefen und Bakterien sehr gut wachsen, führt es bei *Euglena* zur Einstellung des Wachstums. Die Zellen überleben einige Zeit aber sie vermehren sich nicht mehr (Abb. 26).

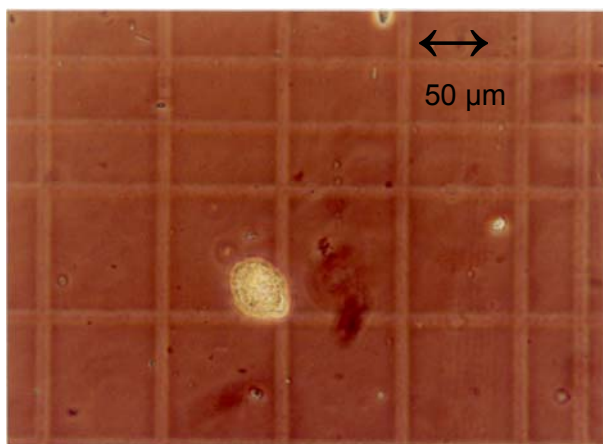


Abb. 26: Mikroskopische Aufnahme einer Zelle in reinem KFW (400x Vergr.)

In der ersten Projektphase werden Untersuchungen zur Medienvorbereitung durchgeführt. Als Grundlage dienen die Versuche der Arbeitsgruppe in Bielefeld. Die besten Ergebnisse werden dort mit Kartoffelfruchtwasser erreicht, dem durch Dampfinjektion im Werk der Emsland-Stärke ein großer Teil des Proteins entzogen wird (eKFW). Da dieses auch in verdünnter Form noch wachstumshemmend auf *Euglena gracilis* wirkt, ist eine weitere Behandlung notwendig. Durch Hitzekoagulation (Autoklavieren) des restlichen Proteins und Mikrofiltration werden die störenden Bestandteile entfernt. Dabei handelt es sich neben den Alkaloiden Solanin und Chakonin vermutlich um einige Proteine, mit denen sich die Kartoffelknolle gegen mikrobiellen Befall schützt.

Das auf diese Weise gewonnene eKFW wird mit normalem Leitungswasser verdünnt, wobei Werte um 40 – 50 % eKFW die besten Ergebnisse bringen. Reines Kartoffelfruchtwasser enthält ca. 5 g/L Zucker weitgehend in Form von Fructose, so dass in der verdünnten Form nur ca. 2 g/L als verwertbare Kohlehydrate bleibt. Als Kohlenstoffquelle wird daher 20 g/L Glucose zugesetzt.

Mit diesem Medium werden in Batch-Kulturen Zelldichten von ca. 9 Mio. Z/mL erreicht und eine Paramylonausbeute von 9 g/L. Die Generationszeit ist mit 16 Stunden länger als in der Nährlösung. Die Form der Zellen ist etwas breiter als in der Nährlösung, ihr Verhalten ist aber gleich. Auch wenn nicht die hohen Zelldichten wie im Nährmedium erreicht werden, sind die Bedingungen für *Euglena gracilis* unter Berücksichtigung des preiswerten Mediums gut.

Aufgrund der langen Generationszeit wären kontinuierliche Verfahren für einen industriellen Einsatz wirtschaftlicher, so dass die Verträglichkeit des Mediums auf lange Sicht für den Organismus sichergestellt sein muss. In Schüttelkulturen wird die Verwendbarkeit des Mediums auch über einen längeren Zeitraum hin überprüft. Dazu wird eine Stammkultur alle drei Tage auf frisches eKFW-Medium überführt und so mehrere Monate gehalten. Dabei zeigen sich weder Nährstoffmängel, noch Probleme mit sich akkumulierenden Toxinen. Auf der nachfolgenden, vergrößerten Aufnahme ist zu erkennen, dass die Zelle auch im eKFW-Medium fast vollständig mit Paramylonkörpern gefüllt ist (ca. 70 % der BTM).



Abb. 27: *Euglena*-Zelle mit Paramylonkörpern  
in eKFW-Medium  
(Ausschnittvergrößerung aus 1000x Vergr.)

Bei zu hoher Konzentration des Kartoffelfruchtwassers ( $> 60\%$ ) findet in Satzkulturen nur geringes Wachstum statt und die Zellen nehmen eine kugelige Gestalt an. In zu geringer Konzentration ( $< 30\%$ ) wächst die Kultur wie gewohnt an, aber aufgrund fehlender Nährstoffe (Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente) stellen sich bereits nach 2 - 3 Tagen Mangelerscheinungen ein. Die Zellen weisen große Hohlräume im Zellinneren auf, da das Paramylon verstoffwechselt wird und sie nehmen eine bauchige Form an. Abbildung 28 zeigt einen solchen Mangelzustand, der in einem stark verdünnten Medium auf der Basis von PPL aufgenommen wurde. Die Kultur kann in diesem Zustand noch einige Zeit überleben, einzelne Zellen sogar bis zu einem Monat.

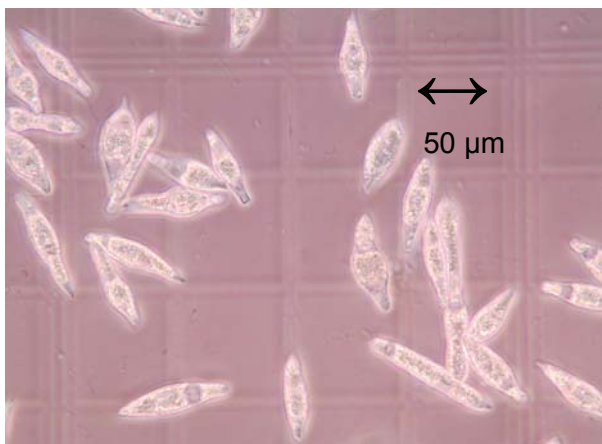


Abb. 28: *Euglena gracilis* bei Nährstoffmangel (in PPL-Medium 400x Vergr.)

Ein wichtiger Faktor für die Fermentation ist die Startzelldichte, da sich bei geringer Zellzahl die Lag-Phase in der sich die Zellen an die neuen Bedingungen adaptieren verlängert. Die Kulturen reagieren bei hoher Zelldichte allgemein weniger empfindlich auf äußere Einflüsse.

In der Stammhaltung mit dem synthetischen Medium wird mit Animpfverhältnissen von 1/20 (5 mL Kultur auf 100 mL Medium) gearbeitet, woraus sich eine Startzelldichte von mehr als 1 Mio. Z/mL ergibt und eine Generationszeit von ca. 11 Stunden. Für ein schnelles Anwachsen der Kultur im eKFW-Medium ist eine Startzelldichte von mindestens 400 000 Z/mL notwendig, womit eine Fermentationsdauer von 4 Tagen und eine Generationszeit von ca. 16 Stunden erreicht wird. Eine höhere Startzelldichte verkürzt die Fermentationszeit, bedarf aber auch eines entsprechend großen Animpfverhältnis von 1/10. Für eine Fermentation im Kubikmetermaßstab ist dies nur über eine Reaktorkaskade bzw. Auffüllen der Anlage in mehreren Stufen zu erreichen.

Im Hinblick auf die 4000 L-Pilotanlage der Emsland-Stärke GmbH werden die ersten Fermentationen im 30 L-Bioreaktor mit relativ geringen Animpfdichten von 100 000 Z/mL durchgeführt, wie sie auch dort zu erwarten sind. Der Fermenter in Emlichheim muss für eine Belüftung mit der zu Projektbeginn noch verwendeten Düse mit mindestens 500 Liter gefüllt werden, da sonst kein ausreichender Flüssigkeitsspiegel über der Siebplatte der Belüftungsdüse steht. Das Animpfverhältnis mit der Vorkultur aus dem als Inokulum zur Verfügung stehenden Biostat V beträgt 1/50 und daher sind auch nur Werte um 100 000 Z/mL für die Startzelldichte zu erwarten.

Diese Versuche sollen klären, ob überhaupt mit so geringen Zelldichten gearbeitet werden kann oder ob die Kultur unter diesen Bedingungen im Fermenter das Wachstum einstellt. In der folgenden Graphik (Abb. 29) ist die Zelldichte gegen den Glucosegehalt des Mediums aufgetragen.

Die Kultivierung zeigt eine deutliche Lag-Phase. In den ersten 24 Stunden finden kaum Veränderungen im Anstieg der Zelldichte oder im Glucoseverbrauch statt. Auch danach wächst die Kultur nur langsam. Die Fermentationszeit ist im Vergleich zu den Schüttelkulturen sehr lang. Die Generationszeit dieser Kultivierung liegt mit 36 Stunden deutlich über den Ergebnissen aus den Schüttelkulturen. Die eingesetzte Glucose von 25 g/L wird fast vollständig verbraucht.

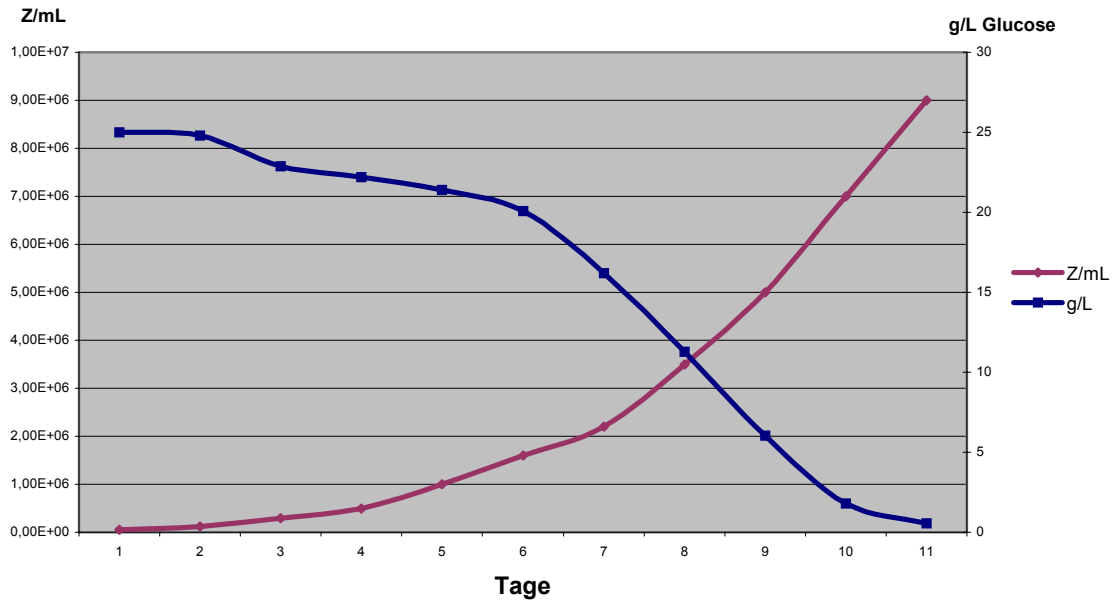


Abb. 29: Wachstumskurve von *Euglena gracilis* in eKFW-Medium mit geringer Startzelldichte von 60 000 Z/mL

Die erreichte Zelldichte von ca. 9 Millionen Zellen pro mL und die Auswertung der täglich entnommenen Proben unter dem Mikroskop zeigen, dass sich die Zellen trotz des langsamen Wachstums wie in den Schüttelkulturen verhalten. Mangel- bzw. Stress-Symptome (Kugelform) sind nicht erkennbar.

Im Vergleich dazu eine Fermentation mit einer höheren Startzelldichte von 500 000 Z/mL, die bereits nach 4 Tagen die maximale Zelldichte erreicht (Abb. 30).

Die Zellen beginnen sofort Glucose zu verbrauchen und auch die Zelldichte steigt schnell an. Auch bei diesem Versuch beträgt der Glucosegehalt 25 g/L und es zeigt sich, dass auch nach Abschluss der exponentiellen-Phase noch ca. 7 g/L in der Lösung verblieben sind. Für eine Batch-Kultur bis zur maximalen Zelldichte sind daher nur 20 g/L notwendig. Die überschüssige Glucosemenge wird auch nicht zur zusätzlichen Produktion von Paramylon genutzt, wie die Auswertung der Biotrockenmasse und die abschließende Aufarbeitung zum Endprodukt Paramylon zeigt. Für einen Zeitraum von etwa 24 Stunden bleibt die Zelldichte konstant und danach geht die Kultur in die Absterbe-Phase über. Die Biotrockenmasse steigt in der stationären-Phase noch durch Zelltrümmer von 13 g/L (9 g/L Paramylon) auf 15 g/L, die Paramylonkonzentration sinkt dagegen auf 8 g/L in der aufgearbeiteten Fermentationsbrühe. Der Anteil des Paramylon an der BTM sinkt dabei von 70 % auf etwa 50 %. Die Generationszeit beträgt 22 Stunden.

Eine Fermentation über das Erreichen der maximalen Zelldichte hinaus bringt für eine wirtschaftliche Nutzung keine Vorteile. Die Anhäufung von Zelltrümmern und abgestorbenen Zellen erhöht den Aufarbeitungsaufwand und das Verhältnis aus BTM und Produkt verschlechtert sich.

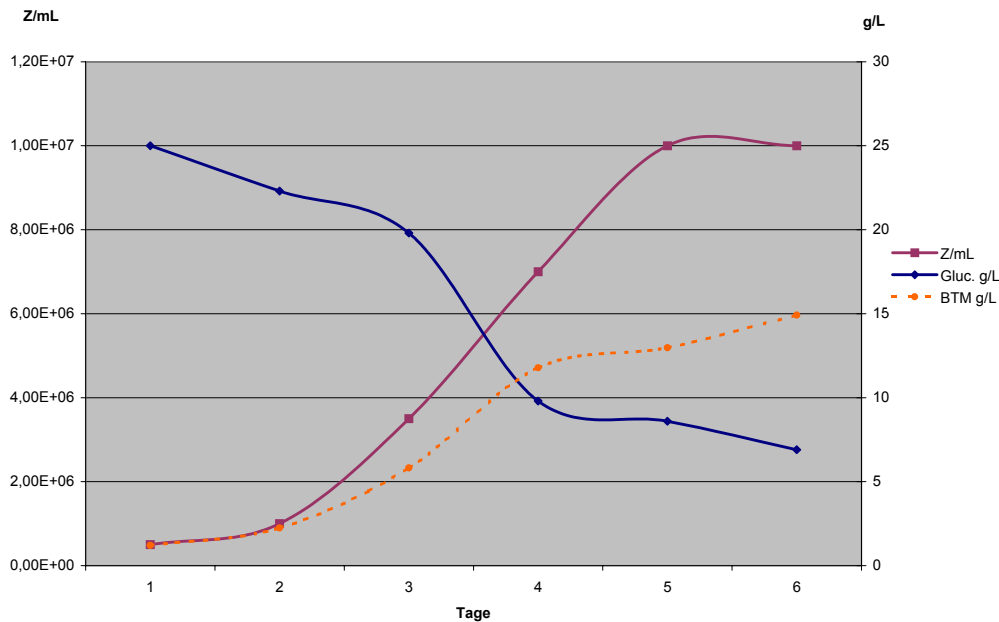


Abb.30: Wachstumskurve mit 500 000 Z/mL als Inokulum in eKFW-Medium

Das Fermentationsmedium auf Basis von Kartoffelfruchtwasser erfüllt nahezu alle Voraussetzungen, die für einen wirtschaftlichen Prozess gefordert sind. Es steht in großer Menge zur Verfügung, ist preiswert und Nährstoffmängel oder wachstumshemmende Wirkungen sind bisher nicht beobachtet worden. Obwohl es im Werk bereits durch Heißdampfinjektion behandelt wurde, muss das Medium autoklaviert werden, um das Restprotein zu entfernen.



#### 4.1.2. Potato Protein Liquor als Medium

Der Kampagnebetrieb im Werk der Emsland-Stärke beginnt üblicherweise im August und endet im Januar mit einer vollständigen Reinigung aller Anlagen. Ab diesem Zeitpunkt steht kein Kartoffelfruchtwasser mehr zur Verfügung und auch eine Lagerung in den benötigten Mengen erscheint nicht sinnvoll. Für eine wirtschaftliche Nutzung des Prozesses sollte die Fermentationsanlage aber ganzjährig einsetzbar sein. Aus diesem Grund wird das Konzentrat Potato Protein Liquor (PPL) auf seine Eignung als Fermentationsmedium für *Euglena gracilis* untersucht. PPL wurde in der Vergangenheit schon mit Erfolg für die Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt [35]. Dieses hochviskose Konzentrat wird durch Eindampfen des durch Hitzekoagulation weitgehend von Proteinen befreiten Kartoffelfruchtwassers gewonnen und weist eine Trockensubstanz von ca. 50-60 % auf. Vor dem Eindampfen wird seit einigen Jahren noch Prozesswasser aus der Stärkeseparation eingeleitet, so dass PPL nicht einfach als konzentriertes eKFW bezeichnet werden kann, wie es bei den früheren Versuchen mit der Bäckerhefe der Fall war.

In den Laborversuchen wird 2 % PPL mit Leitungswasser vermischt, die Lösung autoklaviert und mikrofiltriert. Unverdünnt ist PPL aufgrund des hohen Feststoffanteils praktisch nicht filtrierbar. Wie beim eKFW-Medium werden 20 g/L Glucose zugesetzt und das PPL-Medium in Schüttelkulturen eingesetzt. Die Kulturen erscheinen unter dem Mikroskop vital, die Wachstumsgeschwindigkeit und erreichbare Zelldichte ist jedoch geringer als im eKFW-Medium. Geringere bzw. mehr als 4 % PPL-Konzentrationen führen zu Nährstoffmangel- bzw. stark hemmender Wirkung.

#### 4.1.3. Zellaufschluss mit Ultraschall und Aufarbeitung

Nach Abschluss der Fermentation wird die Fermenterbrühe abgelassen und durch Zentrifugation aufkonzentriert. Aufgrund der Größe von *Euglena gracilis* sind nur geringe Umdrehungszahlen mit einer RZB von 500 g notwendig. Die konzentrierten Zellen werden mit einer Ultraschallsonde bei 300 Watt über 10 Minuten aufgeschlossen.

In Abbildung 31 ist die aufgeschlossene Suspension mit Paramylonkörpern dargestellt, in der keine intakten Zellen mehr zu erkennen sind.

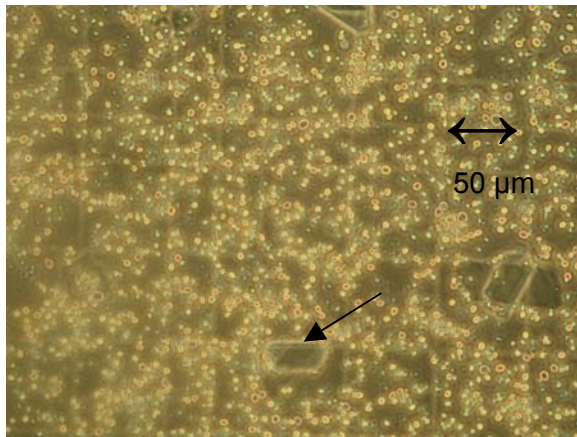


Abb. 31: Paramylonkörper und SDS-Kristalle (Pfeil)  
nach Ultraschall-Aufschluss (400fache Vergr.)

Der Aufschlussgrad erreicht nahezu 100 %. Vereinzelt intakte Zellen bleiben auch bei längerer Aufschlusszeit erhalten.

Vorhandenen Lipide und Proteine aus Zelltrümmern und sonstige Fermentationsreste werden mit dem Tensid Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat entfernt.

Die flüssige Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Paramylonkörper haben eine durchschnittliche Größe von 2-3 µm und sedimentieren nicht so leicht wie die Zellen, so dass höhere Drehzahlen notwendig sind (RZB 1000 g). Bei mehr als 1000 g verklumpt die Masse und ist schwer aus den Zentrifugengläsern/Rotoren zu entfernen. Das Zentrifugat wird mit der zehnfachen Menge 1 % SDS-Lösung resuspendiert und 2-3 Stunden auf 100 °C erhitzt. Die Suspension wird zentrifugiert, dekantiert und mit dest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt und bei gelblicher Verfärbung durch einen Reinigungsschritt mit Aceton ergänzt, um die Carotinoide zu entfernen.

Bei 100° C wird im Trockenschrank über 48 Stunden getrocknet und die zum Teil sehr festen Pellets aus der Zentrifuge im Mörser zu Pulver gemahlen.

Das Produkt ist ein weißes, stärkeähnliches Puder.

Für die Aufarbeitung im Technikumsmaßstab scheint der Einsatz einer Ultraschallsonde nicht geeignet, da die großen Mengen nicht schnell genug verarbeitet werden können und das Rohprodukt meist noch nachgereinigt werden muss.

#### 4.2. Pilotanlage Emlichheim 2000/2001

Die Pilotanlage im Werk der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim ist nach den Forschungsarbeiten Mitte der 80er Jahre [35, 36] nur noch zeitweise genutzt worden und muss daher überarbeitet werden.

Die Bestandsaufnahme zu Beginn des Projektes ergibt diverse Mängel am Fermenter und an den Rohrleitungen sowie der Abgasanalytik. Die Dichtungen zwischen den 4 Fermenterelementen der Blasensäule werden nicht erneuert. Hierfür müsste die gesamte Anlage mit Hilfe eines Kranwagens demontiert werden und da die durchgeführten Drucktests keinen Rückschluss auf Undichtigkeiten erkennen lassen, wird von dieser Maßnahme abgesehen. Die Steriltechnik der Anlage ist nicht auf dem heutigen Stand der Technik, so dass es bei den mehrtägigen Fermentationen mit *Euglena gracilis* zu Infektionsproblemen kommen kann. In den früheren Versuchen mit Hefen wurden meist Satzfermentationen über 24 Stunden durchgeführt, bei denen es keine Sterilitätsprobleme gab. Die Anlage wurde mit wenig Medium gefüllt und mit der Vorkultur aus dem 10 L-Biostat angeimpft und bei ausreichender Zelldichte aufgefüllt. Dann erst begannen die Messungen, so dass der Fermenter 2-3 Tage in Betrieb war. Anschließend wurden auch kontinuierliche Versuche mit Hefe bei pH 4 in dieser Anlage gefahren, weshalb sie für dieses Projekt als prinzipiell steril angenommen wird.

Nach den Vorgaben des BMBF kann die Kampagne 2000/2001 nicht für Forschungsarbeiten an der Pilotanlage genutzt werden, da erst gesicherte Daten zur Fermentation von *Euglena gracilis* von der Arbeitsgruppe in Bielefeld vorgelegt werden müssen.

Nach Abschluss der Instandsetzungsarbeiten und der abschließenden TÜV-Abnahme im Frühjahr 2001 können die ersten Tests mit der Anlage durchgeführt werden. Da zu diesem Zeitpunkt kein Kartoffelfruchtwasser zur Verfügung steht, wird das Konzentrat PPL verwendet.

Eine Herstellung von mindestens 500 L Medium durch autoklavieren nach dem Laborverfahren ist zu aufwendig. Alternativ wird daher eine Ultrafiltration mit der im Werk vorhandenen Ultrafiltrationsanlage untersucht, die auch während der Kampagne für KFW bzw. eKFW eingesetzt werden kann. Die UF-Anlage ist zu diesem Zeitpunkt noch mit unterschiedlichen Modulen bestückt, die eine Ausschlussgrenze zwischen 50 und 250 kDa haben. Das Laborverfahren setzt dagegen nur eine Mikrofiltration ( $> 1 \mu\text{m}$ ) ein.

Die ersten Tests mit PPL aus der UF-Anlage ohne vorherige Hitzekoagulation werden im Mai 2001 durchgeführt. Als Bezugsgröße für die PPL-Konzentration wird der Gehalt an Gesamtstickstoff zugrunde gelegt. Als Kohlenhydratquelle wird ein Glucosesirup (Cerestar) mit ca. 75 % Trockenmasse eingesetzt, der aus rückverzuckerter Stärke gewonnen wird und preiswerter als normale Glucose ist.

Bei einer PPL-Konzentration von 4 % in Leitungswasser beträgt der Gehalt an ges. N ca. 700 mg/L und liegt damit im gleichen Bereich wie das eKFW-Medium. Werte über 1000 mg/L Gesamtstickstoff führen in allen Versuchen mit Medium auf Kartoffelfruchtwasserbasis (PPL; eKFW, KFW) zu stark hemmender Wirkung bis hin zum Absterben der Kultur.

Die maximale Zelldichte im PPL-Medium beträgt ca. 5 Mio. Z/mL und die Generationszeit mehr als 30 Stunden. Weiterhin ist beim Animpfen mit Zellen aus dem synthetischen Medium eine längere Lag-Phase als im eKFW-Medium zu beobachten, da der Organismus sich erst auf das neue Medium einstellen muss. Eine Umstellung der Animpfkultur auf PPL-Medium zur vorherigen Adaption hat wegen der deutlich geringeren Zelldichte keine Vorteile. Die höhere Startzelldichte beim Einsatz des Inokulums aus synthetischem Medium führt trotz der Lag-Phase zu insgesamt besseren Ergebnissen. Das Verhalten der Zellen zeigt aber sonst keine Auffälligkeiten und auch bei längerem Einsatz von PPL-Medium in der Stammkultur zeigen sich keine kumulativ toxischen Effekte. Trotz der geringeren Wachstumsgeschwindigkeit und Paramylonausbeute wäre ein Einsatz von PPL außerhalb der Kampagne denkbar.

Das nachfolgende Diagramm (Abb. 32) zeigt eine Fermentation im Biostat V in Emlichheim mit ultrafiltriertem PPL, die bei einer Zelldichte von 5 Mio. Z/ml und fast vollständig verbrauchter Glucose beendet und als Inokulum für die Pilotanlage verwendet wird. Die Generationszeit beträgt 34 Stunden.

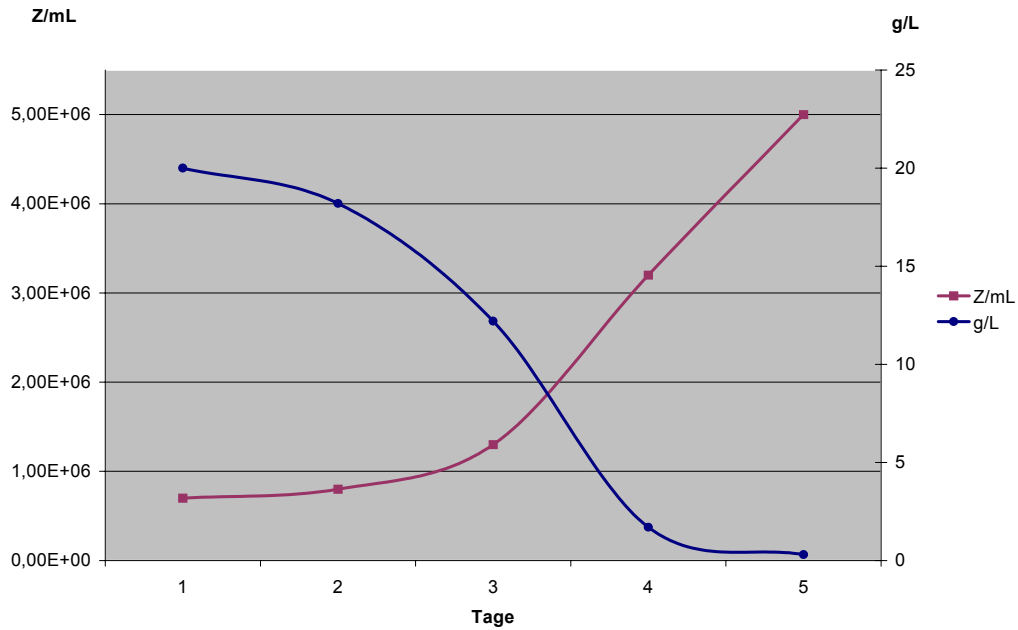


Abb. 32: Wachstumskurve in PPL-Medium aus der Kampagne 2000/2001

Wie schon bei den Laborversuchen ist der nutzbare Konzentrationsbereich relativ klein. Eine Konzentration unter 2 % PPL führt innerhalb von 2-3 Tagen zu Mangelercheinungen, wie sie schon im Kapitel über das eKFW-Medium gezeigt wurden. Die Zellen verstoffwechseln trotz vorhandener Glucose das gebildete Paramylon und weisen leere Bereiche im Zytoplasma auf; Morphologie und Aktivität verändern sich.

In höheren Konzentrationen wirkt es stark hemmend bzw. toxisch. Wachstum findet nicht mehr statt und die Zellen sterben nach ca. 1 Woche ab (Abb. 33).

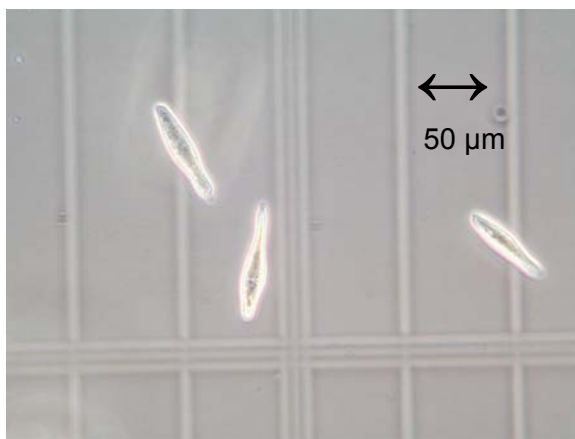


Abb. 33: *Euglena*-Kultur in 5 % PPL-Medium mit stark geschädigten Zellen (400fache Vergr.)

Nach den erfolgreichen Tests mit PPL-Medium im Biostat wird das PPL-Medium auch im Pilotfermenter eingesetzt. Da in der Blasensäule der Pilotanlage die Vermischung ausschließlich durch die Luftzufuhr erreicht wird und daher aufgrund der Belüftungsdüse wesentlich stärkere Turbulenzen auftreten werden, bleibt jedoch die Ungewissheit wie der Organismus auf diese Bedingungen reagiert.

500 L PPL-Medium werden über die Heizspirale bei 140 °C erhitzt, in den sterilisierten Fermenter gefüllt und die geringste einstellbare Belüftungsrate von 10 Nm<sup>3</sup>/h eingestellt.

Nachdem der Fermenter auf die Fermentationstemperatur abgekühlt ist wird mit der 10 L-Vorkultur aus dem Biostat angeimpft. Die Untersuchung der in den folgenden Tagen genommenen Proben unter dem Mikroskop zeigt viele kugelige Zellen, was auf Stressbedingungen hinweist. Vergleichsproben aus Kulturkolben bzw. aus dem Biostat mit demselben Medium zeigen keine derartigen Probleme.

Durch das Schauglas am Fermenterkopf ist eine heftige und inhomogene Durchmischung mit starker Blasenbildung im Fermenter erkennbar. Für den Kampagnebetrieb ab August 2001 wird die Belüftungsdüse daher durch einen Rundboden mit Ringbegaser ersetzt. Die Belüftung wird dadurch gleichmäßiger und schonender und auch der befürchtete Rückfluss in die Luftleitung wird verhindert. Weiterhin verringert sich mit dem kleineren Rundboden das zur Durchmischung notwendige Minimalvolumen auf etwa 200 L, so dass mit 10 L Startkultur aus dem Biostat das gleiche Animpfverhältnis von 1/20 wie bei der Laboranlage erreicht wird.

Trotz der nicht optimalen Bedingungen wächst die Kultur, wenn auch langsamer als im Biostat und damit ist die grundsätzliche Eignung der Blasensäule für die Kultivierung von *Euglena gracilis* geklärt. Das geplante Auffüllen der Anlage kann aber wegen einer nach 4 Tagen auftretenden Bakterieninfektion nicht durchgeführt werden. Auch mehrere Steriltests führen nach 4-5 Tagen zu verschiedenen Infektionen mit Bakterien und Hefen, die evtl. durch Rückfluss in die Luftleitung verursacht werden. Daher werden weitere Versuche auf die Kampagne verschoben, wenn die Anlage auf den Rundboden umgerüstet ist und KFW-Medium eingesetzt werden kann.

#### 4.2.1. 1. Kampagnebetrieb an der Pilotanlage Emlichheim

Im August 2001 steht die Anlage (mit Ringbegaser) erstmals während der laufenden Kampagne zur Verfügung.

Das Laborverfahren zur Medienherstellung sieht ein dreimaliges Erhitzen vor: 1. Proteinfällung im Werk, 2. Fällung vor der Mikrofiltration und anschließende Sterilisation im Fermenter, wodurch alle Inhaltstoffe erheblich beeinflusst werden. Daher und aus logistischen Gründen wird für die Pilotanlage ein anderes Verfahren erprobt.

Die Filtration über die UF-Anlage ist wesentlich feiner als im Laborverfahren und erheblich leistungsfähiger. Aus diesem Grund wird nicht das eKFW nach der Eiweißfällung, sondern das weitgehend unbehandelte Kartoffelfruchtwasser nach der Umkehrosiose verwendet, in dem noch der natürliche Gehalt an Aminosäuren, Mineralien und Vitamine aber auch die für *Euglena gracilis* störenden Bestandteile vorhanden sind.

Aufgrund des hohen Protein- und Feststoffgehaltes setzt dieses Material die Filtrationsmembran der Laboranlagen schnell zu und war daher nicht verwendbar. Die technische Anlage ist dagegen für die Filtration in der Größenordnung von m<sup>3</sup>/h ausgelegt, so dass auch KFW in der benötigten Menge filtriert werden kann. Die UF-Anlage steht außerdem in der gleichen Halle, in der sich auch die Umkehrosiose befindet, so dass der Transport erheblich vereinfacht wird und für ein wirtschaftliches Verfahren Zeit und Kosten eingespart werden.

Der Stickstoffgehalt des auf 50 % verdünnten KFW-Mediums beträgt ca. 700 mg/L und in Schüttelkulturen zeigen sich keine wachstumshemmenden Eigenschaften, so dass es für die Fermentation im Biostat und dem Pilotfermenter eingesetzt wird. Die Wachstumsgeschwindigkeit mit einer Zellteilungsrate von ca. 17 Stunden und die maximale Zelldichte mit 9 Mio. Z/mL liegen im gleichen Bereich wie beim Labormedium aus eKFW (Abb. 34).

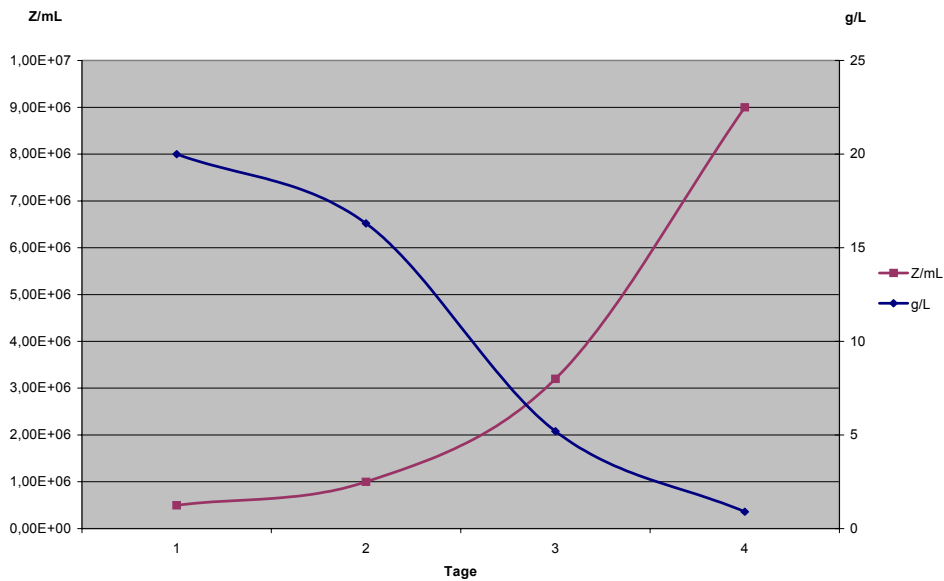


Abb. 34: Wachstumskurve von *Euglena gracilis* in 50 % KFW-Medium

Der übliche Anstieg des pH-Wert während der Fermentation ist geringer als im eKFW-Medium und auch die Schaumbildung ist geringer, so dass auf den Zusatz von Antischaummittel verzichtet werden kann.

Mit diesem Medium wird auch im Pilotfermenter kultiviert. Da es im Vorfeld Infektionsprobleme gab, wird für diesen Versuch eine andere Vorgehensweise gewählt, um die Sterilität zu gewährleisten. Die Luft- und Substratleitung wird sterilisiert und 180 L Medium im Vorlagebehälter auf 100 °C erhitzt. Das vorgeheizte Medium wird nun über die Heizwendel auf 140 °C gebracht und ungekühlt in den Fermenter gepumpt. Durch die Substratleitung wird anschließend noch eine Stunde Heißdampf eingeleitet und eine Temperatur von 120 °C gehalten, so dass die Anlage inline sterilisiert wird. Durch dieses Verfahren wird allerdings erheblich mehr Dampfkondensat aufgenommen, wodurch das Medium verdünnt wird. Beim Ansetzen des Mediums muss dies mit einer höheren Konzentration KFW und entsprechender Glucosezugabe berücksichtigt werden. Außerdem beeinträchtigt das lange Erhitzen die Qualität des Mediums.

Nach Abkühlen auf 28 °C und bei einer Belüftung von 15 Nm<sup>3</sup>/h wird der Fermenter mit 10 L Vorkultur aus dem Biostat (7,5 Mio. Z/mL) auf eine Startzelldichte von 300 000 Z/mL angeimpft. Der Verdünnungsfaktor von 1/25 zeigt, dass etwa 250 L Medium im Fermenter vorlagen und daher 70 L Kondensat aufgenommen wurden. Die Glucosekonzentration beträgt aufgrund der nur geschätzten Verdünnung mit Kondensat und geringerem TS-Gehalts des Glucosesirups 9 g/L. Die Kultur wächst in den ersten 24 Stunden nur langsam von 300 000



auf 450 000 Z/mL, steigt danach aber in 72 Stunden auf über 6 Mio. Z/mL (siehe Abb. 35). Wegen der zu geringen Glucosemenge werden 3 kg Glucosesirup in 30 L Wasser gelöst, per Heißdampf in der Heizwendel sterilisiert, im Wärmetauscher abgekühlt und durch die Substratleitung zudosiert.

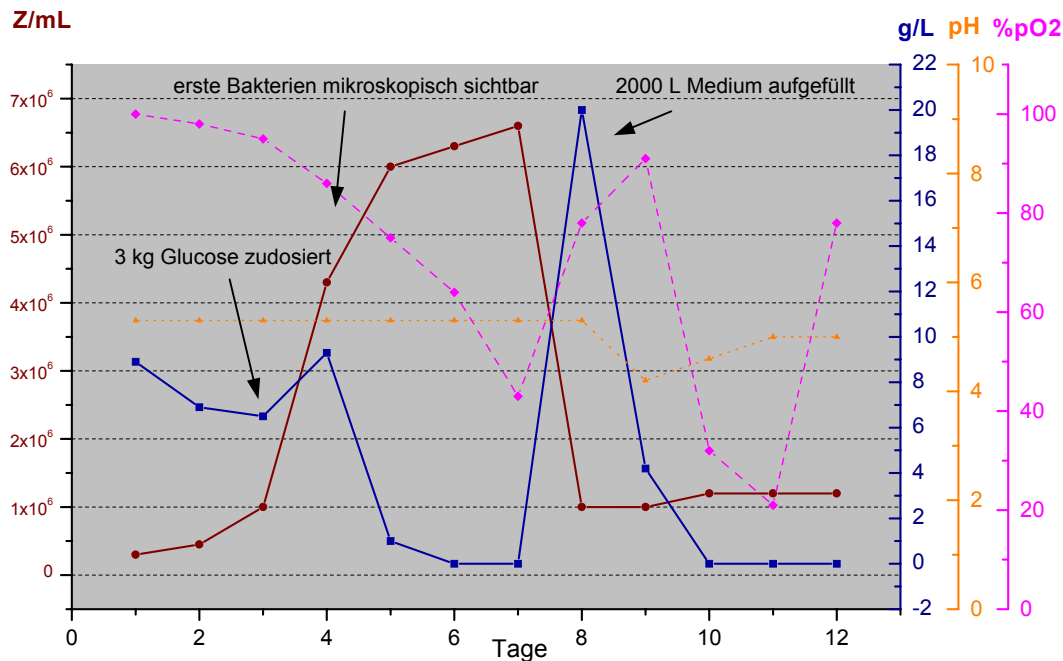


Abb. 35: Wachstumskurve von *Euglena gracilis* mit KFW-Medium im Pilotfermenter

Wachstum und Beweglichkeit der Zellen sprechen für gute Fermentationsbedingungen (Abb. 36- 38). Nach 3 Tagen sind allerdings erste Bakterien in den entnommenen Proben erkennbar, die sich rasch vermehren und die Nährstoffe verbrauchen (Abb. 37, 38). Trotz der Infektion wird der Fermenter mit 2000 L frischem Medium aufgefüllt, um das Auffüllverfahren über Heizwendel und Wärmetauscher zu testen. Weiterhin besteht noch die Frage, ob der Organismus den hydrostatischen Druck in der Wassersäule von ca. 8 m Höhe toleriert und ob die geringe Begasungsrate im gefüllten Fermenter für ausreichende Durchmischung sorgt.

Die Zelldichte von *Euglena gracilis* bleibt nach dem Auffüllen annähernd konstant bei 1 Mio. Z/mL, da die Bakterien alle Nährstoffe in kürzester Zeit verbraucht haben. Die noch lebenden Zellen zeigen auch in dem gefüllten Fermenter vorerst ihre längliche Form und aktive Bewegung (Abb. 38). Im Medium häufen sich Zellreste und Paramylonkörper aus abgestorbenen Zellen. Die Belüftung sorgt für eine vollständige Durchmischung. Die Probenahme am tiefsten Punkt der Anlage gibt keinen Hinweis auf Sedimentation der Zellen oder sonstiger Feststoffe.

In den nächsten Tagen häufen sich Paramylonkörper und sonstige Zelltrümmer weiter an und nach 12 Tagen wird der Versuch beendet. Die Zellen sind weitgehend bewegungslos und zeigen zum Teil bereits die bauchige Form, die für Nährstoffmangel typisch ist (Abb. 39).

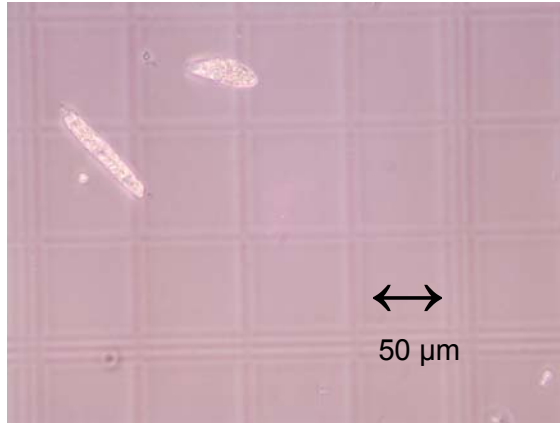


Abb. 36: Probe aus dem Pilotfermenter nach dem Animpfen 300 000 Z/mL (400 x Vergr.)



Abb. 37: Probe nach 3 Tagen mit ca. 3 Mio. Z/mL und ersten erkennbaren Bakterien

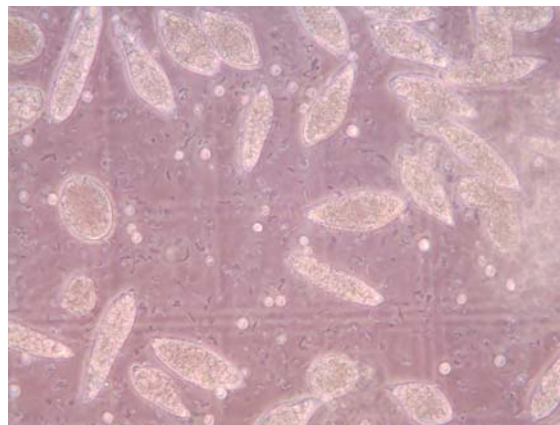


Abb. 38: Probe nach 6 Tagen mit 6 Mio. Z/mL und hoher Keimzahl vor dem Auffüllen



Abb. 39: Probe nach 12 Tagen (1 Mio. Z/mL) mit einzelnen Paramylonkörpern und Zelltrümmern

Der Versuch hat gezeigt, dass die Blasensäule zur Fermentation von *Euglena gracilis* geeignet ist. Trotz Infektion ist eine Zelldichte von 6 Mio. Z/mL erreicht worden und auch das stufenweise Auffüllen der Anlage ist technisch kein Problem. Die Sterilität der Anlage ist dagegen noch immer nicht gewährleistet.

Um die verschiedenen möglichen Infektionsquellen auszuschalten wird eine mit Medium gefüllte Gaswaschflasche über einen Bypass an die Luftleitung angeschlossen. Die Flasche wird vorher im Autoklaven sterilisiert. Die Bypassleitung wird beim Sterilisieren der Anlage 30 Minuten mit Heißdampf durchströmt und anschließend die Flasche angeschlossen. Da dieser Vorgang im Technikum unter unsterilen Bedingungen vorgenommen wird, werden die Schlauchenden und Schlauchverbinder mit Isopropanol behandelt. Der Gasausgang ist mit

einem 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter verschlossen. Auch wenn die Flasche nur bei Raumtemperatur von zum Teil unter 15 °C steht, sind Infektionen im Medium durch Trübung schon nach 1-2 Tagen zu sehen.

Aufgrund der hohen Staubbelastung im Technikum, in dem ständig mit Kartoffelstärke gearbeitet wird, sind alle Arbeiten an den laufenden Bioreaktoren mit einem hohen Infektionsrisiko verbunden. Die Gaswaschflasche kann daher auch nur bedingt als Indiz für eine unsterile Luftleitung gesehen werden. Eine Infektion kann hier immer durch das Anschließen unter den genannten Bedingungen verursacht worden sein. Der positive Nachweis durch eine sterile Probeflasche bei infiziertem Fermenter, der die Luftleitung als Infektionsquelle ausschließen würde, ist aber nicht eingetreten. In den Versuchen der folgenden Monate sind immer sowohl das Fermentermedium als auch die Probeflasche infiziert.

Mit dieser Methode zeigt sich, dass die Luftleitung bei geringer Belastung von unter 15 Nm<sup>3</sup>/h nicht steril ist. Das Medium in der Waschflasche ist auch bei der Raumtemperatur von z.T. nur 15 °C innerhalb von 2 Tagen sichtbar getrübt und unter dem Mikroskop sind Bakterien zu erkennen. Versuche mit höheren Belüftungsraten scheitern jedoch an der Scherstressempfindlichkeit von *Euglena gracilis* unter diesen Bedingungen. Die Zellen stellen bald das Wachstum ein und zeigen die in den folgenden Aufnahmen (Abb. 40, 41) erkennbare Kugelform.

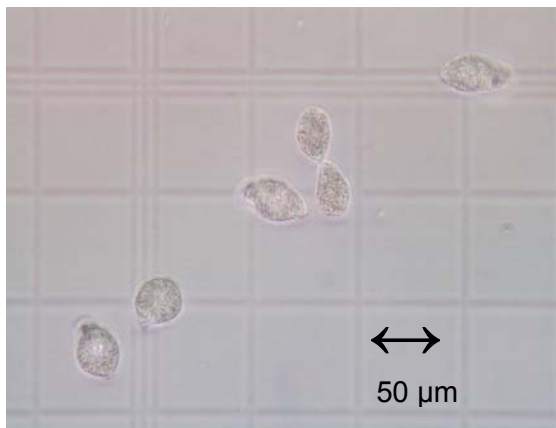


Abb. 40: Probe aus dem Pilotfermenter nach 4 Tagen bei einer Belüftung von 20 Nm<sup>3</sup>/h (400x Vergr.)



Abb. 41: Probe aus dem Pilotfermenter nach 6 Tagen (sinkende Zelldichte)

Die Fermentation wird mit 150 000 Z/mL bei 20 Nm<sup>3</sup>/h gestartet. Die Zellen zeigen sofort die kugelige Form, die auf Stressbedingungen hinweist. Die Zelldichte steigt in den ersten 4 Tagen noch leicht an, danach stirbt sie ab. Der Glucoseverbrauch stagniert nach 3 Tagen (Abb. 42). Ein Teil des für diese Fermentation verwendeten Mediums wird auch für

Schüttelkulturen und eine Kultivierung im Biostat V eingesetzt, in denen es keinerlei Probleme gibt. Das Medium kann daher als Ursache des Absterbens ausgeschlossen werden.

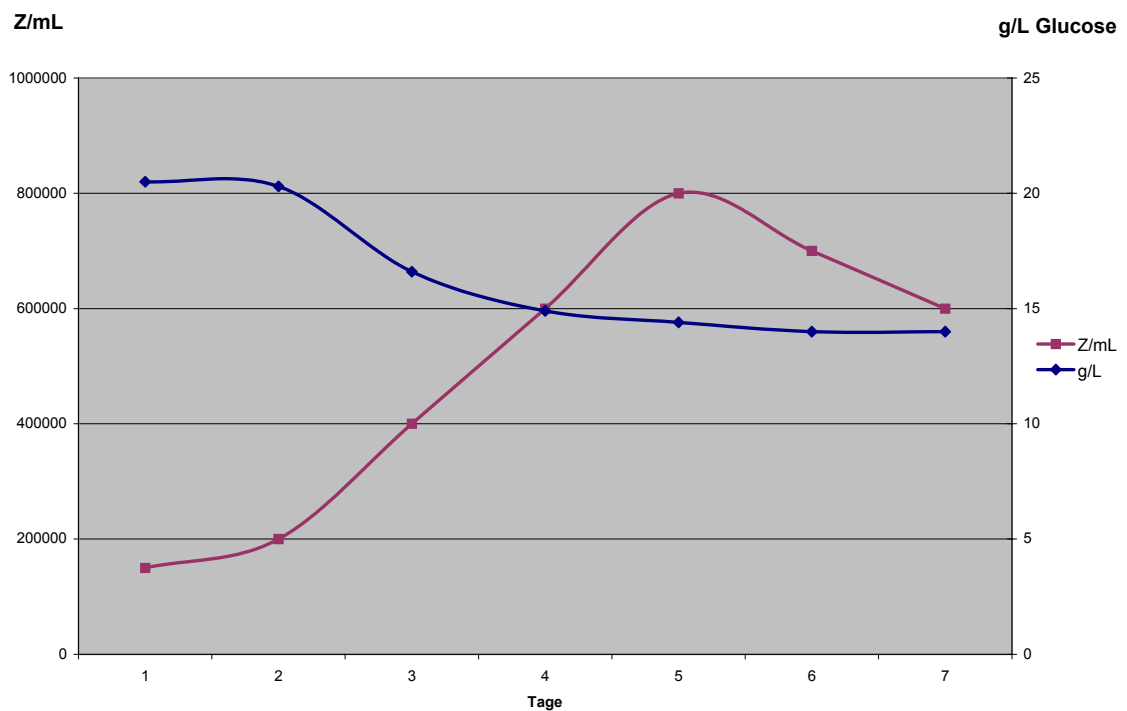


Abb. 42: Wachstumsverlauf im Pilotfermenter bei einer Belüftungsrate von 20 Nm<sup>3</sup>/h

Einige Proben werden nach 24 Stunden unter möglichst keimarmen Bedingungen (Brennerflamme) aus dem Fermenter genommen und im Schüttelkolben weiter kultiviert. Die Kulturen brauchen mehrere Tage, bis sie wieder aktives Verhalten zeigen und die Zelldichte ansteigt. Unter den normalen Bedingungen im Schüttelschrank erholen sich die Zellen wieder, während die Kultur im Fermenter abstirbt. Weiterhin sind die Proben auch nach 8 Tagen noch infektiionsfrei, so dass der Fermenter zum Zeitpunkt der Probenahme steril gewesen sein muss. Der Fermenter und die Probeflasche bleiben bis zum 7 Tag frei von einer Infektion. Danach wird die Belüftung auf ca. 8 Nm<sup>3</sup>/h reduziert und innerhalb der nächsten 48 Stunden tritt eine Infektion mit Hefezellen ein. Aufgrund der Beobachtungen scheint die Belüftung die Hauptursache für die Infektionen zu sein. Laut Aussage des Filterherstellers muss eine Mindestbelastung des Filters gewährleistet sein, um ein Durchwandern des Filtermaterials zu verhindern. Versuche mit einem Belüftungsbypass im Frühjahr 2002, der 80 % der Luftmenge direkt in die Abluftleitung führt, so dass mit den geforderten hohen Belüftungsraten gearbeitet werden kann, ohne die Fermentation zu stören, bringen allerdings keinen Erfolg. Daher wird für die nächste Kampagne der Einbau eines echten Sterilfilters mit definierter Porenweite von 0,2 µm eingeplant. Die Versuche mit dem Bypass werden mit PPL-Medium durchgeführt.

Dabei wird bereits in dieser Phase des Projekts deutlich, dass bei der Fermentation mit einem komplexen Medium aus einem natürlichen Produkt mit Schwankungen in der Qualität zu rechnen ist. Mit dem PPL vom Ende der Kampagne 2000/2001 werden bis zu 6 Mio. Z/mL und 4-5 g/L Paramylon erzielt. Die Versuche von Februar-Mai 2002 in Emlichheim unter sonst gleichen Bedingungen ergeben nur 3 g/L bei einer Zelldichte von etwa 3-4 Mio. Z/mL. PPL aus dieser Zeit wirkt auf den Organismus in geringen Maße wachstumshemmend, was sich aber nicht im Verhalten der Zellen äußert. Der Stickstoffgehalt einer 3 % Lösung liegt bei ca. 600 mg/L und damit eigentlich noch im gewohnten Bereich für ein verwendbares Medium. Die Ursache für das geringere Wachstum kann mit den zur Verfügung stehenden Methoden und unter Berücksichtigung der komplexen Zusammensetzung von PPL nicht geklärt werden. Auch bei dem Medium auf der Basis von Kartoffelfruchtwasser sind derartige Schwankungen zu erwarten.

Ab Herbst der ersten Kampagne treten Probleme mit allen Kulturen in KFW-Medium auf. Die Zellen bleiben vielfach rund und das Wachstum deutlich unter den bisher erreichten Werten. Die Laboranalysen zeigen einen ständigen Anstieg im Gesamtstickstoff des KFW. Zu Beginn der Kampagne im August lagen die Werte im 50 % verdünnten Medium bei 700 mg/L gegen Ende des Jahres steigen sie auf über 2500 mg/L. Ein normales Wachstum von *Euglena gracilis* lässt sich Anfangs noch durch stärkeres verdünnen des Mediums auf 30 % KFW erreichen. Darunter führt der geringe KFW-Anteil schnell zu Nährstoffmangel. Ab Dezember wird das in der UF-Anlage filtrierte Material im Technikum noch ein weiteres Mal ultrafiltriert. Mit dieser Maßnahme kann noch einige Zeit gearbeitet werden aber ab Januar ist auch dies unmöglich. Mit diesem Medium ist keine Fermentation von *Euglena gracilis* mehr möglich. Bei 30-50 % Verdünnung zeigt es eine stark hemmende Wirkung auf die Zellen und in geringerer Konzentration fehlen die Nährstoffe, so dass bereits nach 2-3 Tagen Mangelerscheinungen zu erkennen sind.

*Euglena gracilis* kann normalerweise ohne Probleme bei einem pH-Wert von 3 kultiviert werden (das synthetische Medium liegt ebenfalls unter pH 4), während viele Bakterien unter diesen Bedingungen im Wachstum gehemmt sind. Da eine Fermentation in der Pilotanlage wegen der ständigen Infektionen nicht gelingt, wird das Medium ab Oktober 2001 mit Schwefelsäure auf pH 3 eingestellt um Infektionen zu vermeiden und eine komplette Fermentation in der Anlage zu erreichen. Bakterielle Infektionen lassen sich damit in den Schüttelkulturen und im Biostat unterdrücken, während der saure pH-Wert auf Hefen weniger Einfluss hat.

Mit dem KFW-Medium ab Mitte November ist dies nicht mehr möglich. Beim Ansäuern werden offenbar Substanzen freigesetzt, die sofort toxisch auf die Zellen wirken. Proben aus frisch angeimpften Kulturen zeigen Zellen, die bewegungslos sind und die Geißeln verloren haben, wie es sonst beim Abtöten der Zellen mit Isopropanol für mikroskopische Aufnahmen vorkommt. Die Kulturen erholen sich auch nach mehr als einer Woche nicht wieder bzw. adaptieren nicht an diese Bedingungen. Kontrolltests im Kulturkolben zeigen, dass das Medium bei unverändertem pH von ca. 5,5 keine akut toxische aber trotzdem hemmende Wirkung hat. Eine vollständige Fermentation im Pilotfermenter gelingt daher auch mit dieser Maßnahme nicht.

Das Kartoffelbruchwasser verändert sich im Laufe der Kampagne in seiner Zusammensetzung. Während es am Beginn noch aus frisch gerodeten Kartoffeln hergestellt wird, sind es später eingelagerte Knollen, in denen vermutlich der Anteil an Abwehrstoffen (Alkaloide, inhibitorische Enzyme) gegen Mikroorganismen steigt. Das könnte auch der Grund für den ständig steigenden Gehalt an Gesamtstickstoff sein. Der Ertrag an Kartoffeleiweiß ist in dieser Kampagne allerdings insgesamt ungewöhnlich hoch. Im Hinblick auf eine Produktionsanlage wäre jedoch eine gleichbleibende Qualität notwendig, die mit dem KFW vor der Proteinfällung nicht gewährleistet ist.

Aus diesem Grund wird wieder das eKFW nach der Hitzekoagulation verwendet, in dem die toxischen Bestandteile weitgehend mit dem Protein ausgefällt werden und das eine gleichbleibendere Qualität hat. Die weitere Aufbereitung des Mediums bleibt wie bisher. Auch beim eKFW treten Schwankungen auf, wie sie bei einem natürlichen Produkt unausweichlich sind. Die Auswirkungen auf die Fermentation sind aber bei Weitem nicht so gravierend.

Im Gegensatz zu dem Laborverfahren fehlt der zweite Proteinfällungsschritt im Autoklaven und die Filtration über die Ultrafiltrationsanlage ist erheblich feiner als die Mikrofiltration, wie sie in Bielefeld eingesetzt wird. Mit diesem eKFW-Medium werden wieder Zelldichten von ca. 8 Mio. Z/mL erreicht. Zelldichte und Paramylonausbeute liegen 10-20 % unter den Werten, die mit dem eKFW-Medium aus dem Laborverfahren (Bielefelder-Medium) erreicht werden.

Das folgende Diagramm (Abb. 43) zeigt eine Fermentation mit eKFW-Medium (Emlichheimer-Verfahren) als Animpfkultur für die Pilotanlage. Obwohl die maximale Zelldichte noch nicht erreicht und die Glucose nicht verbraucht ist, wird aus organisatorischen Gründen zu diesem Zeitpunkt abgebrochen und in die Pilotanlage überimpft. Aufgetragen sind die Zelldichte, Glucosegehalt, pH-Wert und auch der Gehalt an Gesamtstickstoff im

zellfreien Medium. Die Werte für  $N_{\text{ges}}$  sinken im Verlauf der Fermentation, da *Euglena* Aminosäuren zum Aufbau von Biomasse benötigt. Trotz der Hitzeokoagulation, Ultrafiltration und der Verdünnung ist der Gehalt an verwertbaren Stickstoffkomponenten noch ausreichend.

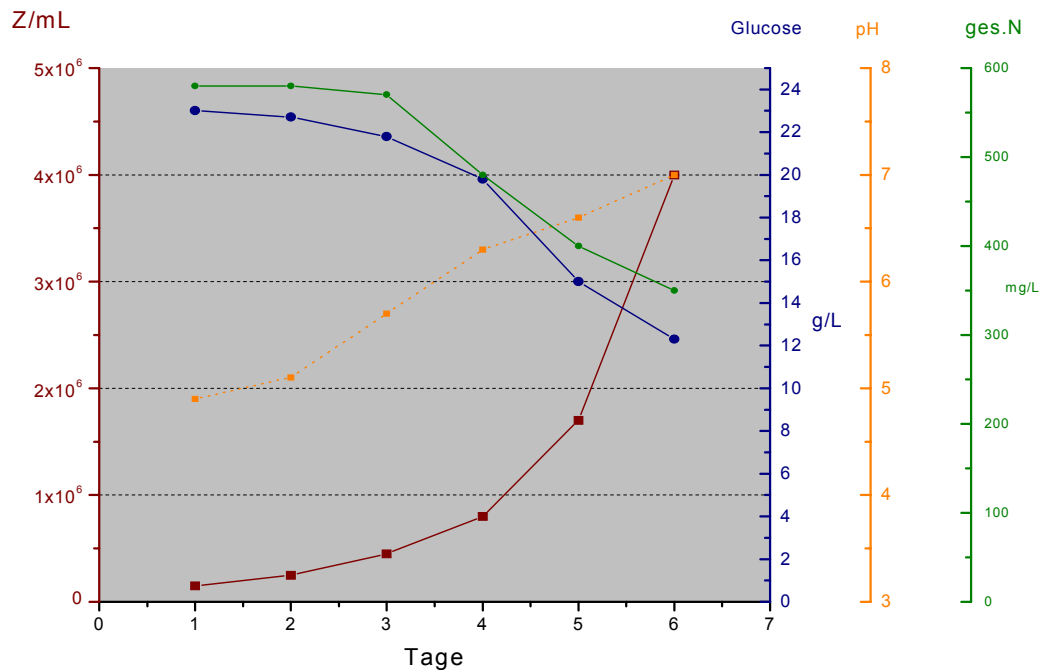


Abb. 43: Wachstumskurve im Biostat V mit „Emlichheimer“ eKFW-Medium

Da das eKFW aus einem anderen Bereich der Stärkefabrik transportiert werden muss, ist die Herstellung etwas aufwendiger als beim KFW-Medium, jedoch wesentlich einfacher als eine technische Produktion des „Bielefelder-Mediums“. In Tabelle 9 sind noch einmal die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Medien aufgelistet. Aufgrund der starken Qualitätsschwankungen ist das KFW-Medium nicht aufgeführt.

Tab. 9: Vergleich der verwendeten Medien

	synth. Medium	eKFW-Medium Laborverfahren (Bielefeld)	eKFW Medium Technikumverfahren (Emlichheim)	PPL-Medium
therm. Behandlung	Sterilisation	Proteinfällung Sterilisation	Sterilisation	Sterilisation
Filtration	-	Mikrofiltration	Ultrafiltration	Ultrafiltration
pH	3,3	5,4	5,5	5,5
LF (μS/cm)	2800	5050	5070	5800
ges. (N mg/L)	1500	689	612	680
maximale Zellichte (Z/mL)	>25 Mio.	8-10 Mio.	7-9 Mio.	5 Mio
Paramylon (g/L)	20	10	8	4-5
Generationszeit (h)	11	16	17	30

#### 4.2.2. Aufschluss und Aufarbeitung

Mit den Fermentationen aus der 1. Kampagne werden Versuche zur Aufarbeitung durchgeführt. Der Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisation (HDH, French Press) gelingt mit 3 Geräten verschiedener Anbieter etwa gleich gut. Bei 1000 bar werden die Zellen zu 100 % in einem Arbeitsgang aufgeschlossen. Die Testgeräte weisen eine Durchflussrate von ca. 10 L pro Stunde auf, so dass auch Suspensionen aus dem Fermenter aufgearbeitet werden können, die um den Faktor 50 –100 aufkonzentriert wurden (Abb. 44, 45).

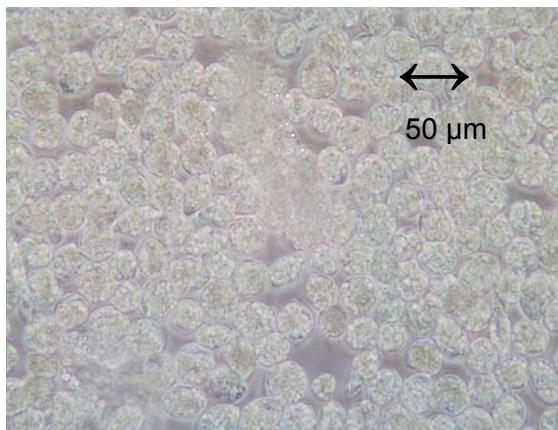


Abb. 44: Konzentrierte Zellsuspension (400 X Vergr.)



Abb. 45: Probe nach HDH-Aufschluss - keine intakte Zellen sichtbar (400 X Vergr.)

Da es sich hierbei immer um Kulturen mit bakteriellen Infektionen handelt, weisen die Konzentrate neben hoher Zelldichte von *Euglena gracilis* sehr viel bakterielle Biomasse auf. Die sich daraus ergebende hohe Viskosität sorgt bei den Geräten leicht zu verstopften Leitungen bzw. Ventilen. Bei der Auswahl für ein potentielles Gerät für eine Produktionsanlage wird daher nicht nur auf Aufschlussqualität und Scale up-Fähigkeit geachtet, sondern auf eine möglichst robuste und störungsfreie Funktion. Bei Fermentationen mit einigen Kubikmetern Inhalt muss das Volumen für die Aufarbeitung verringert werden, um die Dimensionen der benötigten Geräte und den Verbrauch an z.B. Tensiden möglichst klein zu halten. Bei den erwarteten Zelldichten von ca. 8-10 Mio. Z/ml werden die konzentrierten Suspensionen ähnlich hohe Biomasse und Viskosität wie diese Testkulturen aufweisen.

Die aufgeschlossene Suspension wird aufgeteilt und chemisch mit dem Tensid SDS und alternativ mit dem Enzym Alkalase aufgearbeitet.

Nach dem Aufschluss setzt sich das Paramylon als heller Bodensatz im Auffanggefäß ab und kann abzentrifugiert bzw. separiert werden. Je nach Grad der Verunreinigung wird SDS zugesetzt und mit heißem Wasser suspendiert. Nach 4-5 Waschvorgängen mit 80 °C heißem Wasser ist das Produkt reinweiß und das überschüssige Tensid ausgewaschen.



Die Menge des Waschwassers beträgt durchschnittlich 5 L pro Liter aufgeschlossener Suspension.

Bei der Aufarbeitung mit SDS hat sich die Zugabe des Tensids vor dem Aufschluss als hilfreich erwiesen. Eine leichte Braunfärbung kontaminierter Proben lässt sich so mit weniger SDS-Einsatz entfärben. Bereits beim Aufschluss findet eine bessere Durchmischung statt und somit eine bessere Abtrennung der Zellreste vom Paramylon. Das Paramylon ist bereits nach dem Aufschluss fast weiß und setzt sich schneller ab als ohne Tensid.

Die alternative Aufarbeitung mit dem Enzym Alkalase ist etwas zeitaufwendiger, da die Suspension noch 3 Stunden auf 50 °C temperiert werden muss, was aber für einen kontinuierlichen technischen Prozess keine Rolle spielt. Die verunreinigten Proben lassen sich enzymatisch nur mit mehreren zusätzlichen Schritten reinigen. Bei normalen Fermentationen ist eine einmalige Behandlung mit dem Enzym und 2-3 Waschvorgänge mit heißem Wasser ausreichend.

Der Vergleich der aufgearbeiteten Proben mit den Methoden, die bei der Emsland-Stärke GmbH für die Qualitätsbeurteilung von Stärke verwendet werden, zeigt ähnliche Werte, die bis auf die Keimzahl auch innerhalb des zulässigen Bereichs liegen (Tabelle 10).

Tab. 10: Analyse von Paramylon aus den beiden Aufarbeitungsverfahren

	<b>Aufarbeitung mit Alkalase</b>	<b>Aufarbeitung mit SDS</b>
Feuchtigkeit	12,9 %	14,0 %
N-Gehalt (absolut trocken)	0,01 %	0,01 %
Asche (h.ü)	0,1 %	0,1 %
Weißgrad Filter 2	97,8 %	97,2 %
Weißgrad Filter 8	96,5 %	95,8 %
Gesamtkeimzahl	1,8 · 10 <sup>7</sup> Kolonien/g	2,8 · 10 <sup>6</sup> Kolonien/g
Hefe + Schimmel	30 Kolonien /g	50 Kolonien /g
Schüttgewicht (A3301)	570 g/L	570 g/L
pH – Wert	7,0	7,6
el. Leitf.	14 µS/cm	50 µS/cm
Fettgehalt	0,03 %	neg.
Phosphat	neg.	neg.

Die Qualität der Aufarbeitungsmethoden unterscheidet sich nur geringfügig. Das Paramylon erfüllt in beiden Fällen bis auf die Keimzahl die Qualitätsvorgaben ( $10^5$  Kolonien/g), die z.B. für die Herstellung von Kartoffelstärke gefordert werden.

Da dieses Paramylon aus einer massiv verkeimten Fermentation stammt, liegen die Werte für die Keimzahl über den sonst üblichen Werten. Unter regulären Bedingungen können Keime erst beim Aufschluss und der Aufarbeitung mit Leitungswasser eingetragen werden, die sich durch die Trocknung bei 100 °C aber nicht weiter vermehren.

Der Weißgrad gegen BaSO<sub>4</sub> als Referenzsubstanz zeigt praktisch keine optisch messbaren Verunreinigungen. Über den Gehalt an Gesamtstickstoff können Rückschlüsse auf noch vorhandene Proteine gezogen werden. Die Aufarbeitungsmethoden sind in dieser Hinsicht gleichwertig und der Gehalt von 0,01 % N<sub>ges</sub> in der Trockensubstanz zeigt die gelungene Abtrennung. Das gleiche gilt für den geringen Aschegehalt mit dem u.a. anorganische Reste erfasst werden. Erhöhte Werte könnten hier z.B. aus den Rohrleitungen (Rost, Metallabrieb) stammen. Die Leitfähigkeit von nur 50 µS/cm zeigt weiterhin, dass auch das SDS bei den Waschvorgängen weitgehend entfernt wurde. Der geringe Fettgehalt bei der Alkalaseaufarbeitung liegt ebenfalls unter den Grenzwerten.

Die bei biotechnologischen Verfahren normalerweise sehr aufwendige Aufarbeitung lässt sich bei der Gewinnung von Paramylon mit verhältnismäßig einfachen Methoden und Hilfsstoffen durchführen. Die Qualität des Produkts entspricht den Vorgaben des Lebensmittelrechts.

### 4.3. Online-Analytik in der Laboranlage Hannover

#### 4.3.1. 2-D-Fluoreszenzspektroskopie

Nachdem der 1. Kampagneinsatz in Emlichheim trotz der diversen Probleme gezeigt hat, dass eine biotechnische Produktion von Paramylon aus Kartoffelfruchtwasser möglich ist, sollten für die 2. Kampagne die Möglichkeiten der online-Prozessanalytik untersucht werden. Durch das langsame Wachstum von *Euglena gracilis* und die daraus resultierende Anfälligkeit der Fermentation und speziell im Rückblick auf die Infektionsgefahr an der Pilotanlage in Emlichheim, bekommt eine nichtinvasive Analytik eine besondere Bedeutung. Die zahlreichen Forschungsarbeiten mit der 2-D-Fluoreszenz an *E. coli* und *S. cerevisiae* am Institut, haben gezeigt, dass mit Hilfe der online-Messungen eine Fermentation überwacht und gesteuert werden kann. Die erhaltenen Daten können weiterhin zur chemometrischen Modellierung und Prozessauslegung benutzt werden [17, 26-28, 39-43].

Im 1. Projektjahr (Frühjahr 2001) wurden bereits Proben aus Schüttelkulturen entnommen und offline in Küvetten (Hitachi F-4500) auf die Anwesenheit von messbaren Fluorophoren und signifikante Änderungen untersucht. Die diagonal verlaufenden Banden in den Fluoreszenzspektren stellen durch Rayleigh-Streuung und Spiegelung am Gitter des Monochromators verursachtes Streulicht dar. Die Spektren aus diesen Küvettenmessungen sind bedingt durch den unterschiedlichen Aufbau der Spektrometer nicht direkt auf die geplanten Messungen mit dem BioView-Sensor übertragbar [17, 40]. Sie zeigen aber, dass ein Einsatz der online-Methode sinnvoll ist und welche Bereiche des Spektrums von Bedeutung sind.

Da die Zusammensetzung bekannt und mit weniger Störungen zu rechnen ist, werden Kulturen im synthetischen Medium untersucht. Die Zelldichte wird parallel unter dem Mikroskop bestimmt.

Im reinen Medium ist nur ein breiter Peak bei einer Anregung von 350 nm und einer Emission von 450 nm zu sehen (Abb. 46), der im Bereich der NADH-Fluoreszenz liegt. Das Spektrum verändert sich trotz des hohen Volumens der Vorkultur beim Animpfen mit *Euglena gracilis* kaum. Im Verlauf der Kultivierung verringert sich die Intensität des Peak bei 450 nm Emissionswellenlänge und ein neuer Peak bei geringerer Wellenlänge (350 nm) erscheint. In diesem Bereich fluoresziert typischerweise die Aminosäure Tryptophan. Die Zunahme der Fluoreszenzwerte ist ein Resultat der gebildeten Biomasse (Abb. 47).

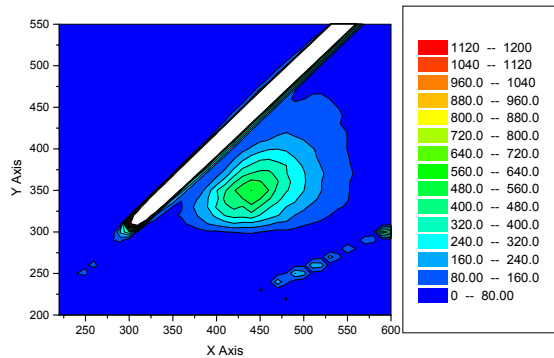


Abb. 46: Fluoreszenzspektrum zu Beginn der Kultivierung (synth. Medium  $1 \cdot 10^6$  Z/mL)

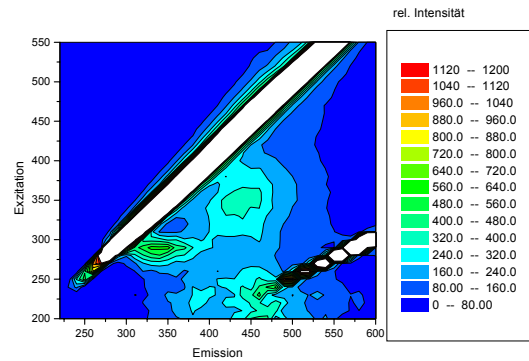


Abb. 47: Fluoreszenzspektrum nach 48 Stunden ( $10 \cdot 10^6$  Z/mL)

Der ursprüngliche Peak hat nach 72 Stunden (Abb. 48) deutlich an Intensität verloren und der Aminosäure-Peak ist wesentlich stärker geworden (relative Intensität steigt von 600 auf 1200 Einheiten). Die Zelldichte hat mit 25 Mio. Z/mL ihr Maximum erreicht und die Nährstoffe sind verbraucht.

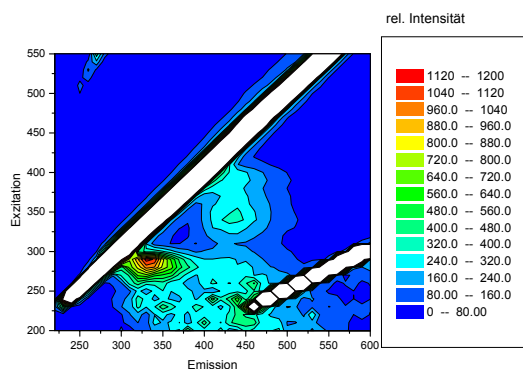


Abb. 48: Fluoreszenzspektrum nach 72 Stunden ( $25 \cdot 10^6$  Z/mL)

Bei der im Vergleich zu Bakterien geringen Stoffwechselrate von *Euglena gracilis* ist es vor allem die anwachsende Biomasse, die messbare Änderungen bei 290ex/350em verursacht. Die Konzentration der bei Stoffwechselvorgängen aktiven Elektronenüberträger NADH und FAD/FMN (Flavine) sind hingegen nur geringeren Schwankungen unterworfen.

In eKFW-Medium mit einer Konzentration von 40 % eKFW ist der Anteil fluoreszenzaktiver Stoffe so hoch, dass in unverdünnten Proben die Grundemission im Bereich von 400ex/480em zu einem hohen Peak führt der das gesamte Spektrum überlagert (Abb. 49). Bedingt durch Fluoreszenzlöschung (concentration quenching) werden andere Bereiche bei der Messung nicht mehr erfasst.

Für diese Messungen wird eKFW aus der Kampagne 2000/2001 verwendet, mit dem bis zu  $8 \cdot 10^6$  Z/mL erreicht werden.

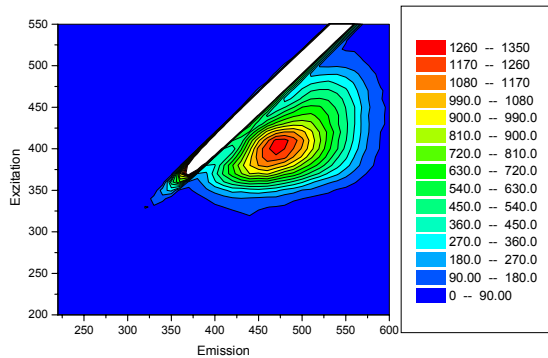


Abb. 49: Fluoreszenzspektrum von unverdünntem eKFW-Medium

Bei einer 10 % Verdünnung mit dest. Wasser ist der anwachsende Peak im Aminosäurebereich wie beim synth. Medium zu erkennen (Abb. 50). Zusätzlich bildet sich aber auch ein hoher Peak im Bereich von NADH (Abb. 51). Der Peak im Flavinderbereich taucht in den verdünnten Proben nicht auf.

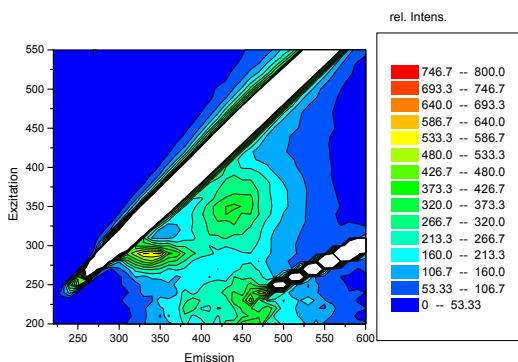


Abb. 50: Fluoreszenzspektrum einer *Euglena*-Kultur in eKFW-Medium (1/10 verdünnt) nach 24 Stunden

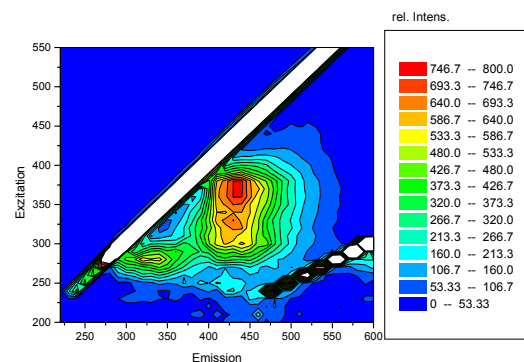


Abb. 51: Fluoreszenzspektrum nach 72 Stunden ( $8 \cdot 10^6$  Z/mL, 1/10 verdünnt)

Für den möglichen Einsatz des BioView-Sensor an der Pilotanlage wird nach der 1. Kampagne mit der Laboranlage in Hannover untersucht, wie das Wachstum von *Euglena gracilis* spektroskopisch verfolgt werden kann. Nachdem die offline gemessenen Proben von *Euglena*-Kulturen eine Veränderung vor allem im Bereich der Aminosäuren zeigen, wird ein BioView-Spektrometer an einen Biostat UD Fermenter angeschlossen und eine Kultivierung in eKFW-Medium über 200 Stunden online verfolgt. Der BioView-Sensor verwendet für die Messungen Filterkombinationen, die keine größere Exzitations- als Emissionswellenlänge aufweisen, da in diesem Bereich keine Fluoreszenz auftreten kann. Die Spektren weisen daher keine diagonalen Streulichtbanden auf.

Nach 4 Tagen erreicht die Fermentation die maximale Zelldichte und die Kultur geht in die stationäre Phase bzw. Absterbephase über. Mit dieser Charge eKFW vom Ende der

Kampagne im Januar 2002 werden geringere Zelldichten als vorher erreicht (ca.  $5 \cdot 10^6$  Z/mL), ohne dass hemmende oder toxische Wirkungen auf die Zellen zu erkennen sind.

Neben den Peaks im NADH- und Aminosäure-Bereich erscheint noch ein hoher Peak bei 450ex/530em (Flavine), der bei den Küvettenmessungen mit dem Hitachi F 4500 in den verdünnten Proben nicht erfasst wird (Abb. 52). Die hohe Eigenfluoreszenz des Mediums im NADH- und Flavin-Bereich (1400 RFI) täuscht einen starken Anstieg in diesem Bereich vor.

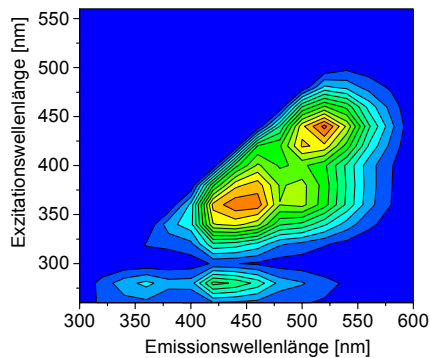


Abb. 52: Fluoreszenzspektrum in eKFW-Medium zu Beginn der Fermentation (200 000 Z/mL)

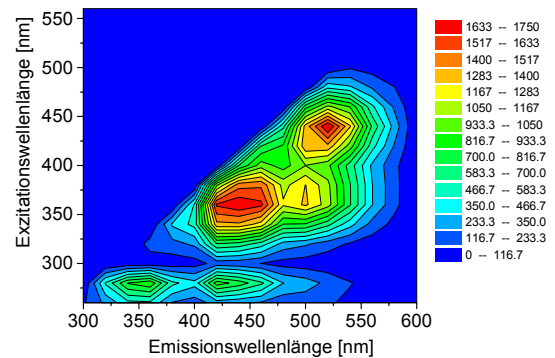


Abb. 53: Fluoreszenzspektrum nach 96 Stunden bei einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Z/mL

Ein Differenzspektrum, in dem das Anfangsspektrum (nach Animpfen) vom Spektrum zum gewählten Zeitpunkt abgezogen wird, gibt einen besseren Überblick über die tatsächlichen Veränderungen (Abb. 54).

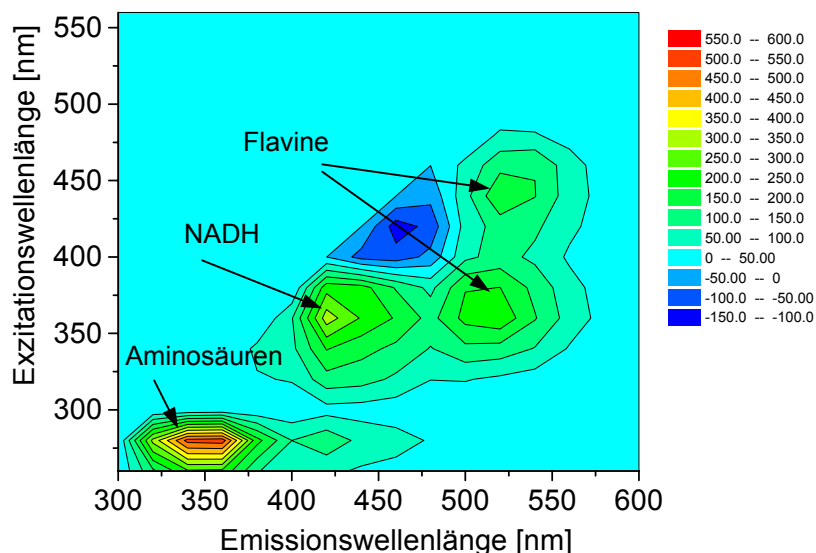


Abb. 54: Differenzspektrum der Fermentation nach 96 Stunden

Über den Kultivierungszeitraum von 4 Tagen zeigt sich vor allem ein starker Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität im Bereich der Aminosäuren und geringere Veränderungen bei NADH und Flavinen. Da die absoluten Werte im Differenzspektrum kleiner sind, kann eine kleinere Skalierung gewählt werden.

Für eine Fermentation von *Euglena gracilis* ist daher die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 290 nm und Emission von 350 nm von besonderem Interesse, da sie die Zunahme der Biomasse und indirekt an Paramylon signalisiert.

Die Spektren werden im Abstand von 15 Minuten aufgezeichnet und die gemessenen Fluoreszenzwerte im zeitlichen Ablauf dargestellt (Abb. 55). Weiterhin werden täglich Proben aus dem Fermenter entnommen und mikroskopisch die Zelldichte bestimmt. Nach ca. 90 Stunden geht die Kultur in die stationäre-Phase über, Zelldichte und Paramylongehalt bleiben für einige Zeit konstant, bis zum Absterben der Kultur. Dies wäre der Hinweis auf den „Erntezeitpunkt“ für die Pilotanlage bzw. eine wirtschaftliche Nutzung.

Der Vergleich der Zelldichten mit dem Fluoreszenzverlauf bei 290ex/350em spiegelt die Wachstumskurve wieder. Eine qualitative Abschätzung des Wachstums ist möglich und die verschiedenen Phasen der Fermentation von der Lag-Phase am Anfang bis zur stationären Phase am Ende sind erkennbar.

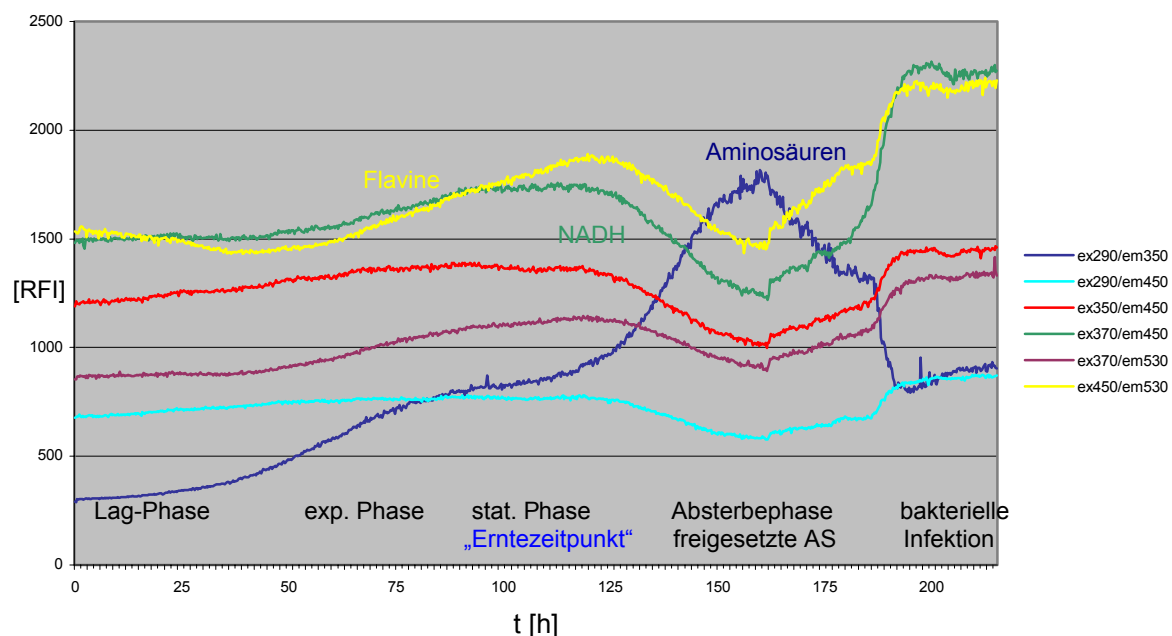


Abb. 55: zeitlicher Verlauf ausgewählter Fluoreszenzwerte

In der stationären Phase bleiben die Werte für Aminosäuren und NADH konstant, während die der Flavine noch weiter leicht steigen. Nach 120 h sinken die Fluoreszenzintensitäten für NADH (ex370/em450) und Flavine (ex450/em530), was auf nachlassende Stoffwechselaktivität hinweist. Die Aminosäure-Fluoreszenz steigt stark an, während die mikroskopisch ermittelte Zelldichte sinkt. Die bei der Lysis der abgestobenen Zellen freigesetzten Aminosäuren haben eine höhere Fluoreszenzintensität als im gebundenen Zustand, weshalb das BioView-Signal hier einen starken Anstieg zeigt. Nach 175 Stunden tritt eine bakterielle Infektion auf, die am rapiden Anstieg der Stoffwechselaktivität (NADH, Flavine) zu erkennen ist. Nach 190 Stunden sind alle Nährstoffe auch für die Bakterien verbraucht und die Fermentation tritt in eine weitere stationäre Phase.

Das Diagramm zeigt auch, dass die zusätzlich ausgewählten Wellenlängen keine weitere Information liefern, weshalb sie in den weiteren Spektren nicht mehr aufgeführt werden. Die entscheidenden Hinweise für den Fermentationsprozess von *Euglena gracilis* unter diesen Bedingungen ergeben sich aus dem Fluoreszenzverlauf im Bereich der Aminosäuren (blau), NADH (grün) und Flavinen (gelb).

Anhand der gleichzeitig aufgenommenen Daten mit der RISP (pH, pO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>-Abgas) lässt sich die Fermentation gut verfolgen und die Ergebnisse der BioView-Messung können untermauert werden. Typisch für die Fermentation von *Euglena gracilis* in Kartoffelbruchwasser ist der langsame und gleichmäßige Anstieg des pH-Wertes, wie in Abb. 56c. Für den pO<sub>2</sub>-Wert ist die Anlage mit Druckluft bei 0,5 V/V<sub>M</sub> kalibriert worden (Abb. 56b). Im Lauf der Fermentation steigt der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Abgas an und erreicht nach etwa 70 Stunden den Höchstwert, wodurch das Ende der exponentiellen Phase markiert wird (Abb. 56a). Danach sinkt der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Abgas wieder ab und erreicht nach ca. 100 Stunden ein Plateau. Der pO<sub>2</sub>-Wert zeigt den nahezu umgekehrten Verlauf, wobei das Plateau etwas früher erreicht wird. Zwischen 120 –160 Stunden treten keine Veränderungen auf, die auf Zellwachstum oder sonstige Stoffwechselaktivitäten hinweisen. Der starke Anstieg beim Aminosäuresignal des BioView-Sensor in diesem Zeitraum kann daher nicht auf Zellwachstum beruhen. Die Annahme, dass die freigesetzten Aminosäuren aus der lysierten Biomasse die wachsenden RFI-Werte verursachen wird bestätigt.

Die Messungen bestätigen die Ergebnisse des BioView-Sensor und der mikroskopischen Untersuchungen, dass nach vier Tagen die stationäre-Phase erreicht ist und die Kultur danach in die Absterbe-Phase übergeht. Der pH-Wert bleibt konstant während der Sauerstoffverbrauch und damit die CO<sub>2</sub>-Produktion sinkt. Nach 175 Stunden ist die Infektion unter dem Mikroskop zu erkennen, die einen starken pH-Anstieg (vmtl. NH<sub>3</sub>-Bildung) und



Sauerstoffverbrauch sowie CO<sub>2</sub>-Produktion verursacht. Wie schon bei den Fluoreszenzverläufen (NADH, Flavine) bewirkt die schnelle Teilungsrate bzw. der schnelle Stoffwechsel der Bakterien eine sprunghafte Veränderung der Parameter in wenigen Minuten, während sich eine Fermentation von *Euglena gracilis* durch langsamere Änderungen auszeichnet.

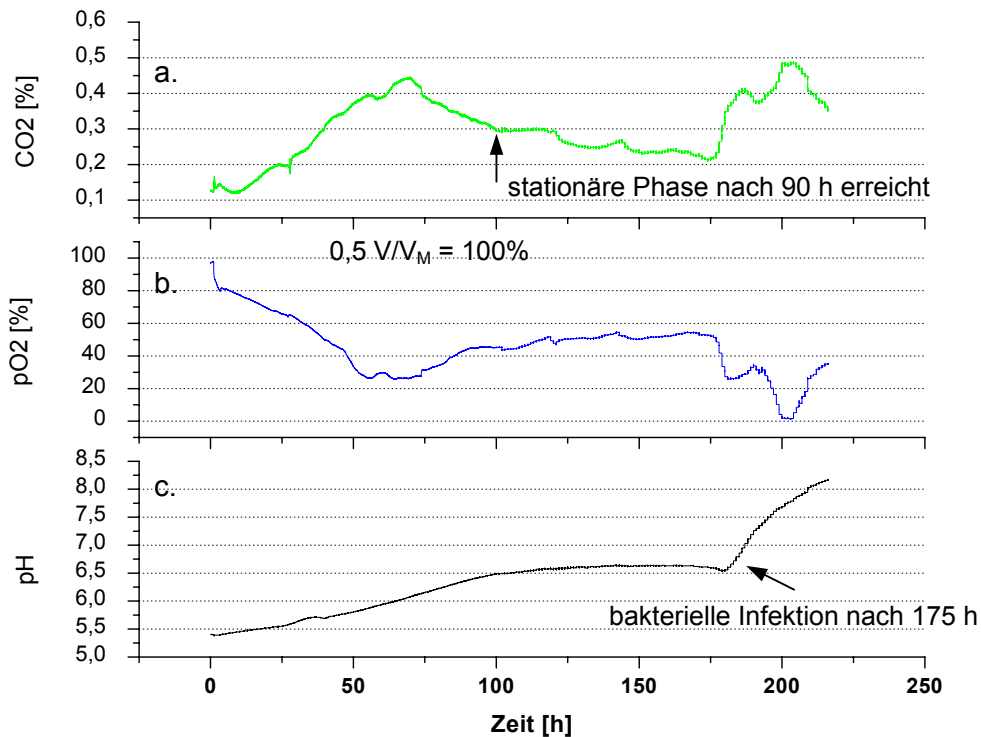


Abb. 56: Online Fermentationsdaten der RISP

Die Kombination aus BioView- und RISP-Daten ermöglicht eine umfassende Beurteilung des Zellwachstums und des Zustandes der Kultur während jeder Phase der Fermentation. Für die Kontrolle des eigentlichen Fermentationsprozesses ist der Übergang von der exponentiellen- zur stationären Phase von Bedeutung, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Paramylonkonzentration vorliegt und die Aufarbeitung noch nicht durch Zelltrümmer etc. behindert wird. Das folgende, verkürzte Diagramm stellt daher den Fluoreszenzverlauf für NADH, Flavine und Aminosäuren bis zur stationären Phase dar. Die relativen Fluoreszenzintensitäten für NADH und Aminosäuren liegen verhältnismäßig weit auseinander, weshalb für die Fluoreszenz bei 290ex/350em eine kleinere Skalierung gewählt wird (Abb. 57). Der Anstieg der Werte im Aminosäurebereich weist auf wachsende Biomasse hin, was mit den mikroskopisch ausgezählten Zelldichten bestätigt wird.

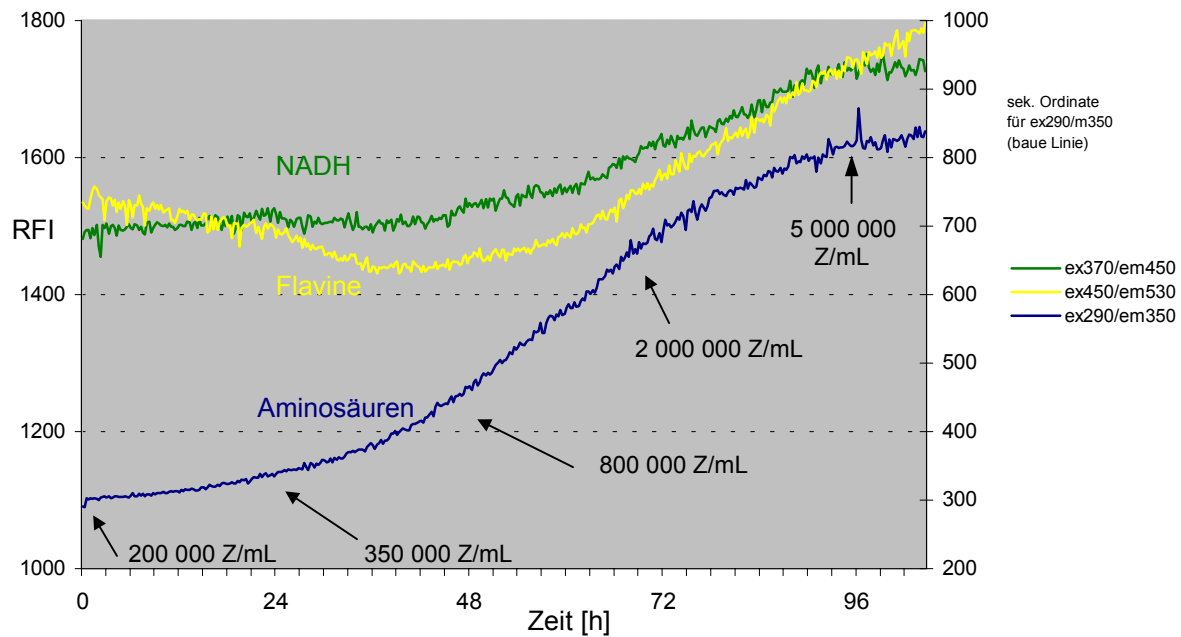


Abb. 57: Darstellung der Fluoreszenzdaten und der mikroskopisch ermittelten Zelldichten

Die Eigenfluoreszenz des Mediums auf der Basis von Kartoffelfruchtwasser unterliegt gewissen Schwankungen, die z.B. durch Lagerung und Art der Vorbehandlung verursacht werden und besonders bei verschiedenen Chargen zu sehen sind. Der Vergleich der Fluoreszenzwerte mit der Zelldichte in verschiedenen Fermentationen ist daher nur qualitativ. Aus dem Fluoreszenzverlauf ist ersichtlich, ob die Fermentation normal verläuft oder in irgendeiner Weise gestört wird. Korrekturmaßnahmen können somit schneller ergriffen werden.

Bedingt durch das erheblich schnellere Wachstum von Bakterien aber auch Hefen zeigt sich im Fall einer Infektion oft ein stärkerer Anstieg der „Aminosäure-Fluoreszenz“ und im Bereich der Flavine und des NADH ex370/em450, ex450/em530 kommt es zu sprunghaften Veränderungen (Anstieg/Abfall). Je nach Art und Zeitpunkt der Infektion können diese stark variieren. Auch die Veränderungen bei pH,  $pO_2$  und den Abgaswerten können erhebliche Unterschiede zeigen, so dass die Kombination aus BioView-Sensor und den anderen Online-Daten eine bessere Bewertung erlaubt, als es mit einer Methode allein möglich wäre.

In Abbildung 58 zeigt die Kurve für den NADH-Bereich dieser mit Bakterien kontaminierten Kultur bereits nach ca. 24 Stunden einen irregulären Verlauf und nach 48 Stunden einen steilen Anstieg auf 2500 RFI. Auch die Fluoreszenzwerte im Flavin- und Aminosäure-Bereich steigen stärker, als es bei einer reinen *Euglena*-Kultur der Fall wäre.

Nach 48 Stunden sind erste Bakterien unter dem Mikroskop sichtbar (Abb. 60) und nach 72 Stunden ist die Fermentation von Bakterien überwachsen, die sich mit Zellresten und

Paramylonkörpern zu Clustern zusammen ballen (Abb. 61). Die Anwesenheit der Bakterien hat vorerst keinen Einfluss auf die Vitalität von *Euglena gracilis*. die Zellen bleiben aktiv und beweglich, können aber aufgrund des verringerten Nährstoffangebotes nicht mehr wachsen. Die Zelldichte stagniert bei ca.  $3 \cdot 10^6$  Z/mL und sinkt danach ab.

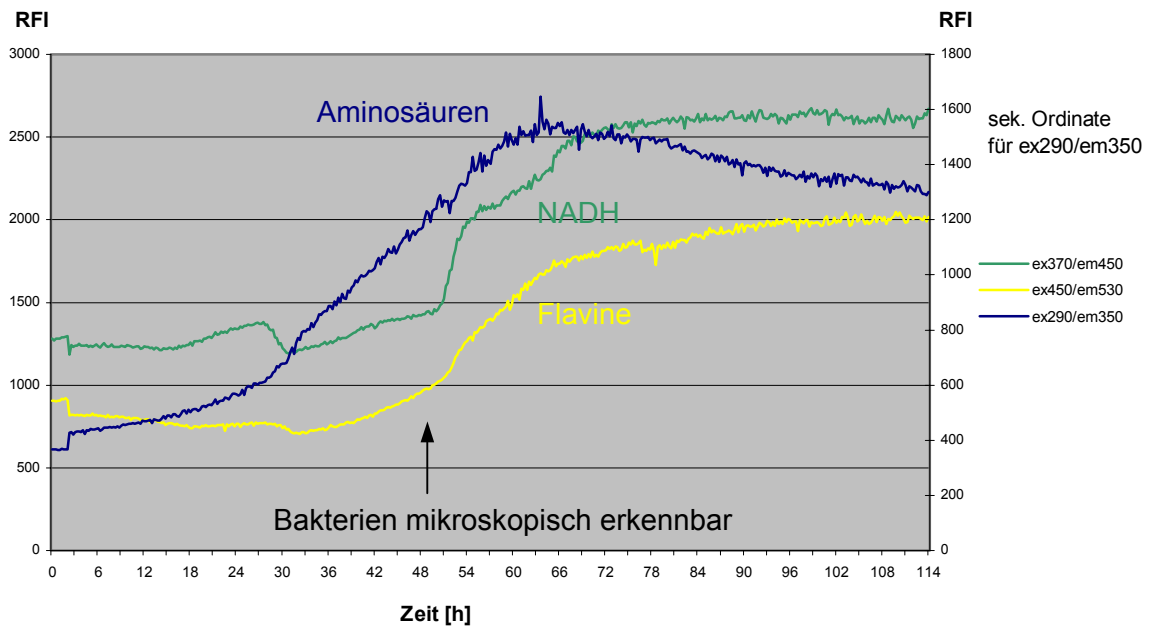


Abb. 58: Fluoreszenzverlauf einer Fermentation mit Infektion durch Bakterien

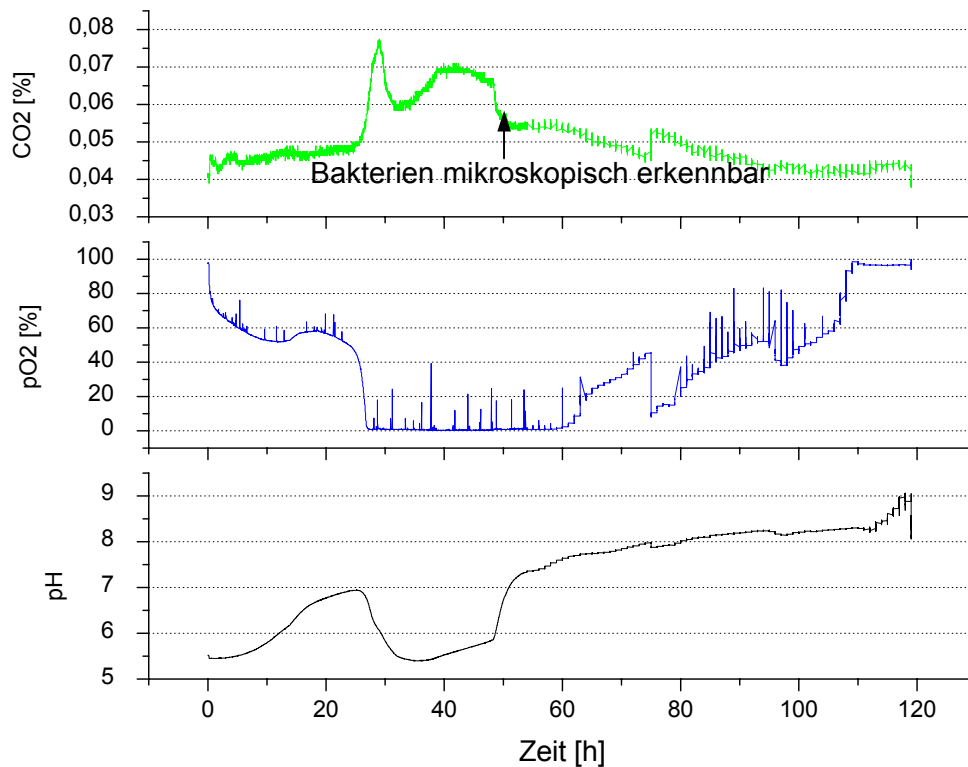


Abb. 59: Online-Daten der RISP

Nach 24 Stunden kommt es zu einem Einbruch beim  $pO_2$ - und pH-Wert (Lactat-Produktion) bzw. Anstieg des  $CO_2$  im Abgas, was auf eine Infektion hinweist (Abb. 59). Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine Bakterien unter dem Mikroskop erkennbar.

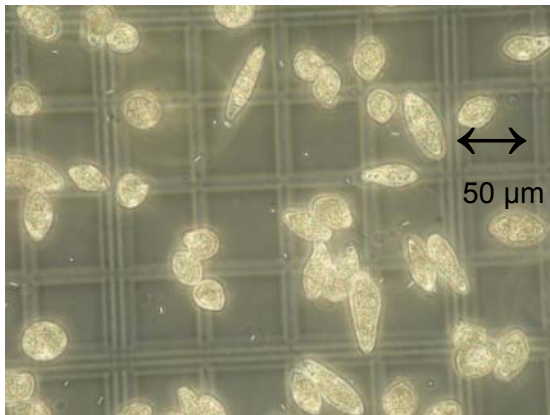


Abb. 60: Probe der infizierten Kultur nach 48 Stunden (400x Vergr.)

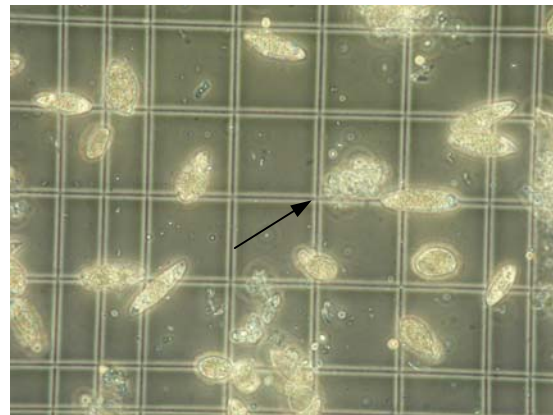


Abb. 61: Probe nach 72 Stunden  
Bakterien bilden Zellcluster (Pfeil)

Bei der folgenden Fermentation steigt die NADH-Kurve (grün) nach 36 Stunden leicht an, während sie vorher stetig gesunken ist und sinkt nach ca. 50 Stunden in kurzer Zeit ab (Abb. 62). Dies ist ein erster Hinweis auf eine Störung der Fermentation. Obwohl die Kultur nach 72 Stunden vollkommen von Bakterien überwachsen ist (Abb. 65), sind nur ungewöhnlich geringe Veränderungen im NADH- und Flavin-Bereich zu erkennen. Die relative Intensität steigt zu keinem Zeitpunkt über 1500 RFI.

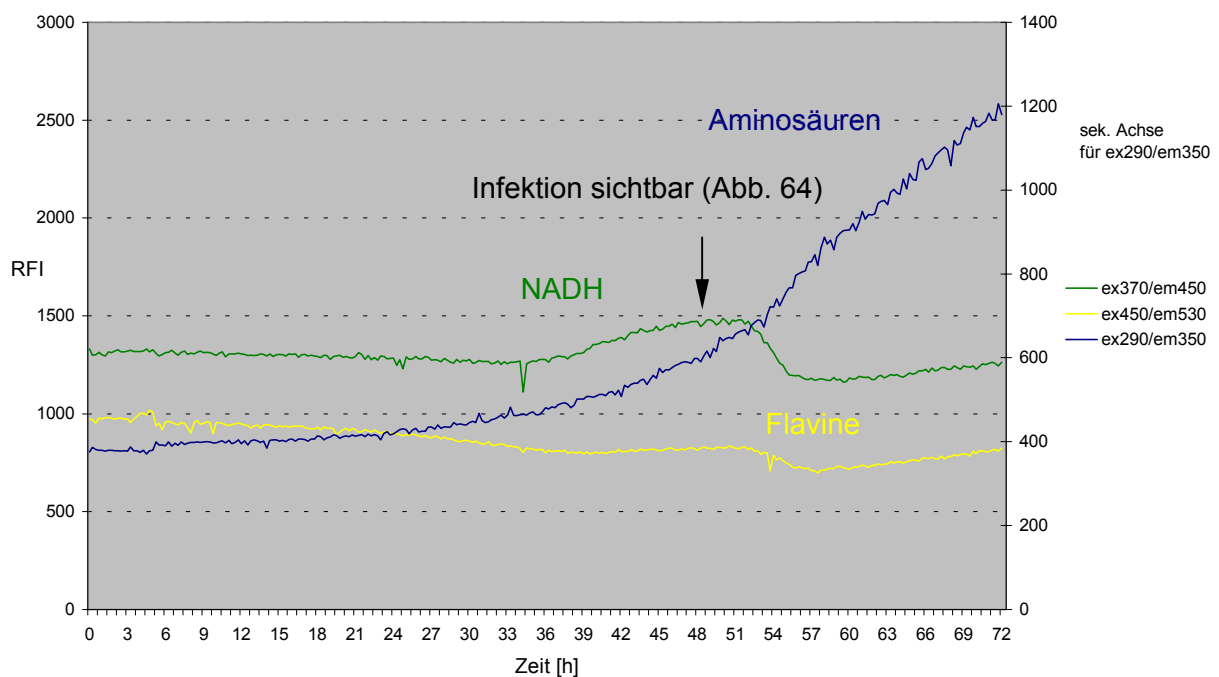


Abb. 62: Fluoreszenzverlauf einer infizierten Kultur mit geringer Fluoreszenzaktivität

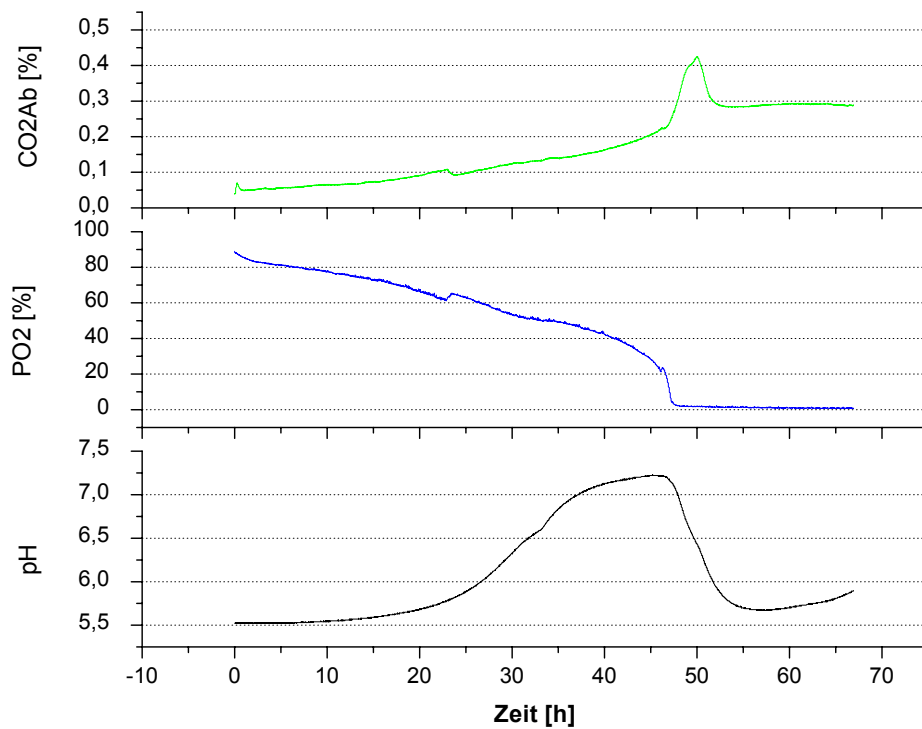


Abb. 63: Online-Daten der RISP zu Abb. 62

Bis etwa 48 Stunden scheint die Fermentation normal zu verlaufen. Dann sinken pH und  $pO_2$  ein und der  $CO_2$ -Gehalt der Abluft steigt plötzlich an (Abb. 63). Hier beginnt die exponentielle Phase der Bakterien, die Glucose verstoffwechseln und dabei  $CO_2$  und Lactat produzieren. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Belüftungsrate von  $0,5 V/V_M$  für *Euglena gracilis* wird der Sauerstoff schnell verbraucht und der  $pO_2$ -Wert sinkt auf 0 %. Unter anaeroben Bedingungen zeigen die Bakterien geringere Stoffwechselaktivität, wodurch sich auch die geringe Fluoreszenzaktivität in Abbildung 62 erklären lässt.

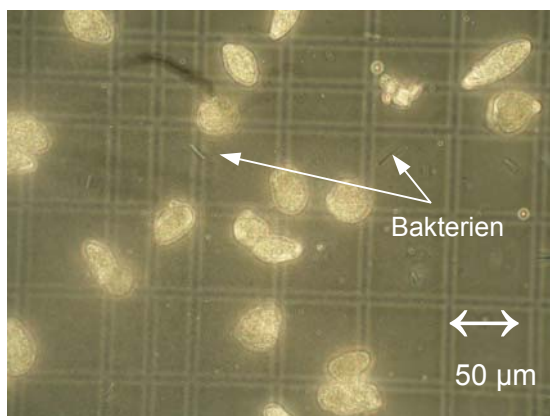


Abb. 64: Probe nach 48 h mit ersten erkennbaren Bakterien (400x Vergr.)

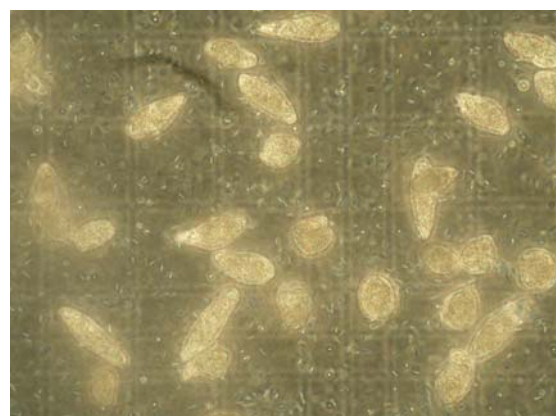


Abb. 65: Probe der von Bakterien überwachsenen Kultur nach 72 h

Infektionen fallen fast immer durch signifikante Veränderungen der RISP-Daten auf, während sonstige Störungen der Fermentation durch die geringe Stoffwechselaktivität von *Euglena gracilis* nicht immer über pH, pO<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>-Gehalt messbar sind. Auch der Übergang der Kultur in die Absterbephase wird mit den klassischen Methoden nicht sicher erkannt, so dass mit Hilfe der Fluoreszenzdaten der Zeitpunkt für die Aufarbeitung besser erkannt und damit die Produktivität einer Fermentationsanlage erhöht werden kann. Die Daten aus verschiedenen Fermentationen können auch zur Modellierung des Prozesses und zur Auslegung einer Fermentationsanlage genutzt werden. Voraussetzung sind ausreichend Daten, die unter gleichen Bedingungen gemessen werden. In der 2. Kampagne soll der BioView-Sensor daher nach Möglichkeit an der Pilotanlage in Emlichheim eingesetzt werden. Interessant wäre vor allem, ob sich die Fluoreszenzeigenschaften des Mediums im Lauf der Kampagne ändern. In der Laboranlage Hannover wurden bis dahin nur 2 verschiedene Chargen eKFW eingesetzt, während in Emlichheim wöchentlich frisches Medium aufbereitet wird.

#### 4.3.2. Insitu-Mikroskop

Aufgrund des verhältnismäßig langsamen Wachstums von *Euglena gracilis* sind speziell in den ersten 48 Stunden einer Fermentation nur geringe Veränderungen in der Kulturlösung messbar. Eine Kontrolle der Vitalität der Zellen ist mit den üblichen Messgrößen wie der optische Dichte, pH, pO<sub>2</sub> als auch dem Glucoseverbrauch in dieser Zeit nicht möglich und auch mit dem BioView-Sensor können etwaige Störungen gerade in der Startphase kaum erkannt werden. Dagegen kann man unter dem Mikroskop anhand von Aktivität und Morphologie der Zellen erkennen, ob die Bedingungen gut sind. Unter optimalen Bedingungen sollten die Zellen schon kurze Zeit nach dem Animpfen bereits wieder ihre längliche Form zeigen und sich aktiv bewegen. Ein hoher Anteil kugelförmiger oder bewegungsloser Zellen weist dagegen auf Probleme hin, die z.B. durch Scherstress oder störende Medienbestandteile hervorgerufen werden können.

Eine tägliche Probenahme und Bewertung der Kultur unter dem Mikroskop ist daher notwendig. Da jede Probenahme ein generelles Infektionsrisiko darstellt, werden für dieses Projekt Fermentationen mit dem Insitu-Mikroskop durchgeführt. Das optische System des Insitu-Mikroskop ist über einen Standardport in den Fermenter eingebaut und wird mit der kompletten Anlage sterilisiert. Während der Fermentation kann dadurch jederzeit direkt im Fermenter das Verhalten der Zellen beobachtet und eventuelle Störungen registriert und

soweit möglich auch behoben werden. Mit Hilfe einer entsprechenden Auswertesoftware kann prinzipiell auch die Zelldichte bestimmt werden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eingesetzt wurde. Die CCD-Camera des Gerätes liefert ein Schwarz-Weiß-Bild mit 400 facher Vergrößerung auf den Monitor. Mit Hilfe geeigneter Software können Fotos oder auch Videosequenzen aufgenommen werden.

Die Probezone des Gerätes kann stufenlos geschlossen werden, bis die Eigenbewegung der Organismen nicht mehr von den Strömungsverhältnissen im Fermenter beeinflusst wird, wodurch z.B. auch einzelne Bakterien sichtbar und von Feststoffanteilen in der Kulturlösung unterscheidbar werden. Mögliche Infektion durch Bakterien und Hefen sind dadurch früher als mit anderen Methoden erkennbar, so dass mit einem frühzeitigen Abbruch Zeit eingespart werden kann. Normalerweise fällt eine Infektion erst in der exponentiellen Phase der Fremdorganismen auf, wenn der Sauerstoff- und Glucoseverbrauch stark ansteigt, der OD-Wert steigt oder bei sprunghaften pH-Änderungen.

Mit dem Mikroskop lässt sich auch Nährstoffmangel im Medium z.B. durch zu starke Verdünnung erkennen. Die Zellen weisen eine veränderte Form und Hohlräume im Cytoplasma auf, da das Paramylon verbraucht wird. Durch Zufüttern mit frischem Medium kann der Nährstoffmangel evtl. noch rechtzeitig behoben werden.

Zum Fermentationsende häufen sich Zelltrümmer und einzelne Paramylonkörper aus abgestorbenen Zellen im Medium, die den Zeitpunkt für die Aufarbeitung und im Fall einer repeated batch für das Auffüllen mit frischem Medium markieren.

Die Auswirkung von Stressbedingungen zeigen sich oft dadurch, dass die Zellen eine Kugelform annehmen, die mit diesem System online in der Anlage beobachtet werden kann. Die folgenden Aufnahmen (Abb. 66-69) sind mit dem Insitu-Mikroskop während einer 5-tägigen Batch-Kultur in eKFW-Medium entstanden. Die Bilder zeigen die normale Form und Füllung der Zellen mit Paramylonkörpern. Abbildung 67 zeigt eine Kultur in der bereits einzelne Bakterien vorhanden sind, die auf dem Foto nicht zweifelsfrei zu erkennen sind. Auf dem Livemonitor sind die Bewegungen der Zellen und auch der Bakterien dagegen eindeutig sichtbar.

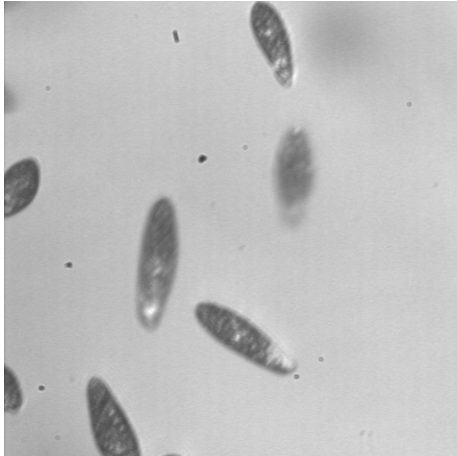


Abb. 66: Aufnahme mit dem Insitu-Mikroskop von *Euglena gracilis* in der Laboranlage nach 24 h (400x Vergr.)



Abb. 67: Aufnahme mit dem Insitu-Mikroskop nach 48 h, in der einzelne Bakterien zu erkennen sind

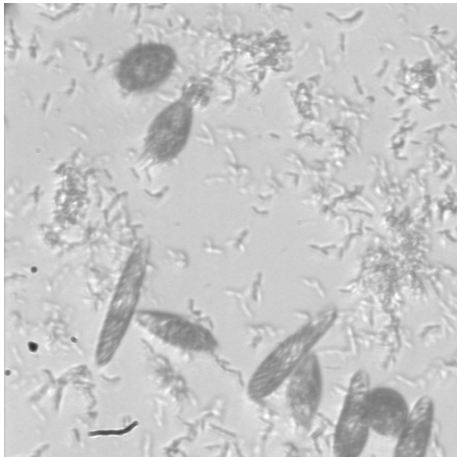


Abb. 68: Aufnahme mit dem Insitu-Mikroskop nach 72 h bei starken Befall

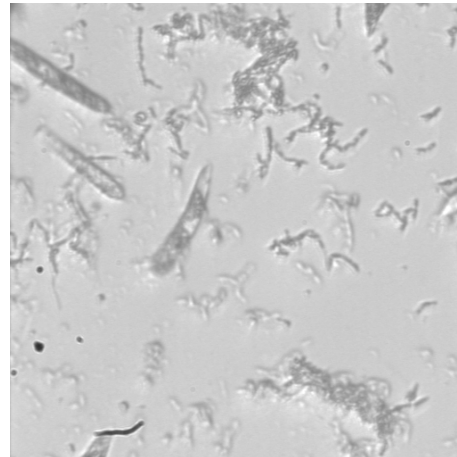


Abb. 69: Aufnahme mit dem Insitu-Mikroskop in der *Euglena gracilis* Anzeichen von Nährstoffmangel zeigt (120 h)

Abbildung (68) zeigt eine stark verkeimte Kultur von *Euglena gracilis*, in der die Zellen keine Abweichungen in Form und Beweglichkeit im Vergleich zu gesunden Kulturen zeigen. Durch die Nahrungskonkurrenz der Bakterien kommt es aber in den nächsten Tagen zu Nährstoffmangel und Verbrauch der Paramylonreserven. Die Zellen weisen eine eher längliche und schmale Gestalt mit freien Zellinnenräumen auf (Abb. 69).

Sowohl der BioView-Sensor als auch das Insitu-Mikroskop stellen eine ständige Lichtquelle dar, so dass deren Einfluss auf den Organismus überprüft werden muss. Aus der Stammhaltung ist bekannt, dass die Zellen auch nach mehreren Monaten unter heterotrophen Konditionen in der Lage sind bei ausreichendem Licht den Stoffwechsel wieder auf Photosynthese umzustellen. Die nachfolgenden Bilder zeigen eine phototrophe Kultur bei



400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Die Chloroplasten in den Zellen sind deutlich sichtbar (rot) und auch der Zellkern zeigt in diesem Zustand fluoreszenzaktive Substanzen an (blaue Struktur in Abb. 70). Heterotrophe Zellen sind unter diesen Bedingungen nicht sichtbar, da sie kein Chlorophyll mehr enthalten und auch der Zellkern keine Fluoreszenzaktivität aufweist.

Abbildung 71 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer heterotrophen Kultur, die im Biostat UD nach Abschluss der Fermentation (140 Stunden) noch 12 Stunden mit der Fermenterbeleuchtung (20 W) beleuchtet wurde. Auch wenn die Kulturlösung noch keine Grünfärbung zeigt, beginnen die Zellen bereits wieder Chlorophyll aufzubauen und erscheinen schwach sichtbar im Fluoreszenzlicht.

Oberhalb der Kulturlösung hat sich bereits eine grüne Schicht aus phototrophen Zellen am Rand des Fermenters abgesetzt.

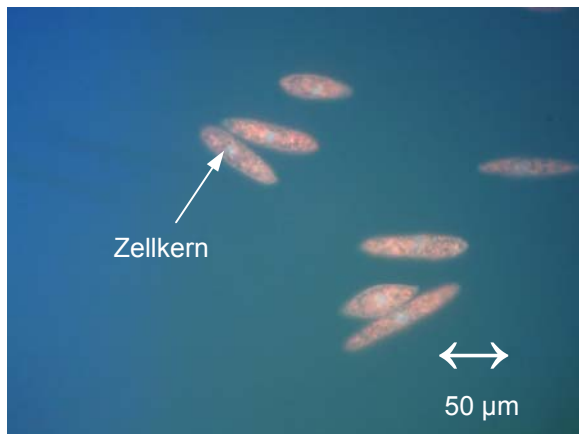


Abb. 70: Fluoreszenzaufnahme phototropher Zellen (400x Vergr.)

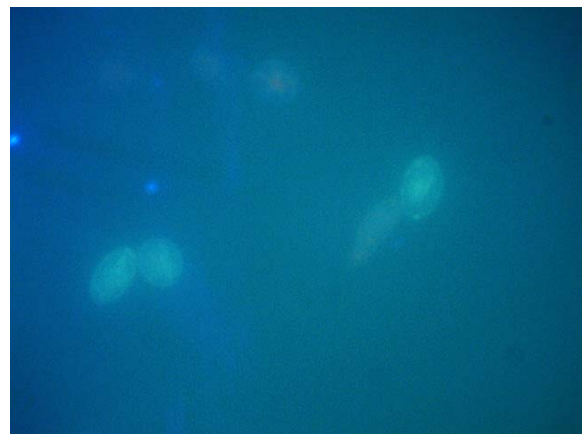


Abb.71: Fluoreszenzaufnahme bei beginnender Photosynthese

Vor Einschalten der Beleuchtung wurde eine Probe der Kultur unter dem Mikroskop untersucht, die keine im Fluoreszenzlicht sichtbaren Zellen zeigt. Auf diese Weise kann gezeigt werden, dass der Lichteintrag durch Insitu-Mikroskop und BioView-Sensor keinen Einfluss auf die Fermentation unter heterotrophen Bedingungen hat. Die Lichtintensität ist selbst in dem verwendeten 10 L-Reaktor zu gering, um *Euglena gracilis* zur Photosynthese anzuregen.

#### 4.4. 2. Kampagne an der Pilotanlage Emlichheim

Für die zweite Projektkampagne 2002/03 ist die Pilotanlage in Emlichheim mit neuen Sterilfiltern (Pall) ausgestattet worden. In der Luftleitung befindet sich jetzt ein  $0,2\ \mu\text{m}$  Filterelement und die gesamte Leitung ist überarbeitet worden. Auch die Substratleitung wurde verkürzt, Heizwendel und Wärmetauscher entfernt und stattdessen ein  $0,2\ \mu\text{m}$  Flüssigkeitsfilter eingesetzt (Abb. 72). Durch die vorherige Ultrafiltration ist das Kartoffelfruchtwasser in dieser Hinsicht problemlos zu handhaben. Die Anlage kann mit Flussraten von mehr als 500 L/h gefüllt werden, ohne dass sich der Filter zusetzt. In allen Leitungen werden etwaige Totzonen, in denen sich Kondenswasser sammeln könnte, entfernt. Die bis dahin erkannten Risikofaktoren für eine Infektion sind bis Anfang Oktober 2002 entfernt.

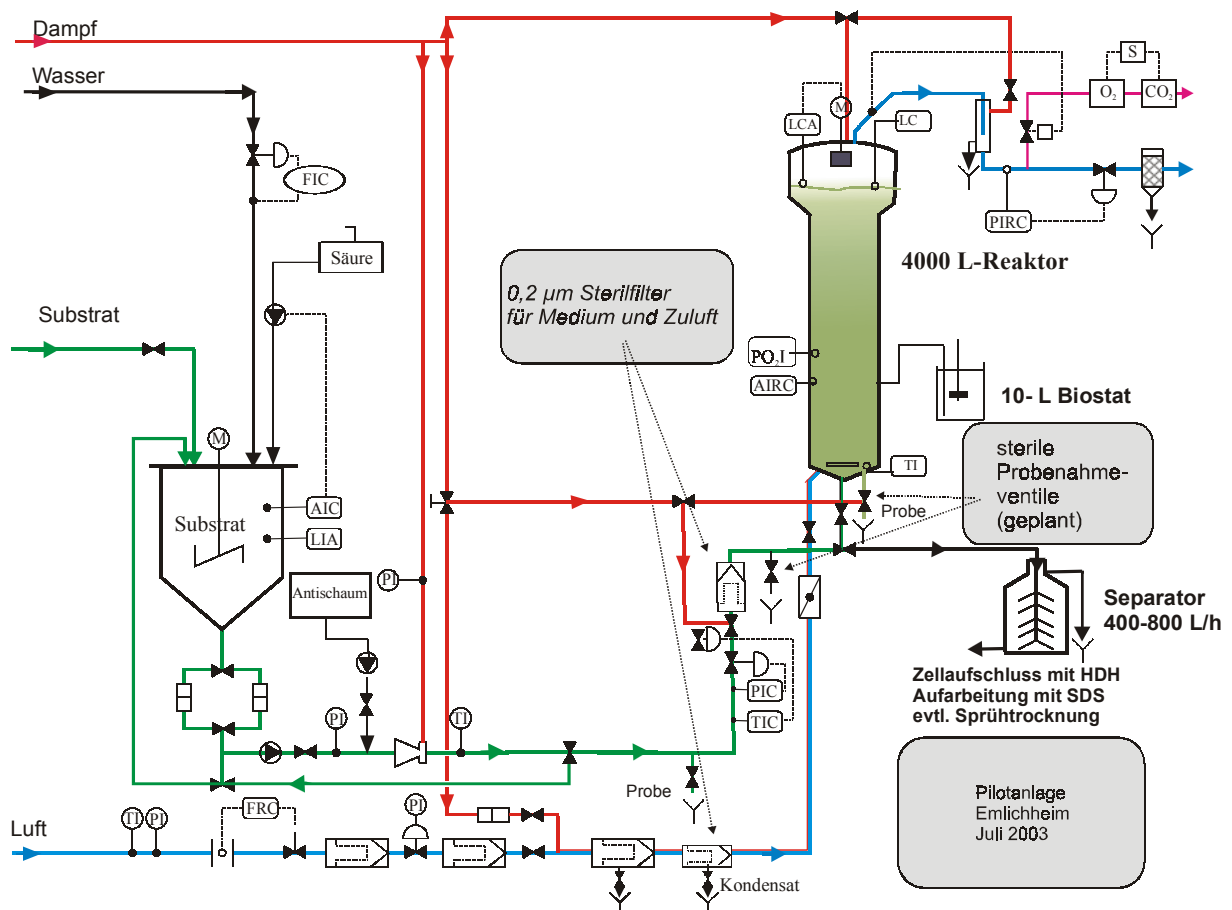


Abb. 72: Fließschema der Anlage bei Projektende 2003

Die in den folgenden Monaten in der Pilotanlage durchgeführten Fermentationsversuche müssen wegen bakterieller Infektionen abgebrochen werden. Die Infektionen treten nach 4-5 Tagen auf und werden von verschiedenen Bakterien verursacht (Streptokokken, Stäbchen), die auf Standard-1-Agar gut wachsen. Probleme mit Hefen, wie in der ersten Kampagne, sind nach den Umbaumaßnahmen nicht mehr aufgetreten. Da auch die Testflasche in der Luftleitung nur vereinzelte Infektionen anzeigt, die evtl. beim Anschließen eingeschleppt werden, scheinen die Belüftungsprobleme beseitigt zu sein.

Die verwendeten Vorkulturen bzw. die Animpfkulturen aus dem Biostat V werden auf Agar ausplattiert und in Testkulturen mit frischem Medium überimpft und sind zum Infektionszeitpunkt nach 5 Tagen noch steril. Als Infektionsquelle können sie daher ausgeschlossen werden. Während der normalen Fermentationen werden Proben sowohl beim Füllen der Anlage als auch nach Animpfen aus der Substratleitung und aus dem Fermenter entnommen und auf Agar ausplattiert bzw. in Schüttelkulturen gehalten. Diese Proben zeigen keinerlei Befund. Direkt nach dem Sterilisieren bzw. Füllen ist die Anlage noch steril.

Für Steriltests wird die Anlage sterilisiert und mit Medium gefüllt. Heizung und Belüftung werden wie bei der Fermentation eingestellt. Um alle äußeren Infektionsquellen auszuschließen wird die Anlage nicht angeimpft und auch keine Proben entnommen. Trotzdem treten nach ca. 4 Tagen Infektionen auf.

Art und Zeitpunkt der Infektionen sprechen für ein Filmwachstum über ungenügende Dichtungen oder durch Sporen, die in noch nicht entdeckten Totzonen der Anlage die Sterilisation überleben und den genannten Zeitraum zum Auskeimen benötigen. Das geplante Auffüllen der Anlage auf das Arbeitsvolumen und die entsprechenden Messungen (pH, pO<sub>2</sub>, Abgas, 2-D-Spektroskopie, Insitu-Mikroskop) die erst bei einem Füllstand von ca. 500 L möglich sind, können auch in diesem Kampagnezeitraum nicht durchgeführt werden. Aufgrund der Infektionsproblematik wird auch der Einsatz von Antibiotika erwogen. Die dafür von der Arbeitsgruppe in Bielefeld durchgeführten Untersuchungen [28] haben gezeigt, dass die üblicherweise in der Fermentation verwendeten Antibiotika (z.B. Canamycin und Streptomycin) eine wachstumshemmende Wirkung auf *Euglena gracilis* haben. Daher und aus wirtschaftlichen Gründen wird der Einsatz von Antibiotika nicht weiter verfolgt.

Nach wie vor stellt der Probenahmestutzen ein Problem für die Sterilität dar. Die Kugelhähne am Stutzen (Abb. 73, 74) sind über ein T-Stück mit der Dampfleitung verbunden und können vor und nach der Probenahme dampfsterilisiert werden. Ein Einwachsen von Keimen über mehrere Tage kann mit diesem System jedoch nicht ausgeschlossen werden. Der

Flüssigkeitsfilm in den Ventilen stellt eine potentielle Brücke dar. Die Kugelhähne werden im Lauf der Kampagne 2002/03 durch überarbeitete Drehschieber ersetzt, die aber keine Veränderung bewirken. Der Einbau von speziellen Sterilventilen ist daher geplant.

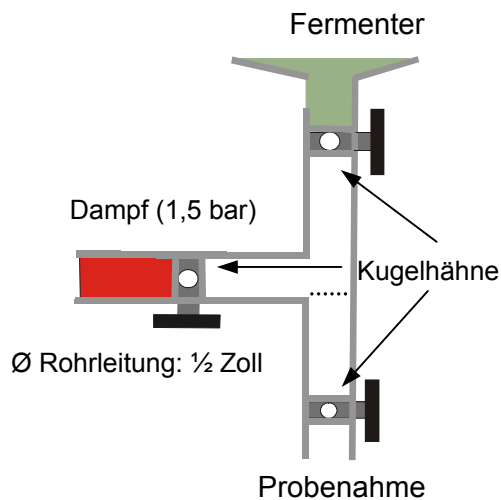


Abb. 73: Skizze des Probenahmestutzens am Pilotfermenter

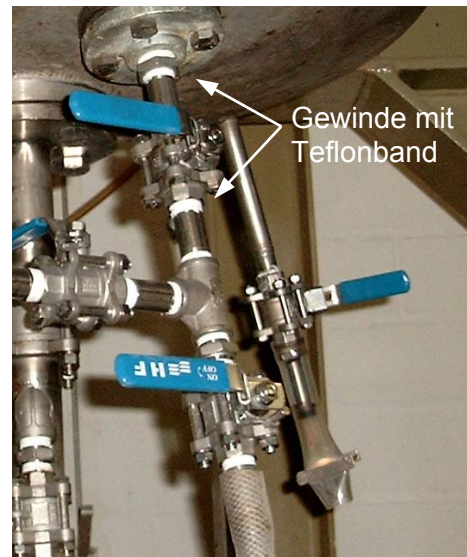


Abb. 74: Detailansicht vom T-Stück (im Hintergrund der Kondensatablass)

Einige Anschlüsse am Fermenter bestehen aus Rohrverschraubungen, die mit Teflonband abgedichtet sind. Dichtungen mit O-Ringen aus autoklavierbarem Material wären besser geeignet. Dafür müssten aber die entsprechenden Leitungen und Anschlüsse umgebaut werden. Umbaumaßnahmen (Schweißarbeiten), die direkt am Fermenter durchgeführt werden, müssen durch ein anschließendes TÜV-Gutachten abgenommen werden, bevor der Fermenter wieder in Betrieb genommen werden darf. Der damit verbundene Zeitverlust würde die Arbeiten in der laufenden Kampagne beenden, so dass trotz der bekannten Probleme mit dem bestehenden System weitergearbeitet wird.

Die Fermentationen in diesem Zeitraum sind jeweils mit einem Volumen von 200 L durchgeführt worden und erreichen bis zu 5 Mio. Z/mL und 8 g/L Biotrockenmasse, so dass die Aufarbeitung auch im Technikummaßstab durchgeführt werden kann. Die Fermenterbrühe wird im Separator auf etwa 5-10 % des ursprünglichen Volumens konzentriert und im Hochdruckhomogenisator bei 1000 bar aufgeschlossen.

Die Aufarbeitung mit Natriumlaurylsulfat und Reinigung mit heißem Wasser ergibt eine gute Produktqualität, die auch durch Untersuchungen in Hannover bestätigt werden (siehe Kap. 4.2.2.). Aus diesen Fermentationen lässt sich genügend Paramylon gewinnen, um weitere Untersuchungen u.a. für Anwendungsmöglichkeiten durchzuführen.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse wird eine erste Kostenkalkulation für eine dreistufige Reaktorkaskade mit einem 10 m<sup>3</sup>-Produktionsfermenter aufgestellt. Obwohl die Fermentation von *Euglena gracilis* mit dem preisgünstigen Kartoffelfruchtwasser durchgeführt wird und auch die Aufarbeitung für biotechnologische Verhältnisse relativ einfach ist, bleibt bei den bisherigen Batch-Versuchen die Ausbeute für eine wirtschaftliche Produktion zu gering.

Im reinen Batch-Betrieb lassen sich mit eKFW-Medium nicht mehr als ca. 8-10 g/L Paramylon in einem Zeitraum von ca. 100 Stunden gewinnen. Da *Euglena gracilis* nur langsam anwächst bzw. für ein hohes Inokulum eine entsprechend große Vorkultur notwendig ist, wäre für ein wirtschaftliches Verfahren mit kostendeckender Raum/Zeit-Ausbeute ein zumindest halbkontinuierlicher Betrieb wesentlich besser geeignet.

Nachdem die Kultur das Maximum der Zelldichte erreicht hat, kann aufgearbeitet werden. Ein Teil der Kultur bleibt als Inokulum für den nächsten Fermentationslauf. Auf diese Weise können 4-5 Fermentationen ohne Anlaufphase möglich sein, bevor eine Reinigung der Anlage notwendig wird. Durch das wiederholte Auffüllen der Anlage wird die Zeit für Reinigung und Sterilisation eingespart und die Lag-Phase der bereits besser an die Umgebung adaptierten Organismen verkürzt sich. Das Animpfverhältnis in den weiteren Zyklen kann so gewählt werden, dass die Startzelldichte ca. 1,5-2 Mio. Z/mL beträgt. Die Fermentationszeit würde sich damit weiter verringern und es bleibt noch ausreichend Material für die Aufarbeitung.

Bei den folgenden Fermentationsversuchen werden die Möglichkeiten eines wiederholten Batch-Betriebes im Biostat V untersucht. Da sich der Organismus in der Stammhaltung über Monate in eKFW-Medium halten lässt, sind für eine kontinuierliche Versuchsführung keine Mangel- bzw. Vergiftungserscheinungen zu erwarten.

Die Kultur aus dem Biostat V wird bei ausreichender Zelldichte von 4-5 Mio. Z/mL zum Animpfen der Pilotanlage verwendet und der aus technischen Gründen im Biostat verbliebenen Rest von ca. 500 mL Kulturlösung wird jeweils mit frischem Medium aufgefüllt (repeated Batch). Da diese Kulturen in erster Linie als Animpfkulturen für die Pilotanlage dienen, dauert der 2. Zyklus 6 Tage und die Kultur befindet sich bereits in der stationären-Phase ehe in den Fermenter überführt werden kann (Abb. 75). Die Wachstumsgeschwindigkeit ist im 3. Zyklus entsprechend geringer. Die Generationszeit beträgt mehr als 30 Stunden (Startzelldichte 500 000 Z/mL), während sie in den ersten Zyklen bei ca. 24 Stunden lag (Startzelldichte 300 000 Z/mL). Die Belüftungsrate ist bei diesem Versuch wegen starker Schaumbildung reduziert worden, wodurch die relativ geringe

Zellichte von  $5 \cdot 10^6$  Z/mL zu erklären ist. Nach 15 Tagen und 3 Fermentationszyklen wird die Fermentation beendet. Der Versuch zeigt, dass ein direktes Auffüllen problemlos möglich ist und der Organismus dabei keine Anzeichen von Wachstumshemmung erkennen lässt.

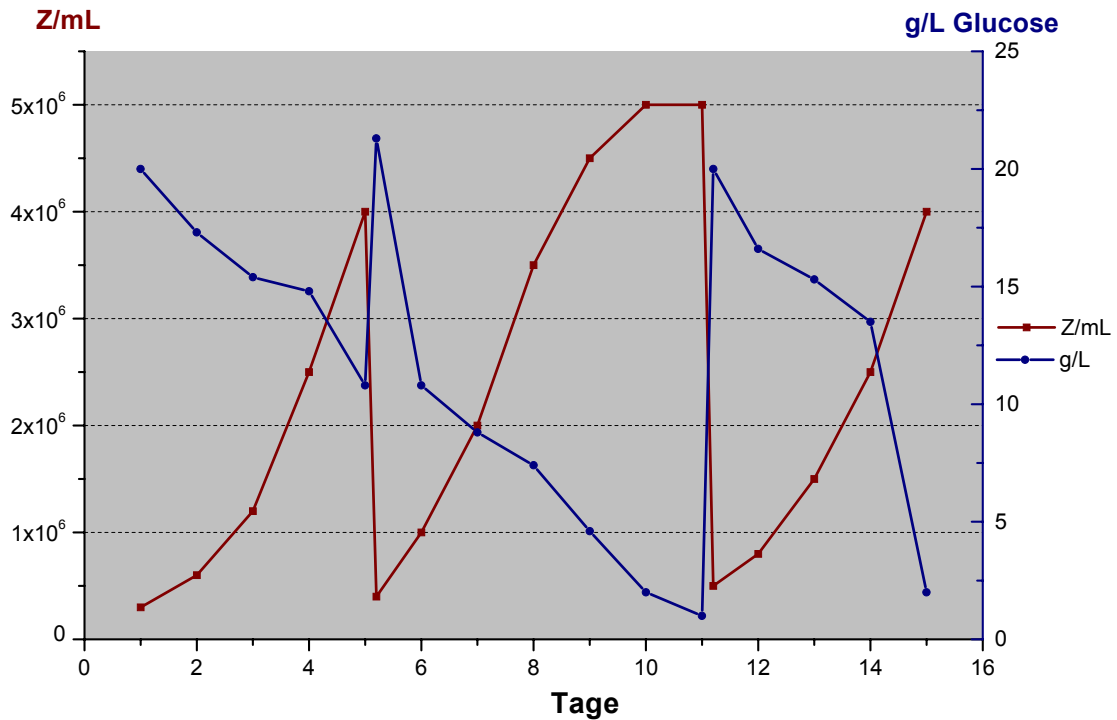


Abb.75: Wachstumskurve einer "repeated-Batch"-Kultur

Das Animpfverhältnis beträgt bei diesem Versuch in allen Zyklen etwa 1/20 wie in den bisherigen Fermentationen. Mit diesen Versuchen im Biostat V werden die Arbeiten an der Pilotanlage in Emlichheim im Januar 2003 beendet.

#### 4.5. Untersuchung halbkontinuierlicher Verfahren mit der Laboranlage Hannover

Die bisherigen Untersuchungen zur Medienoptimierung der Arbeitsgruppe in Bielefeld ergaben eine maximale Konzentration von 40-50 % eKFW. Höhere Konzentrationen führen im Batch-Betrieb und in den Schüttelkulturen zu einer hemmenden Wirkung, bis hin zum Absterben der Kultur. Die aktuellen Laborversuche aus Bielefeld [28] während der 2. Kampagne zeigen, dass beim Wiederauffüllen (repeated-Batch) höher konzentriertes eKFW verwendet werden kann. Dabei werden deutlich bessere Ergebnisse als im bisherigen Batch-Betrieb erreicht. Eine Zufütterungsstrategie (Fed-Batch) scheint dagegen weniger erfolgversprechend. Die übliche Ausbeute an Paramylon im Satzbetrieb liegt bei  $0,08 \text{ g/L} \cdot \text{h}$  bei einer Fermentationsdauer von 4 Tagen, die im wiederholten Satzbetrieb unter Einsatz steigender eKFW-Konzentrationen auf  $0,2 \text{ g/L} \cdot \text{h}$  gesteigert werden kann.

Der folgenden Versuche wird in einem 10 L-Biostat durchgeführt. Bei dem dargestellten Experiment (Abb. 76) ist die Heizung durch Heißdampf über mehrere Tage ausgefallen, so dass die Kultur auf Raumtemperatur von etwa  $20^\circ \text{ C}$  abkühlt und langsamer anwächst. Während dieser Zeit kann das Probenahmeventil nicht sterilisiert und daher keine Probe genommen werden.

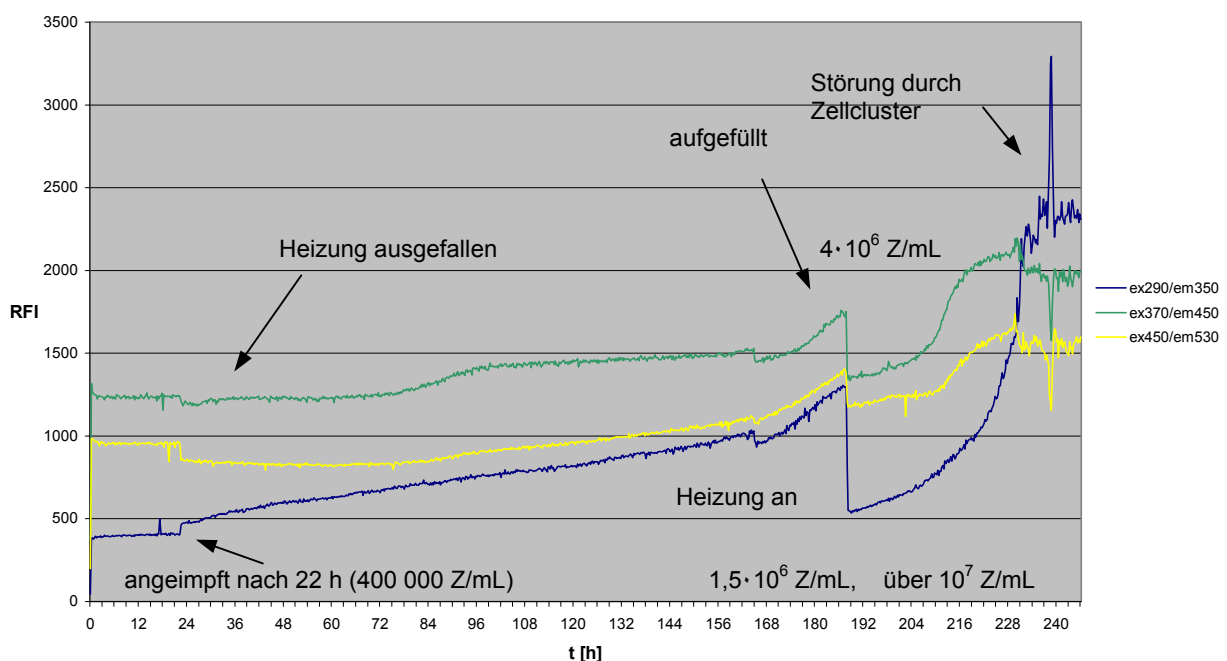


Abb. 76: Fluoreszenzverlauf einer „repeatet Batch“ mit steigender Medienkonzentration

Nach 165 Stunden ( $3 \cdot 10^6 \text{ Z/mL}$ ) steht die Heizung wieder zur Verfügung und die Kultur wächst normal weiter. Die plötzliche Temperaturänderung ist an den Sprüngen in den Fluoreszenzverläufen erkennbar. Bei einer Zelldichte von 4 Mio.  $\text{Z/mL}$  werden 7 Liter

Fermenterbrühe abgelassen und der Fermenter mit 7 Liter 70 % eKFW-Medium aufgefüllt. Die im Biostat verbliebene Menge von ca. 3 L sorgt für eine Zelldichte von ca.  $1,5 \cdot 10^6$  Z/mL. Nach dem Auffüllen (188 Stunden) wächst die Kultur sehr gut weiter und die Zelldichte steigt in 48 Stunden auf über  $10^7$  Z/mL. Danach fallen die RFI-Werte für NADH und Flavine stark ab und die Aminosäurelinie steigt, was durch das Absterben der Zellen und freigesetzte Aminosäuren verursacht wird (siehe auch Kap. 4.3.1.). Um den Übergang in die stationäre-Phase besser zu erkennen wird der Fluoreszenzverlauf im 2. Zyklus gesondert dargestellt (Abb. 77).

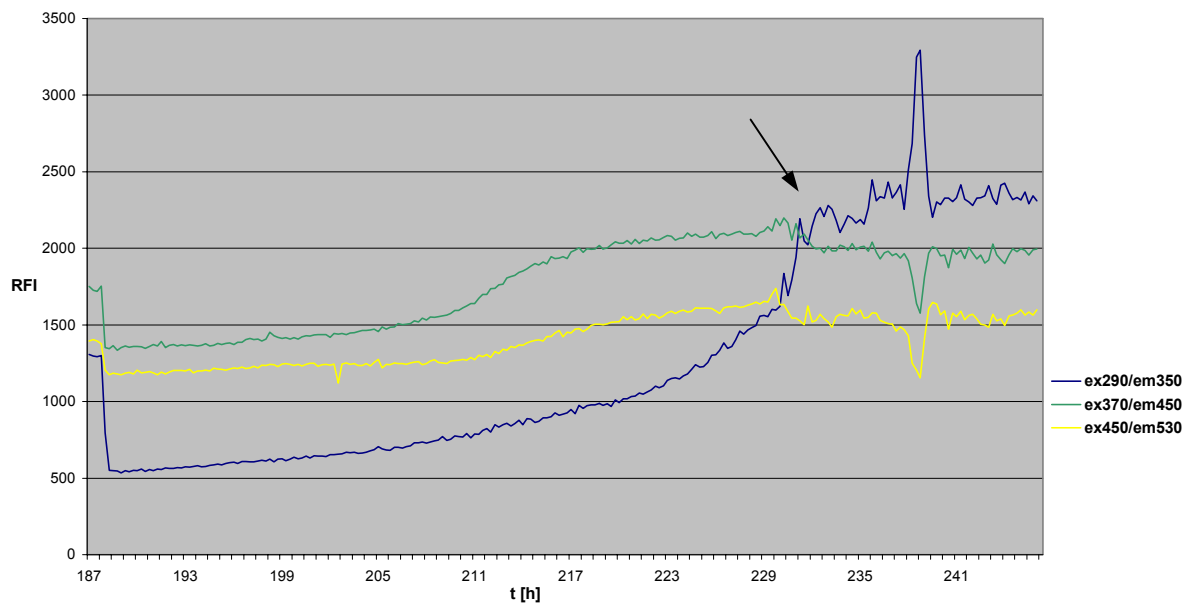


Abb.

77: Ausschnitt aus der vorhergehenden Graphik (2. Zyklus) mit sinkender Stoffwechselaktivität und dem Übergang von stationärer - zur Absterbe-Phase (Pfeil)

Nach 240 Stunden kommt es zu einer kurzzeitigen Störung bei allen Wellenlängen, die nur in 2 Messungen innerhalb von 30 Minuten sichtbar ist. Vermutlich wird sie durch Zellcluster vor der Quarzscheibe des BioView-Sensor hervorgerufen. Wachstumsgeschwindigkeit und Generationszeit (16 h) im 2. Zyklus entsprechen den Verhältnissen in den Kulturkolben der Stammhaltung mit eKFW-Medium. Die Zelldichte und Paramylonkonzentration bei Fermentationsende von mehr als 12 g/L liegen über den bisher mit diesem Medium erreichten Werten. Die Raum/Zeit-Ausbeute an Paramylontrockenmasse beträgt im 2. Zyklus ca.  $0,25 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ . Eine Fermentation mit 3-4 Tagen Vorkultur in 40 % Medium und mehreren Zyklen mit steigender Konzentration bis hin zum reinen eKFW unter den gezeigten Bedingungen erreicht damit Werte, in denen eine technische Produktion unter Berücksichtigung der Kostenkalkulation wirtschaftlich ist.



Die folgenden Fluoreszenzspektren zeigen die Veränderungen im gesamten Messbereich zum Zeitpunkt des Animpfens, vor und nach dem Auffüllen und bei Fermentationsende nach 246 Stunden.

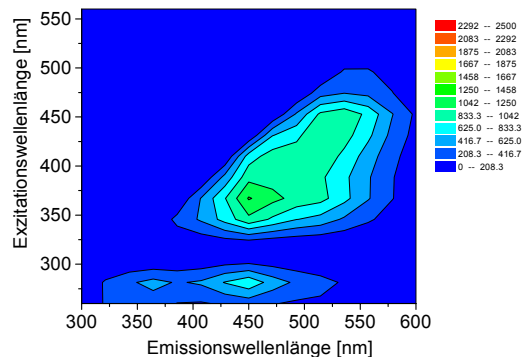


Abb. 78: Fluoreszenzspektrum nach Animpfen (22 Stunden)

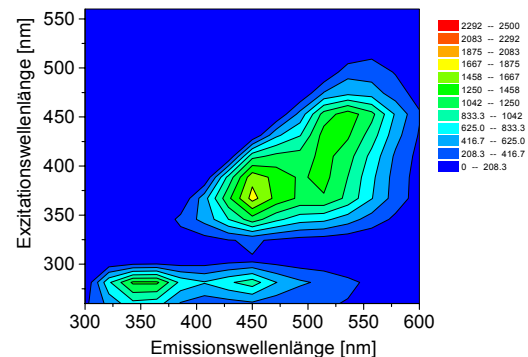


Abb. 79: Fluoreszenzspektrum vor Auffüllen (187 Stunden)

Abgesehen von der temperaturbedingt langen Generationszeit von 50 Stunden verläuft die Fermentation bis zum Auffüllen normal. Die RFI-Werte steigen wie erwartet im Bereich von NADH, Flavinen und Aminosäuren (Abb. 79). Die Skalierung des Differenzspektrums reicht bis 1800 RFI damit der Vergleich mit dem Differenzspektrum über den gesamten Zeitraum möglich ist (Abb. 80). Die Werte im Aminosäure- und NADH-Bereich steigen auf ca. 800 Einheiten.

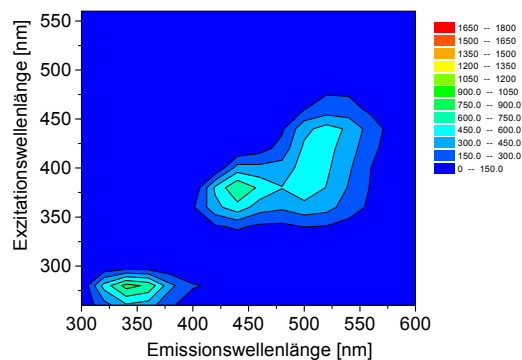


Abb. 80: Differenzspektrum 1. Zyklus (Spektrum nach 187 h – Spektrum nach 22 h)

Die Fluoreszenzwerte sind nach dem Füllen nicht gleichmäßig auf ein neues Niveau angehoben/gesenkt. Die Werte im Aminosäurebereich sinken fast wieder auf das Ursprungsniveau, während sie im Bereich der Flavine ca. 300 Einheiten höher liegen als zu Beginn der Fermentation (Abb. 81). Der hohe Wert im Flavin-Bereich wird im Differenzspektrum mit kleinerer Skalierung (Abb. 82) besonders deutlich.

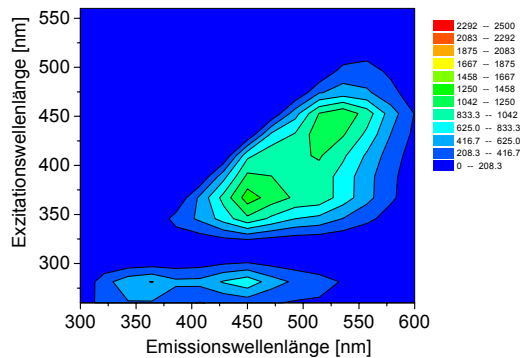


Abb. 81: Fluoreszenzspektrum nach dem Auffüllen (188 Stunden)

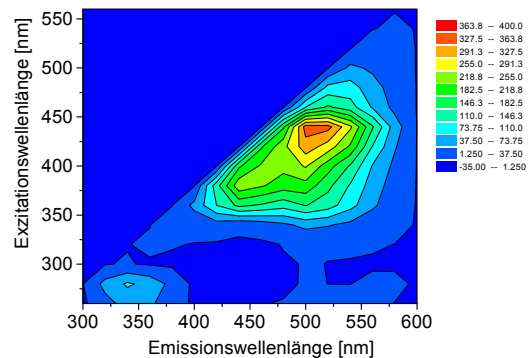


Abb. 82: Differenzspektrum 188 h – 22 h (Skala -35 - + 400 Einheiten)

Nach Abschluss der Fermentation liegen die höchsten RFI-Werte im Bereich der Aminosäuren. Die Kultur scheint bereits in der Absterbe-Phase zu sein, obwohl die mikroskopischen Untersuchungen noch keine Zelltrümmer zeigen. Die stationäre-Phase ist im Fluoreszenzverlauf nur anhand der NADH-Linie zu erkennen und endet bei ca. 228 Stunden. Danach fallen die NADH- und Flavin-Linien stark ab. Da die vmtl. vorhandenen freien Aminosäuren einen zu hohen Proteingehalt vortäuschen könnten, wird für das Differenzspektrum über den gesamten Zeitraum die Messungen nach 226 Stunden verwendet (Abb. 84).

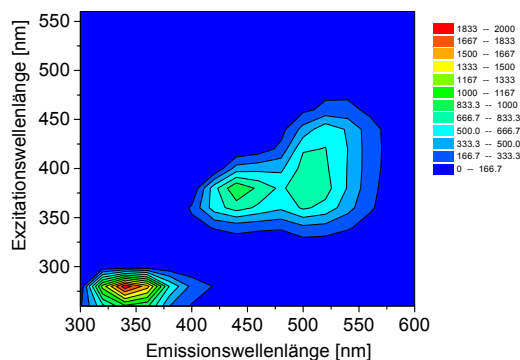


Abb. 83: Fluoreszenzspektrum bei Fermentationsende (246 Stunden)

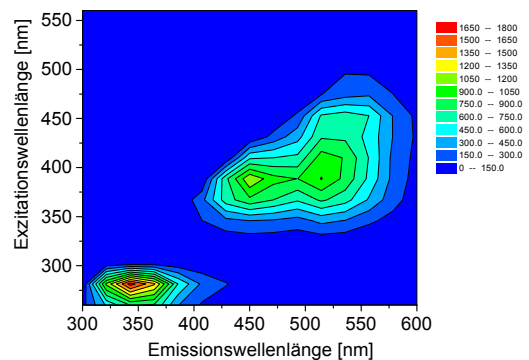


Abb. 84: Differenzspektrum über den Zeitraum vom Animpfen bis 226 Stunden (Skala bis 1800 Einheiten)

Die Messwerte im Aminosäurebereich liegen mit 1800 RFI deutlich höher als in den bisherigen Batch-Versuchen und werden durch die ausgezählten Zelldichten und die Paramylontrockenmasse bestätigt.

In der folgenden Graphik (Abb. 85) sind einige online-Messwerte der RISP dargestellt. Die  $pO_2$ -Werte weisen viele Störungen auf, wodurch der Verlauf als breite Linie erscheint. Die Anlage wird mit einer Belüftungsrate von  $0,5 V/V_M$  auf 100 % kalibriert. Beim Animpfen ist

ein sofortiger Abfall des pH und  $pO_2$ -Wertes zu erkennen, während der  $CO_2$ -Gehalt in der Abluft steigt. Nach 26 Stunden fällt die Heizung aus. Da der  $CO_2$ -Gehalt sinkt wird die Belüftung auf  $0,3 V/V_M$  reduziert, wodurch die Stufe in der  $pO_2$ -Kurve nach 65 Stunden verursacht wird.

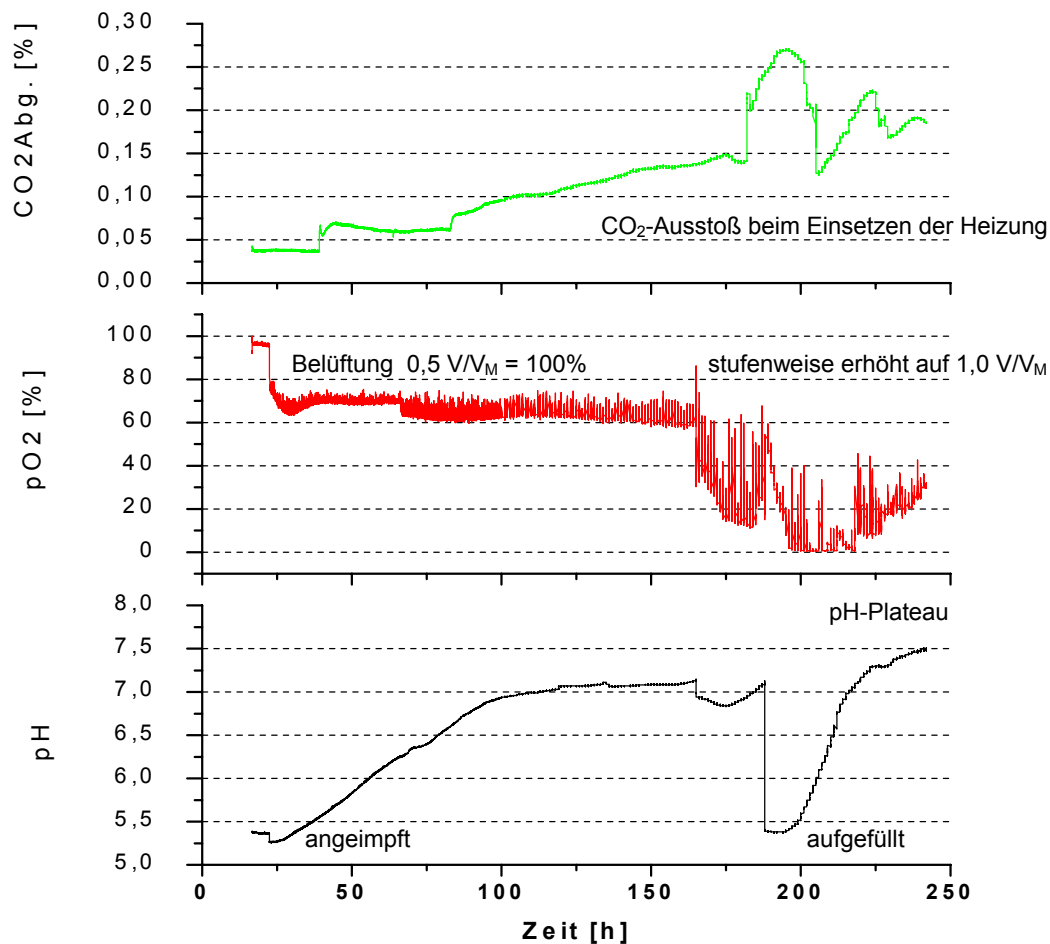


Abb. 85:  $CO_2$ -,  $pO_2$ - und pH-Verlauf der beschriebenen „repeated Batch“ Fermentation

Als der Heizmantel wieder mit Heißdampf gefüllt wird, reagiert die Temperaturregelung zu träge. Der Biostat wird einige Minuten auf  $35\text{ °C}$  erhitzt und durch den plötzlichen Temperaturanstieg  $CO_2$  freigesetzt, wobei der pH-Wert absinkt. Der  $pO_2$  sinkt in den nächsten Stunden durch verstärktes Wachstum der Zellen in kurzer Zeit von 60 auf 11 %. Beim Auffüllen der Anlage wird die Belüftung wieder auf den bisher in allen Fermentationen ausreichenden Wert von  $0,5 V/V_M$  eingestellt.

In der aufgefüllten Kultur beginnt ein starkes Zellwachstum, das an pH-Anstieg, CO<sub>2</sub>-Produktion und dem Sauerstoffverbrauch erkennbar ist. Die Belüftung wird stufenweise auf 1,0 V/V<sub>M</sub> erhöht, bis der pO<sub>2</sub> wieder auf ca. 30 % steigt. Nach 223 Stunden bleibt der pH für einige Stunden auf einem Plateau und der CO<sub>2</sub>-Gehalt sinkt. Zur gleichen Zeit zeigt auch die NADH-Linie des BioView-Sensor einen horizontalen Verlauf, während die Aminosäure-Linie weiterhin steigt. Diese Messwerte sprechen dafür, dass die Kultur sich hier in der stationären-Phase befindet.

Alle Messungen im 2. Zyklus zeigen ein deutlich stärkeres Wachstum als in den bisherigen Batch-Kulturen.

Die folgenden mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Entwicklung der Zelldichte. Die Fotos sind mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen, weil damit der Anstieg der Zellzahl deutlicher wird als bei höheren Vergrößerungen.



Abb. 86a: 1.Zyklus 40% eKFW  
 $4 \cdot 10^6$  Z/mL (100 x)  
6,4g/L PTM

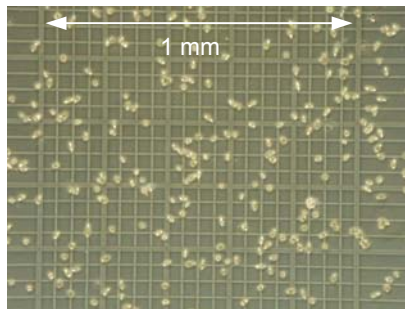


Abb. 86b: gefüllt mit 70% eKFW  
 $1,5 \cdot 10^6$  Z/mL



Abb. 86c: 2. Zyklus,  
>  $1 \cdot 10^7$  Z/mL  
> 12 g/L PTM

#### 4.6. Analytik des Paramylon

Die Kernresonanz- und IR-Spektren wurden am Institut für organische Chemie der Universität Hannover angefertigt und ausgewertet. Das Paramylon stammt aus einer Fermentation in der Pilotanlage in Emlichheim. Mit Hilfe der spektroskopischen Methoden soll die Struktur und auch die Reinheit des Paramylons untersucht werden. Die mit SDS und Alkalase aufgereinigten Produkte unterscheiden sich dabei nicht.

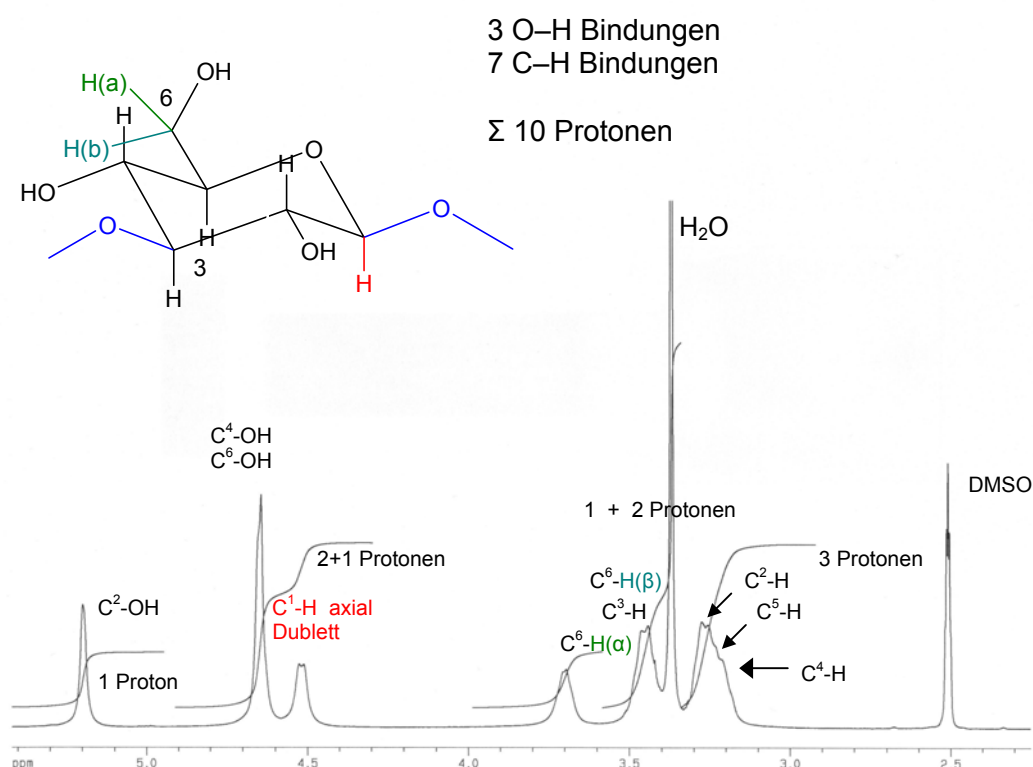


Abb. 87:  $^1\text{H-NMR}$  Emlichheimer Produkt (25mg/mL in DMSO- $d_6$ , 400MHz)

Die NMR-Spektren zeigen keine Spuren von Verunreinigungen und alle Peaks lassen sich eindeutig zuordnen. Auch die axiale  $\alpha$ -Position des Wasserstoff am  $\text{C}^1$ -Atom und damit die  $\beta$ -1,3-Sauerstoffbrücke ist im  $^1\text{H-NMR}$  (Abb. 87) zu erkennen, da die Kopplung mit dem benachbarten Proton ein Dublett erzeugt. Im Fall eines  $\alpha$ -Glucans würde dieses Proton äquatorial stehen und hätte keine Möglichkeit zur Kopplung. Das Signal wäre daher ein Singulett und die Lage des Peak hätte eine andere chemische Verschiebung [44].

Enzymatische Untersuchungen mit Glucanasen [30] haben gezeigt, dass es sich bei Paramylon um ein unverzweigtes  $\beta$ -1,3-Glucan handelt. Mit den Daten des  $^{13}\text{C-NMR}$ - aus Abbildung 88 wird die unverzweigte Struktur bestätigt. Das Spektrum zeigt nur 6

verschiedene C-Atome. Bei einer zusätzlichen 1,3-1,6-Verzweigung würden die beiden Brücken-C-Atome zusätzliche Signale erzeugen.

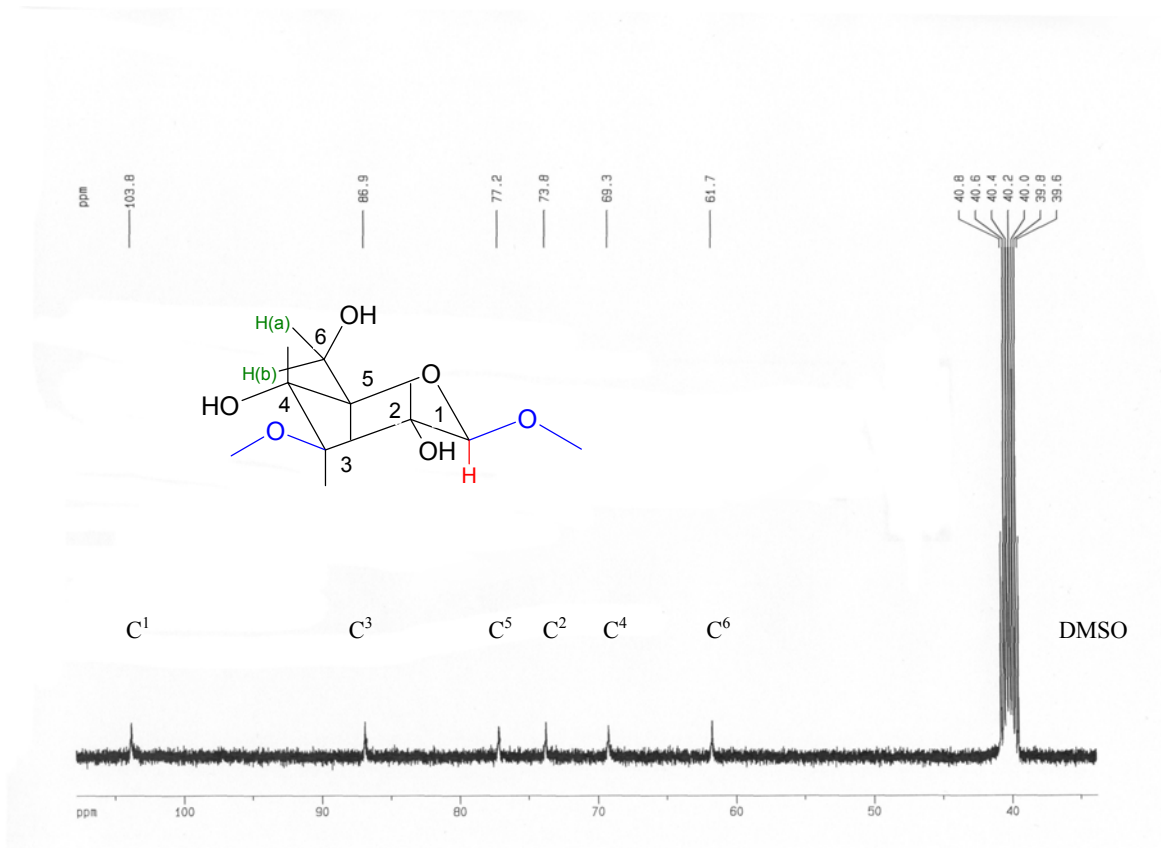


Abb. 88: <sup>13</sup>C-NMR von Paramylon (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

Die Position der einzelnen Atome innerhalb der Struktur werden vor allem mit Hilfe der 2-Dimensionalen NMR-Spektroskopie ersichtlich.

Das HMQC-Spektrum (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) in der folgenden Abbildung 89 zeigt die Wechselwirkungen zwischen <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C und ermöglicht die Zuordnung der Protonen aus C-H-Bindungen zu dem jeweiligen Kohlenstoffatom. In dem darunter liegenden H-H-Cosy-Spektrum (correlated Spectroscopy, Abb. 90) werden die Kopplungen der einzelnen Protonen untereinander dargestellt.

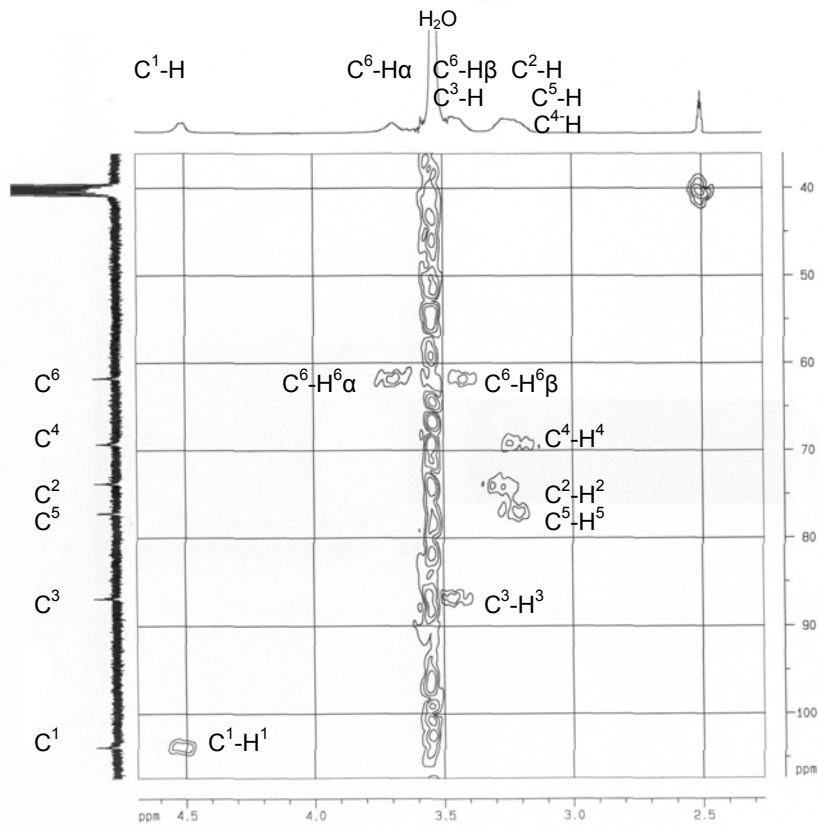


Abb. 89:  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  HMQC-Spektrum

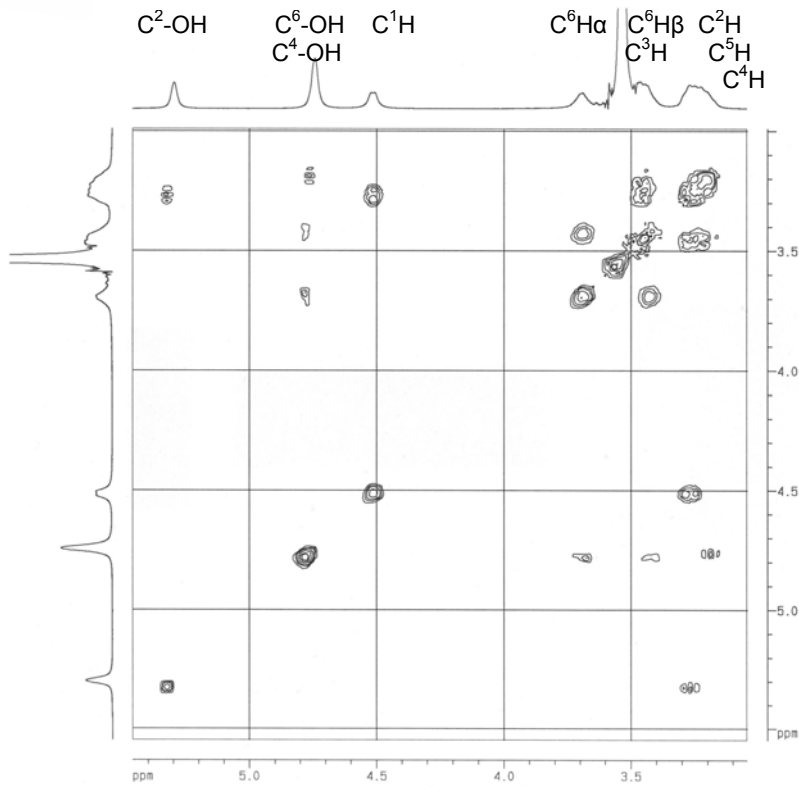


Abb. 90: H-H-Cosy-Spektrum

Mit dem Produkt aus der Emlichheimer Fermentation kann auch ein Infrarot-Spektrum angefertigt werden, das ebenfalls keinen Hinweis auf Verunreinigungen durch z.B. Proteine oder sonstige Fermentationsreste gibt. Im Bereich zwischen  $2000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  würden Aminosäuren die typischen Carboxyl- und Amino-Banden zeigen, die im vorliegenden Spektrum (Abb. 91) fehlen. Das IR-Spektrum kann zur relativ einfachen und schnellen Identifizierung der Substanz durch Spektrenvergleich genutzt werden. Die mit Hilfe der ATR-Technik (Attenuated total reflection) aufgenommenen Spektren sind allerdings nicht unbedingt mit denen aus KBr-Presslingen vergleichbar.

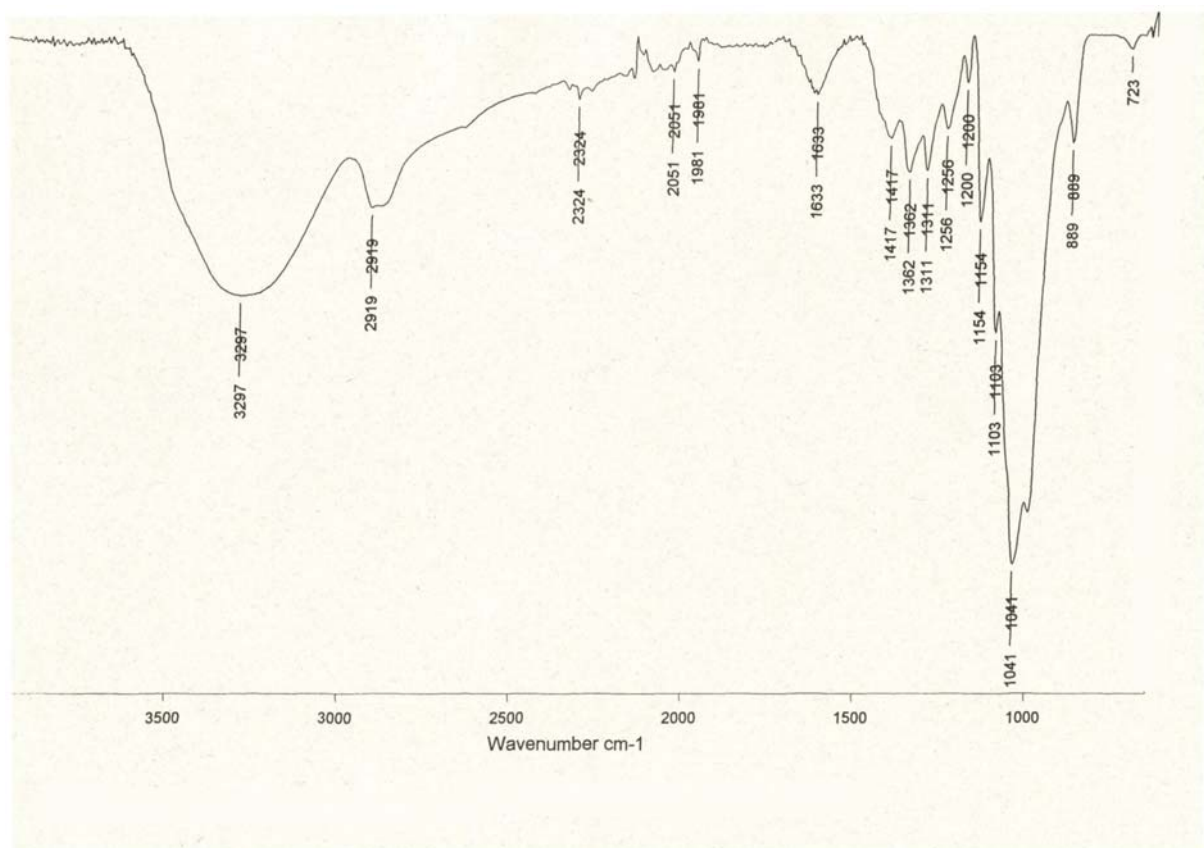


Abb. 91: IR-Spektrum von Paramylon (Golden Gate ATR)

Die MALDI-Untersuchungen von Paramylon (Abb. 92, 93) zeigen deutliche Produktpeaks zwischen  $387\ 000\text{-}393\ 000$  Masseneinheiten und einige kleinere zwischen  $400\ 000\text{-}430\ 000$  Masseneinheiten. Zwischen  $5\text{ kDa}$  und  $30\text{ kDa}$  gibt es einige unscharfe, breite Peaks, die keiner einzelnen Masse zugeordnet werden können und vmtl. durch Fragmentierung des Paramylons zu kleineren Bruchstücken verursacht werden. Zwischen  $30\text{ kDa}$  und den Produktpeaks gibt es keine Hinweise auf noch vorhandene Proteine bzw. sonstige Verunreinigungen. Unter den gewählten Bedingungen ist eine Peakintensität von über  $10\text{ mV}$  zur Auswertung notwendig.



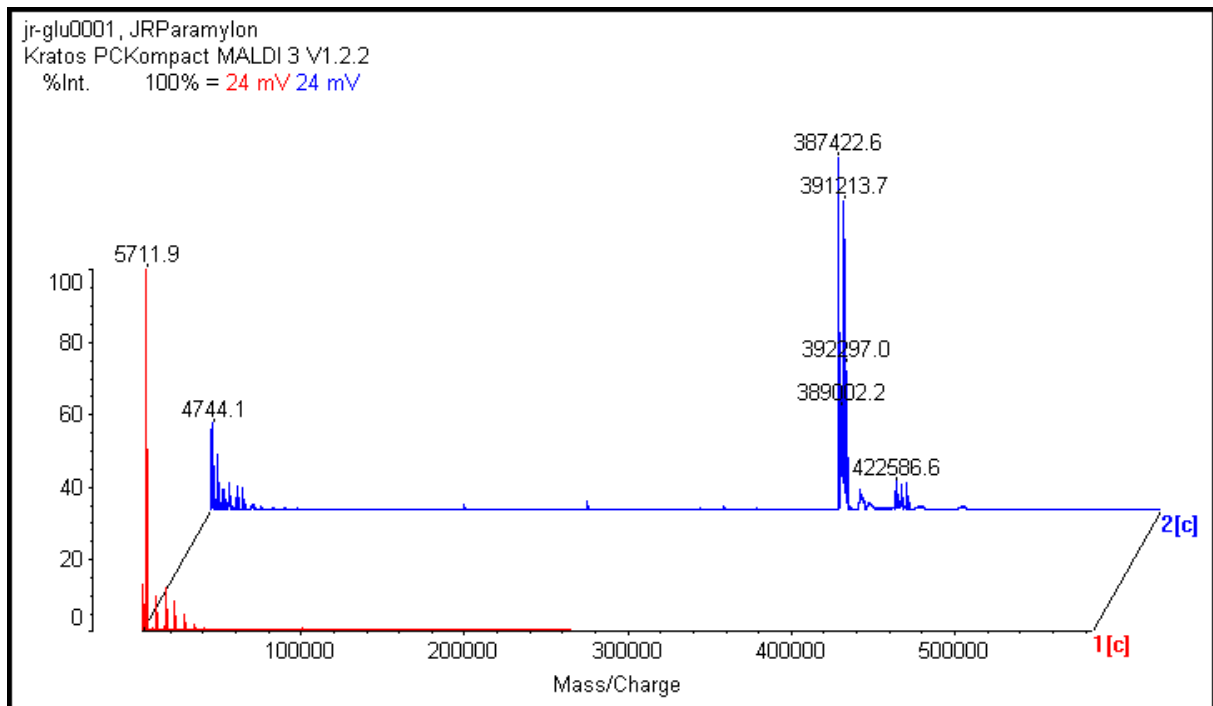


Abb. 92: MALDI-Spektrum von Paramylon (blau) und der Kalibriersubstanz Insulin (rot)

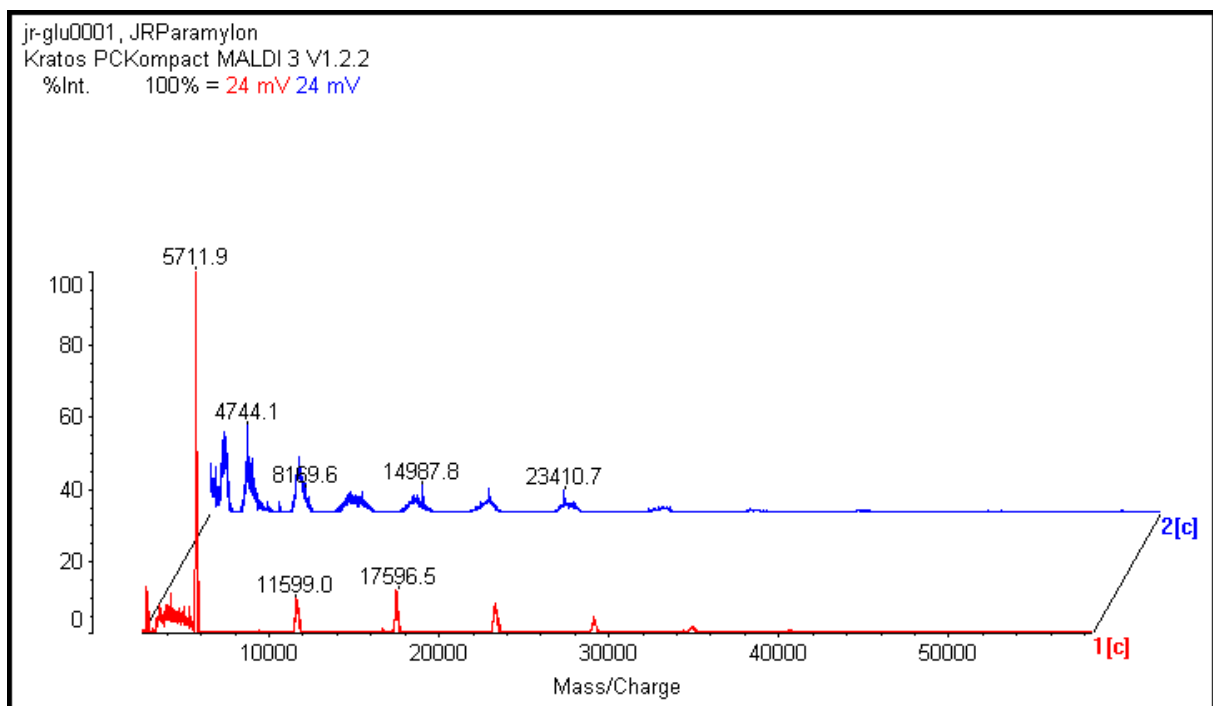


Abb. 93: Ausschnitt aus dem vorhergehenden Spektrum von 1000 – 58000 Da

Das Spektrum von Insulin zeigt außer dem  $M^+$ -Peak (5711,9 Da) auch noch höhere Masse/Ladungsverhältnisse. Von den Proteinen der Kartoffel bzw. aus den Organismen ist in den MALDI-Untersuchungen nichts zu erkennen.

## 5. Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Scale-up mikrobiologischer Grundlagen auf eine technische Pilotanlage im Werk der Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim, sowie des Aufbereitungsverfahrens. Auf Grundlage der vorhergehenden Untersuchungen und in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Fermentationstechnik der Universität Bielefeld wird die Fermentation von *Euglena gracilis* in einem Medium auf der Basis von Kartoffelfruchtwasser zur Gewinnung des Speicherkohlenhydrates Paramylon untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird als Medium ein Abfallstoff der Stärkeindustrie eingesetzt, der kostengünstig zur Verfügung steht und nur durch Filtration, Verdünnung und Glucosezusatz konditioniert wird. In früheren Arbeiten anderer Forschungsgruppen wurde bereits gezeigt, dass eine Fermentation von *Euglena gracilis* zur Gewinnung von Paramylon eingesetzt werden kann [30]. Die dabei verwendete synth. Nährlösung ist für eine industrielle Anwendung nicht wirtschaftlich. Als Basis für die Medienherstellung stehen im Werk der Emsland-Stärke KFW, eKFW und PPL zur Verfügung.

Die Qualität des KFW vor der Umkehrosmose schwankt im Verlauf der Kampagne zu stark, als das ein wirtschaftlicher Einsatz sinnvoll erscheint.

Mit dem Kartoffelfruchtwasser nach der Eiweißfällung (eKFW) steht ein Basismedium zur Verfügung, das nach Konditionierung zur Fermentation von *Euglena gracilis* geeignet ist. Wachstumsgeschwindigkeit und Paramylonausbeute sind im Batch-Betrieb geringer, die Herstellung des Mediums dagegen erheblich preiswerter als bei der synth. Nährlösung. Die Herstellung im Laborverfahren (Bielefeld) ist durch die zusätzliche Proteinfällung vor der Mikrofiltration für den technischen Betrieb zu aufwendig, so dass nach einer einfacheren Methode gesucht wird. Eine Ultrafiltration des eKFW ohne thermische Behandlung führt zu einem Medium (Emlichheim), mit dem fast die gleichen Ergebnisse erreicht werden, wie mit dem „Bielefelder Verfahren“.

Kartoffelfruchtwasser steht nur während der Kampagne von August bis Januar zur Verfügung, weshalb Alternativen für den ganzjährigen Einsatz untersucht werden. Tiefgekühltes eKFW kann nach den Untersuchungen in der Laboranlage Hannover ohne Einschränkungen zur Medienherstellung eingesetzt werden, bedarf aber entsprechender Lagerung, die für ein wirtschaftliches Verfahren problematisch ist. Auch das Konzentrat PPL kann zur Fermentation eingesetzt werden. Die Paramylonausbeute ist geringer als im eKFW aber die Lagerung nimmt wesentlich weniger Kapazität in Anspruch. Ein Einsatz von PPL außerhalb der Kampagne wäre daher denkbar.

Die Ausbeute an Paramylon pro Zeit und Volumen kann im Satzbetrieb mit dem eKFW-Medium nicht weiter gesteigert werden, weshalb halbkontinuierliche Verfahren untersucht werden. Die höhere Startzellichte und die geringere Verdünnung mit frischem Medium verkürzen die Lag-Phase in den Zyklen und sorgen für eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit. Aufgrund der Erfahrungen aus der Stammhaltung sind auch bei langen Fermentationszeiträumen keine toxischen Effekte durch das Medium zu erwarten.

Mit dem Emlichheimer eKFW-Medium wird im 10 L-Biostat unter spezieller Prozessführung (repeated Batch) eine höhere Produktausbeute von mehr als 12 g/L bei verkürzter Fermentationszeit erreicht. Die Raum/Zeit-Ausbeute steigt dadurch in den einzelnen Zyklen von 0,08 im auf 0,25 g/L·h, was nach ersten Kalkulationen für eine Produktionsanlage wirtschaftlich wäre.

Die Versuche mit der Pilotanlage zeigen trotz der Sterilitätsprobleme, dass eine Fermentation von *Euglena gracilis* in der Größenordnung von einigen Kubikmetern möglich ist und keine Probleme durch z.B. den hydrostatischen Druck in einer hohen Wassersäule auftreten. Eine im Vergleich zum Rührkessel-Reaktor technisch weniger aufwendige und dadurch preisgünstige Blasensäule reicht für diesen Prozess aus. Trotz der für den Organismus notwendigen geringen Begasungsrate tritt keine Sedimentation der Zellen auf und eine ausreichende Durchmischung des Mediums ist gewährleistet.

Mit einer Reaktorkaskade aus 3-4 Blasensäulen von 20 L bis ca. 10 000 L ist eine wirtschaftliche Produktion von Paramylon nach den bisherigen Ergebnissen realisierbar. In den kleineren Reaktorstufen wird die Vorkultur kultiviert, damit ein möglichst hohes Inokulum für den Produktionsfermenter zur Verfügung steht, der über mindestens 4-5 Zyklen aufgefüllt werden kann, bevor eine Reinigung der Anlage notwendig wird. In der Zwischenzeit kann wieder eine neue Vorkultur angezogen werden, so dass keine langen Totzeiten für die Anlage zu erwarten sind.

Durch die hohe Konzentration von Paramylon in den Zellen (70 % der BTM) und die Eigenschaften der Paramylonkörper ist die Aufarbeitung im Gegensatz zu vielen anderen biotechnologischen Verfahren relativ einfach [45, 46]. Die Zellen werden vollständig aufgeschlossen (HDH) und das Paramylon durch Zentrifugation abgetrennt. Zellreste und sonstige Verunreinigungen können mit Hilfe von Tensiden bzw. Enzymen ausgewaschen werden.

Die Aufarbeitung über Hochdruckhomogenisation und Reinigung mit Natriumdodecylsulfat

ist problemlos auf jeden Maßstab übertragbar und die damit erreichbare Produktqualität erfüllt die Vorgaben der Lebensmittelindustrie.

Die Fermentation kann über die üblichen Parameter Temperatur, pH,  $pO_2$  und Abgasmessungen verfolgt werden, wobei die geringe Wachstumsgeschwindigkeit von *Euglena gracilis* nur geringe Veränderungen bewirkt und eine Bewertung des Zellwachstums von „außen“ erschwert. Zusätzliche Informationen ergeben sich aus den 2-D-Fluoreszenzmessungen, die eine Beurteilung der Kultur und ihres Status erlauben und sowohl den günstigen Zeitpunkt für die Aufarbeitung als auch etwaige Probleme zeigen. Für chemometrische Modellberechnungen, die aufgrund der BioView- und RISP-Daten prinzipiell möglich sind, reichen die Werte aus den Laborfermentationen aber noch nicht aus. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig, die eine Verbesserung des Prozesses in Aussicht stellen. Für die in Hannover (und Bielefeld) durchgeführten Untersuchungen wurde eKFW verwendet, das nur 1-2 mal pro Kampagne entnommen und tiefgefroren wurde. Bedingt durch unterschiedliche Herkunft, Sorten, Art der Lagerung (Feld, Silo, etc.) bzw. Lagerzeit der in Emlichheim verarbeiteten Kartoffeln verändert sich das Kartoffelfruchtwasser praktisch täglich. In einer Produktionsanlage sind daher gewisse Schwankungen zu erwarten. Interessant ist daher die Frage, ob sich das Medium im Verlauf der Kampagne im Hinblick auf die Fluoreszenzmessungen verändert und die bisher gemessenen Daten auch über eine Kampagne reproduzierbar sind. Evtl. sind die RFI-Werte im Aminosäurebereich in Bezug auf die Zelldichte und damit der Paramylonkonzentration quantifizierbar.

Die ursprünglich geplanten Fermentationen im Kampagnebetrieb wurden aufgrund der Infektionsproblematik nur im Biostat bzw. im Pilotfermenter bis max. 500 L durchgeführt. Unter diesen Umständen stand in Emlichheim nur eine eingeschränkte Prozessanalytik zur Verfügung, so dass diese Fermentationen nicht wie die Laborexperimente ausgewertet werden können.

In den ersten 24 Stunden einer Fermentation sind die online messbaren Veränderungen sehr gering, weshalb eine mikroskopische Untersuchung des Zellstatus hilfreich ist. Durch den Einsatz des Insitu-Mikroskops kann auf eine Probenahme verzichtet werden, so dass direkte Eingriffe in das sterile System vermieden werden. Anhand von Form und Beweglichkeit der Zellen sowie der Füllung mit Paramylonkörpern sind Rückschlüsse auf die Bedingungen im Fermenter und die Qualität des Mediums möglich.

Mit einer noch anzupassenden Software kann weiterhin die Zelldichte der Kultur online bestimmt werden.

Mit der Fluoreszenzspektroskopie und dem Insitu-Mikroskop steht eine online-Prozessanalytik zur Verfügung, die eine Überwachung und Steuerung der Fermentation gewährleistet und Raum für weitere Optimierungen des Prozesses gibt.

Aufgrund der guten Ergebnisse mit der Hochdruckhomogenisation ist es nicht nötig weitere Aufarbeitungsschritte, wie Filtration oder chromatographische Methoden einzusetzen. Das Produkt aus der Fermentation ist von einer Reinheit, die lebensmittelrechtlichen Bestimmungen genügt. Die Qualität des gewonnenen Paramylons ermöglicht die umfangreiche Produktanalytik. Die NMR- und MALDI-Untersuchungen bestätigen die unverzweigte  $\beta$ -1,3-Struktur und zeigen eine Molekülmasse von ca. 400 kDa. Sowohl die lebensmitteltechnischen Untersuchungen in Emlichheim als auch die Messungen in Hannover zeigen keine Verunreinigungen, Proteine oder sonstige Fermentations- bzw. Aufarbeitungsrückstände. Die Qualität des gewonnenen Paramylons sollte eine Zulassung für die Verwendung im Nahrungsmittel- und Kosmetiksektor und evtl. auch in der Pharmazie möglich machen.

Die Produktion von Paramylon aus *Euglena gracilis* in einem Medium auf Basis von Kartoffelbruchwasser ist in einem wirtschaftlichen Maßstab möglich. Die Ergebnisse zeigen, dass Ausbeute und Qualität des dargestellten Verfahrens die notwendigen Kriterien erfüllt.

Eine weitergehende Abwasserbetrachtung, wie zu Projektbeginn geplant, ist im Einvernehmen mit allen Projektpartnern nicht notwendig, da das Volumen an eingesetztem Kartoffelbruchwasser auch bei einem Produktionsverfahren im Verhältnis zur Gesamtmenge klein bleibt und der normalen Abwasserbehandlung der Stärkefabrik zugeführt werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Hetland G, Ohno N, Aaberge IS, Lovik M  
Protective effect of beta-glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice.  
FEMS Immunol Med Microbiol, 27(2):111-6, Norway Oslo Geir. 2000
- [2] M Kondo Y, Kato A, Hojo H, Nozoe S, Takeuchi M, Ochi K  
Cytokine-related immunopotentiating activities of Paramylon, a beta-(1->3)-D-glucan from *Euglena gracilis*  
J Pharmacobiodyn, 15:11 617-21, Tohoku University, Sendai, Japan, 1992
- [3] Koizumi N, Sakagami H, Utsumi A, Fujinaga S, Takeda M, Asano K, Sugawara I, Ichikawa S, Kondo H, Mori S, et al  
Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon.  
Antiviral Res 21:1 1-14, University of Tokyo, Japan, 1993
- [4] Quesada LA, de Lustig ES, Marechal LR, Belocopitow E  
Antitumor activity of paramylon on sarcoma-180 in mice.  
Gann 67:3 455-9, University Tokyo Japan, 1976
- [5] Knorr D, Kohler G, Betscharf A, Potato protein concentrates,  
J. of Food process and preservation, S. 235-246, 1977
- [6] Pots A, Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, Dissertation,  
Wageningen, 1999
- [7] Van Koningsveld, Physico-chemical functional properties of potato ptoteins, J. Agri.  
Food Chem. , Bd. 49, S. 4889-4897, 2001
- [8] Lotz M, Biokonversion nachwachsender Rohstoffe: Die Stärkekartoffel als Rohstoff für die Biokonversion, Emsland-Stärke GmbH , Emlichheim 2003
- [9] Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM  
Algen, 3. Ausgabe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1993
- [10] Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S  
Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan.  
Mol Urol Spring;4(1):7-14, New York Medical College, Valhalla, New York, 2000
- [11] Ooi VE, Liu F  
Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes.  
Curr Med Chem ;7(7):715-29  
The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N.T., Hong Kong. 2000

- [12] Miura T, Ohno N, Miura NN, Adachi Y, Shimada S, Yadomae T.  
Antigen-specific response of murine immune system toward a yeast beta-glucan preparation, zymosan.  
*Immunol Med Microbiol* ,24(2):131-9  
Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Hachioji, Japan. FEMS, 1999
- [13] Gordon M, Bihari B, Goosby E, Gorter R, Greco M, Guralnik M, Mimura T, Rudinicki V, Wong R, Kaneko Y.  
A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV-positive patients: a phase I/II trial,*J Med*; 29(5-6):305-30, San Francisco General Hospital, CA, USA, 1998
- [14] Tsuzuki A, Tateishi T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T.  
Increase of hematopoietic responses by triple or single helical conformer of an antitumor (1-->3)-beta-D-glucan preparation, Sonifilan, in cyclophosphamide-induced leukopenic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* ;63(1):104-10  
Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Japan, 1999
- [15] Sakagami H, Kikuchi K, Takeda M, Sato T, Ichikawa S, Fujimaki M, Wada C, Komatsu N.  
Macrophage stimulation activity of antimicrobial N,N-dimethylaminoethyl paramylon. Showa University, Tokyo, Japan. *In Vivo* 5:2 101-5, 1991
- [16] Scheper T, Keye L, Schippers C.  
Bioprozesstechnik, Vorlesungsscript, Inst. f. Technische Chemie, Universität Hannover
- [17] Marose S.  
Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie  
Dissertation, Universität Hannover, 1999
- [18] Wedler, G.  
Lehrbuch der Physikalischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987.
- [19] Schmidt, W.  
Optische Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft , Weinheim, 1994.
- [20] Lindemann C.  
Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung,  
Dissertation, Universität Hannover, 1998.
- [21] Udenfried, S.  
Fluorescence assay in biology and medicine, Academic Press, 1964.
- [22] Zander, M.  
Fluorimetrie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1981,
- [23] Ichinose, N.; Schwedt, G.; Schnepfel, F.; Adachi, K.  
Fluorometric analysis in biomedical chemistry, J. Wiley and Sons, New York 1987.

- [24] Schulmann, S.G.  
Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications - Part 1, Chemical Analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York, 1985.
- [25] Wolfbeis, O.S.  
Fluorescence of organic natural products, in: Molecular luminescence spectroscopy methods and applications - Part 1, Hrsg.: Schulmann, S.G., Chemical analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York, 1985.
- [26] Lindemann, C. ; Marose, S. ; Nielsen, H. O. ; Scheper, T.  
2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring  
Sensors and actuators, Bd. 51, 1-3, S.273-277, 1998
- [27] Marose, S. ; Lindemann, C. ; Scheper, T.  
Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring  
Biotechnology progress, Bd. 14, 1, S.63-7, 1998
- [28] E. Stärk, B. Hitzmann, K. Schügerl, *et al.*  
In-Situ-Fluorescence-Probes: A Useful Tool for Non-Invasive Bioprocess Monitoring,  
Advances in biochemical engineering, biotechnology. - Berlin : Springer, ISSN 0724-6145, Bd. 74, S. 21-38, 2002
- [29] Bahr U, Karas M.  
Massenspektrometrie Tutorial, Inst. f. Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt
- [30] Bäumer D.  
Isolierung und partielle Charakterisierung der Paramylonsynthese aus *Euglena gracilis*  
Dissertation, Universität Bielefeld, 1998
- [31] Felski, M.  
laufende Dissertation, Universität Bielefeld
- [32] Buetow, D.E.  
Euglena structure and process, Encyclopedia of life sciences A1964, Univ. Illinois, 1999
- [35] Frerichs J.-G.  
Entwicklung eines In-situ-Mikroskops zur bildgestützten OnlineÜberwachung von Bioprozessen,  
Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2000
- [34] Frerichs J.-G.; Joeris K.; Konstantinov K.; Scheper T.  
In-Situ Microscopy: Automatically Monitoring Cell Populations in Bioreactors  
Pharmaceutical and biotechnology, page 246-254, 2001
- [35] Lotz M.  
Untersuchungen zur Hefekultivierung auf Nebenprodukten der Stärkeindustrie in einer Pilotanlage, Dissertation, Universität Hannover, 1986



- [36] Matthes, R.  
Versprittung von Nebenprodukten aus der Stärkegewinnung in einer Pilotanlage,  
Dissertation Universität Hannover, 1986
- [37] Blenke H.  
Advanced Biochem. Enggeg. , Bd 13, S 121, 1979
- [38] Burschapers, J. ; Schustolla, D. ; Schügerl, K. ; Roper, H. ; de Troostembergh, J.  
Engineering aspects of the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast  
*Moniliella tomentosa* var *pollinis* - Part 2. Batch and fed-batch operation in bubble  
column and airlift tower loop reactors. - In: Process biochemistry. - London : Morgan-  
Grampian, ISSN 0032-9592, Bd. 38, 4, S. 559-570, 2003
- [39] Stärk E.  
Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-  
Fluoreszenzspektroskopie und multivarianter Auswerteverfahren  
Dissertation, Universität Hannover, 2002
- [40] Harbeck C.  
Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in der Nahrungsmittelindustrie bei  
der Aufarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe  
Dissertation, Universität Hannover, 2003
- [41] Boehl D.  
Entwicklung einer Online-Analytik zur Bioprozessbeobachtung auf Basis der 2D-  
Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation Institut für Technische Chemie, Universität  
Hannover, 2003
- 42] Solle D.  
Analyse und Optimierung eines industriellen Biotransformationsprozesses zur  
Herstellung von Tryptophan, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität  
Hannover, 2003
- [43] Solle, D.; Geissler, D. ; Stark, E. ; Scheper, T. ; Hitzmann, B..  
Chemometric Modelling based on 2D-Fluorescence Spectra without a Calibration  
Measurement, Computer applications in the biosciences, Bd. 19, 2, S.173-177,2003
- [44] Hesse M, Meier H, Zeeh B, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie  
G. Thieme Verlag Stuttgart, 1991
- [45] Ulber, R; Protsch, C. ; Hitzmann, B. ; Willke, B. ; Faurie, R. ; Scheper, T. ; Solle, D.  
Optimisation of Industrial Tryptophan Production by the Use of Bioanalytical  
Systems, Chemie - Ingenieur - Technik, Bd. 73, 5, S.524-526, 2001.
- [46] Ulber, R. ; Plate, K. ; Demmer, W. ; Scheper, T. ; Weiss, T. ; Buchholz, H,  
Downstream Processing of Bovine Lactoferrin from Sweet Whey  
Acta biotechnologica, Bd. 21, S.27-36, 2001

## 7. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
BSA	Bovine serum albumin
BTM	Biotrockenmasse
m <sup>3</sup>	Kubikmeter
Da	Dalton
Diff.	Differenz
DW	Dry weight
Epp.	Eppendorfgefäß
Em	Emission
Ex	Exzitation
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
g/L	Gramm je Liter
Glc.	Glucose
h	Stunde
HDH	Hochdruckhomogenisator
Int.	Intervall
IR	Infrarotspektroskopie
kDa	Kilo Dalton
KFW	Kartoffelfruchtwasser
eKFW	Kartoffelfruchtwasser nach Eiweißfällung
MALDI	Matrix assisted Laser Desorption Ionization
min.	Minute
MHz	Megahertz
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NL	chemisch definierte Nährlösung
NMR	Kernresonanzspektroskopie
nm	Nanometer
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPL	Potato Protein Liquor
P <sub>t</sub>	Produktivität
PTM	Paramylontrockenmasse
RISP	Realtime Integrating Software Platform
RFI	relative Fluoreszenzaktivität

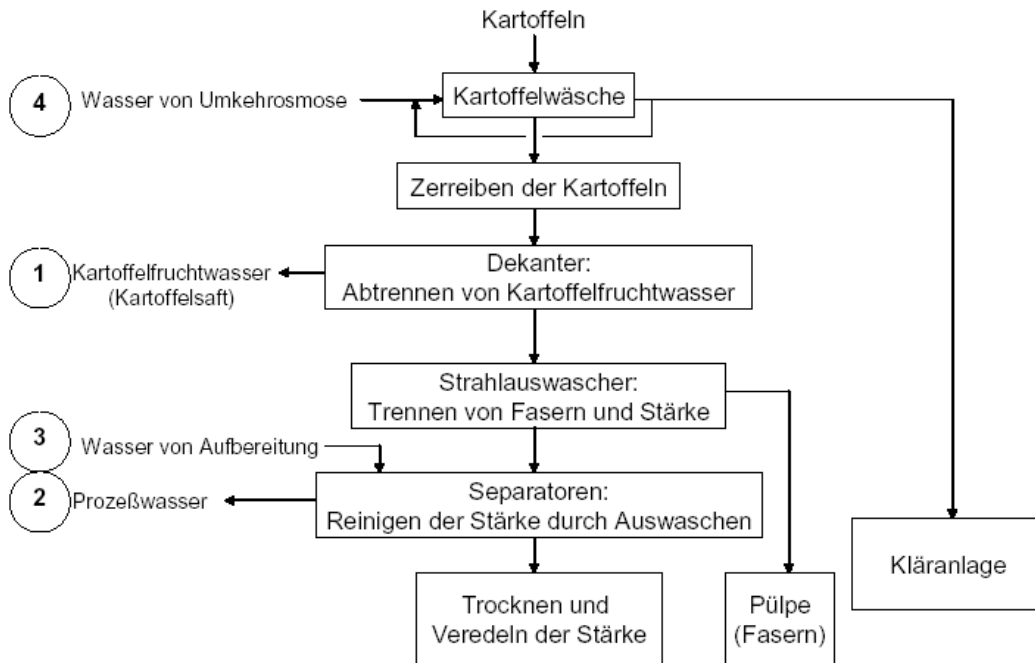
<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SAG	Sammlung von Algenkulturen Göttingen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDW	soluble dry weight
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
$t_d$	Verdopplungszeit
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
U/min.	Umdrehungen je Minute
UF	Ultrafiltration
UO	Umkehrosiose
US	Ultraschall
V	Volumen
$V/V_M$	Begasungsvolumen pro Mediumvolumen
Verg.	Vergrößerung
z. B.	zum Beispiel
Z/mL	Zellen pro Milliliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta

## 8. Anhang

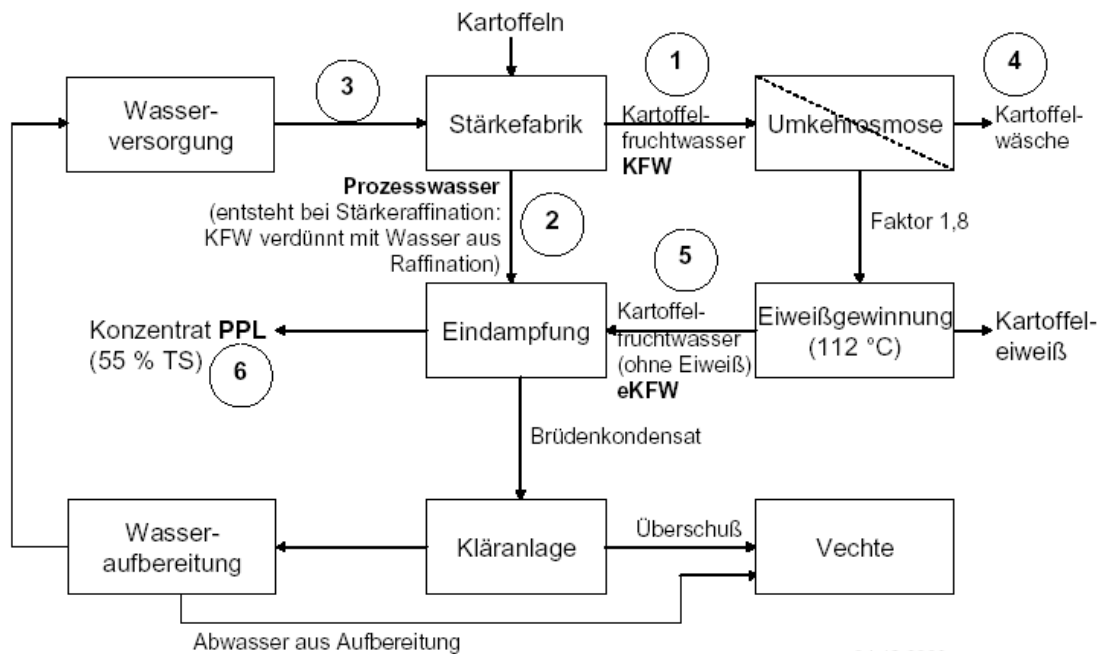
### Stärkeproduktion und Wasserkreislauf im Werk Emlichheim

(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Lotz, Emsland-Stärke GmbH)

#### Schema der Kartoffelstärkeherstellung



#### Konzept 2000 der Emsland-Stärke



## Beschreibung der Teilströme

### 1. KFW:

real in der Fabrik vermischt mit einigen % Prozesswasser PW, enthält Bisulfit und Entschäumer. Dadurch geringerer Lufteintrag und weniger ortho-Phosphat. Insgesamt etwas beständiger gegen Veränderung und Fäulnis als reiner Kartoffelsaft. TS etwas geringer. Ca. 4,5 % TS. Enthält alle Proteinfractionen. **Hauptnachteil:** kein definierter Produktstrom, nicht vergleichbar mit „Kartoffelsaft“. Für Versuchszecke kann in der Fabrik auch reines KFW hergestellt werden.

### 2. PW:

entsteht durch Auswaschen von restlichem KFW (etwa 30 % des gesamten KFW in den Kartoffeln) aus der Rohstärke nach Faserabtrennung mit der doppelten Menge Frischwasser, daher ca. 1,5 % TS. Enthält durch den Produktionsprozess Entschäumer und Bisulfit, aber auch geringe Menge Stärke und Pülpe (Fasern). Enthält alle Proteinfractionen. **Nachteil:** ist durch den Produktionsprozess stark verkeimt.

### 5. eKFW:

entsteht aus (1) durch Dampfinjektion bei 112 °C und 20 Minuten Verweilzeit. Ca. 50 % des vorhanden Proteins flockt aus und wird abgetrennt. Der Überstand (Oberlauf) ist enteweißtes KFW = eKFW. Der Zustand (aktiv/denaturiert) und welche Proteine noch enthalten sind ist nicht bekannt. Vermutlich sind die kleinen Molekülfraktionen noch gelöst. Durch Hitzebehandlung lagerstabiler als KFW. **Nachteil:** nur noch Teile des Proteins enthalten, Proteine wahrscheinlich denaturiert.

### 6. PPL:

Eindampfkonzentrat mit 55 % TS. Wird durch Eindampfen von ca. 2/3 eKFW und 1/3 PW bei 85 °C im Vakuum im Fallfilmverdampfer gewonnen. Kann im Gegensatz zu eKFW noch aktive Proteine enthalten. Aus dem PW ist auch die gesamte Proteinfraction enthalten.

#### **Nachteil:**

viskos, viele Feststoffe, viele Verunreinigungen, Zustand des Proteins unbekannt.

## Lebenslauf

Name	Joachim Ryll
Geburtstag	14.08.1966 in Bissendorf ( jetzt Teil der Gemeinde Wedemark).
Schulbildung	
1973-1976	Grund- und Hauptschule Bissendorf
1977-1978	Realschule Mellendorf
1979-1987	Gymnasium Mellendorf.
1987	Allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst	
1988-1989	Stabsdienstsoldat im Panzerbataillon 33, Neustadt (Luttmersen)
Praktikum	
1989	Firma Ökolimna (Inst. f. Ökologie und Gewässerkunde) in Burgwedel
Hochschulausbildung	
1989-1999	Studiengang Chemie an der Universität Hannover
1994	Vordiplom
1999	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. T. Scheper Abschluss der Diplomprüfung am 29.11.1999
2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover seit Januar 2000. Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. T. Scheper im Juli 2000.