

Entwicklung eines Sensorsystems zur Messung der biologischen Aktivität von Mikroorganismen und tierischen Zellen

Dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin (technisch orientiert)
Anne Lämmel
geboren am 27. Juni 1968 in Frankenberg

Frankfurt 1999

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl

Tag der Promotion: 30. April.1999

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom 15. August 1995 bis 15. August 1998 am Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e. V. in Frankfurt am Main im Rahmen eines von der AiF geförderten Forschungsprojektes.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Betreuung der Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen,

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl für die Übernahme des Koreferates,

Herrn Dr. Dieter Sell für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit,

den Institutsangehörigen in der DECHEMA, insbesondere der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik, für die angenehme Arbeitsatmosphäre,

Stefan Marose und Egbert Stärk vom Institut für Technische Chemie der Universität Hannover für die gemeinsame Durchführung der Versuche mit *S. cerevisiae* H 620,

Georg Renemann und Alexander Loa, ebenfalls vom Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, für die Durchführung der Versuche mit tierischen Zellen,

Andreas Jung und Dirk Semiller, die mit der Erstellung ihrer Diplomarbeiten auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

Dr. Jochen Michels für sein Korrekturlesen,

Thomas Stief für seine Geduld bei der Behebung der technischen Probleme beim Schreiben meiner Arbeit,

Dr. Kai Vuorilehto für seine Anregungen.

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung.

In der Arbeit wurde ein Meßsystem zur Bestimmung der Aktivität von Mikroorganismen und tierischen Zellen entwickelt. Dessen Kernstück ist die Biobrennstoffzelle. Die von Sell (1991) zur Energieerzeugung konstruierte Biobrennstoffzelle wurde so umgestaltet, daß es möglich wird, sie als bioelektrochemischen Sensor zu nutzen.

Das Meßprinzip beruht auf der amperometrischen Bestimmung des durch die Mikroorganismen verursachten Stromflusses in der Biobrennstoffzelle.

Es erwies sich, daß eine Prozeßüberwachung mit der Biobrennstoffzelle sowohl mit als auch ohne Mediator möglich ist. Der Mediator führte lediglich zu einer Verstärkung des Stromsignals.

Eine Charakterisierung des Sensorsignals erfolgte, indem bekannte Phänomene mit Einfluß auf den physiologischen Aktivitätszustand von Mikroorganismen, wie Substratmangel, Diauxie und physiologisch aktive Substanzen, durch das Signal der Biobrennstoffzelle wiedergegeben wurden. Zusätzlich erfolgte der Vergleich des Stromsignals mit verschiedenen, die Fermentation beschreibenden Prozeßparametern, wie z. B. Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentration im Abgas.

Es konnte gezeigt werden, daß das Stromsignal eindeutig eine Funktion der Anzahl der lebenden Zellen und ihrer Aktivität ist.

Eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten wurde getestet, und in allen hat sich die Universalität des Stromsignals der Biobrennstoffzelle erwiesen. Die Eignung des Stromsignals zur online-Prozeßkontrolle wurde beispielhaft an der Überwachung von Fermentationen mit *Escherichia coli*, verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-Varietäten und *Penicillium chrysogenum* nachgewiesen. Außerdem wurde seine Anwendbarkeit in verschiedenen Medien, wie in Mineralmedien, aber auch in komplexen Medien, wie z. B. in Säften, demonstriert. Die Biobrennstoffzelle zeigte sich nicht nur für die aerobe, sondern auch für die anaerobe Fermentationskontrolle geeignet. Als Beispiel für eine anaerobe Fermentation erfolgte eine *E. coli*-Kultivierung sowie der industriennahe Einsatz des Sensors bei der Herstellung von Apfelwein. Eine weitere praxisnahe Anwendung war die Überwachung der biologischen Aktivität von Mischkulturen in Klärschlamm. Auch hier lieferte die Biobrennstoffzelle aussagekräftige Resultate. Mit der Biobrennstoffzelle war es ebenfalls möglich, die biologische Aktivität von solch sensitiven Systemen, wie es die tierischen Zellen darstellen, zu bestimmen. Dieser auf einer Biobrennstoffzelle basierende bioelektrochemische Sensor kann bei entsprechender Prozeßanpassung eine zukünftige Alternative zu den bekannten Aktivitätssensoren darstellen.

Key words: Biobrennstoffzelle, Bioprozeßüberwachung, bioelektrischer Sensor

In this thesis a system for measuring the activity of microorganisms and mammalian cells is presented. The main component is a bio fuel cell. The bio fuel cell, developed by Sell (1991) for the production of energy, was converted into a biochemical sensor.

The measuring principle is the amperometric measurement of the current flow, induced by microorganisms, inside the bio fuel cell.

Process monitoring using the bio fuel cell was possible both with and without a mediator. The mediator just caused an amplification of the current signal.

The current signal was characterized by comparing the signal of the bio fuel cell with known phenomena which influence the state of physiological activity of microorganisms, such as lack of substrate, diauxie and physiological active substances. Additionally the current signal was evaluated by comparing different fermentation parameters, such as the concentration of carbon dioxide and oxygen in exhaust gas.

The current signal was found to be a clear function of the number of living cells and their activity.

Different possibilities of performance were tested, thus proving the universality of the bio fuel cell's current signal. The use of this signal for online process control was demonstrated by monitoring cultivations of *Escherichia coli*, different *Saccharomyces cerevisiae* varieties and *Penicillium chrysogenum*. Its applicability in several media, e.g. mineral media, and also in complex media, e.g. juices, was also demonstrated. The bio fuel cell was found to be suitable not only for aerobic, but also for anaerobic cultivation control. Among the examples presented are the anaerobic fermentation monitoring of an *E. coli* culture and the production of apple wine. Another practical application was monitoring the biological activity of mixed cultures in sludge. In this case, too, meaningful results were gained by using the bio fuel cell. With this sensor it was possible to determine the biological activity of such sensitive systems as mammalian cells.

When adapted to the process required, this bioelectrical sensor based on a bio fuel cell is a promising alternative to established activity sensors.

Key words: bio fuel cell, bioprocess monitoring, bioelectrical sensor

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG | 4 |
| 2 | THEORETISCHE GRUNDLAGEN | 6 |
| 2.1 | Die Biobrennstoffzelle | 6 |
| 2.1.1 | Die Entwicklung der Biobrennstoffzelle | 6 |
| 2.1.2 | Die Energiegewinnung in der Biobrennstoffzelle | 7 |
| 2.1.3 | Die Komponenten der Biobrennstoffzelle | 9 |
| 2.1.3.1 | Die elektrochemische Zelle | 9 |
| 2.1.3.2 | Die biologische Komponente der Biobrennstoffzelle | 12 |
| 2.1.3.3 | Redoxmediatoren | 12 |
| 2.2 | Vermehrung und Wachstum von Mikroorganismen | 15 |
| 2.2.1 | Wachstum in einer diskontinuierlichen Kultur (Batch-Kultur) | 15 |
| 2.2.2 | Wachstum in einer kontinuierlichen Kultur | 18 |
| 2.2.3 | Bilanzierung von biologischen Prozessen | 20 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 3.1 | Mikroorganismen - Anzucht, Stammhaltung und Herstellen einer Vorkultur | 23 |
| 3.1.1 | <i>Escherichia coli</i> | 23 |
| 3.1.2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 23 |
| 3.1.3 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 25 |
| 3.1.4 | Tierische Zellen | 25 |
| 3.2 | Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung | 25 |
| 3.2.1 | Potentiostatisch geregeltes Dreielektrodensystem | 25 |
| 3.2.2 | Die Biobrennstoffzelle | 26 |
| 3.2.3 | Kultivierungen mit Fermentationskontrolle | 27 |
| 3.2.3.1 | Kultivierungen mit diskontinuierlicher Fermentationskontrolle | 27 |
| 3.2.3.2 | Kultivierungen mit kontinuierlicher Fermentationskontrolle | 29 |
| 4 | ERGEBNISSE | 35 |
| 4.1 | Optimierung der Biobrennstoffzelle | 35 |
| 4.1.1 | Konstruktive Veränderungen | 35 |
| 4.1.2 | Wahl des Elektrodenmaterials | 36 |
| 4.1.3 | Einfluß von Anodenfläche und -position | 37 |
| 4.1.4 | Einfluß des Volumens des Innenraums der Biobrennstoffzelle | 39 |
| 4.2 | Experimente zum Einsatz von Mediator und Mikroorganismen in der Biobrennstoffzelle | 41 |
| 4.2.1 | Experimente mit dem Dreielektrodensystem zur Eignung des Mediators für den Einsatz in der Biobrennstoffzelle | 41 |
| 4.2.1.1 | Ermittlung des optimalen Meßbereichs für die Versuche mit dem Dreielektrodensystem | 41 |
| 4.2.1.2 | Mediatorreduktion durch eine <i>Escherichia coli</i> -Kultur | 43 |
| 4.2.1.3 | Mediatorreduktion durch eine <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Kultur | 44 |
| 4.2.1.4 | Mediatorreduktion durch eine <i>Penicillium chrysogenum</i> -Kultur | 44 |
| 4.2.1.5 | Mediatorreduktion durch tierische Zellen | 45 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.2 Einsatz der Biobrennstoffzelle zur Kontrolle des Wachstums verschiedener Mikroorganismen | 47 |
| 4.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> -Kultivierung | 47 |
| 4.2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Kultivierung | 48 |
| 4.2.2.3 <i>Penicillium chrysogenum</i> -Kultivierung | 49 |
| 4.3 Einfluß verschiedener Faktoren auf das Wachstum von <i>E. coli</i> und das Stromsignal | 49 |
| 4.3.1 Einfluß der Konzentration der Substrate | 49 |
| 4.3.2 Einfluß der Art des Substrats | 51 |
| 4.3.3 Einfluß von Substratgemischen | 53 |
| 4.3.4 Einfluß von physiologisch wirksamen Substanzen | 55 |
| 4.4 Kontrolle des Fermentationsverlaufs mit der Biobrennstoffzelle | 58 |
| 4.4.1 Diskontinuierliche Fermentationskontrolle mit der Biobrennstoffzelle | 58 |
| 4.4.2 Kontinuierliche Fermentationskontrolle mit der Biobrennstoffzelle | 61 |
| 4.5 Charakterisierung des Stromsignals der Biobrennstoffzelle anhand verschiedener Prozeßparameter | 68 |
| 4.5.1 Darstellung verschiedener Prozeßparameter während einer <i>Escherichia coli</i> -Kultivierung | 68 |
| 4.5.2 Darstellung verschiedener Prozeßparameter während einer <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Kultivierung | 72 |
| 4.5.3 Darstellung verschiedener Prozeßparameter einer oszillierend wachsenden <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Kultur | 76 |
| 4.5.4 Bestimmung der biologischen Aktivität von Klärschlamm | 80 |
| 4.5.5 Bestimmung des Gärverhaltens verschiedener Hefen in Säften | 83 |
| 4.5.6 Bestimmung der biologischen Aktivität von tierischen Zellen | 88 |
| 5 DISKUSSION UND AUSBLICK | 93 |
| 6 SYMBOL-/ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 103 |
| 7 ANHANG | 106 |
| 7.1 Verwendete Meßmethoden | 106 |
| 7.1.1 Messung der Glucosekonzentration | 106 |
| 7.1.2 Messung der Gesamtzuckerkonzentration | 106 |
| 7.1.3 Messung der Ethanolkonzentration | 108 |
| 7.1.4 Messung der optischen Dichte | 108 |
| 7.1.5 Bestimmung der Biotrockenmasse | 108 |
| 7.1.6 Darstellung der Biomasse durch die optische Dichte | 109 |
| 7.1.7 Messung der Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl | 110 |
| 7.1.8 Messung der Sauerstoff- und der Kohlendioxidkonzentration im Abgas | 110 |
| 7.1.9 Messung der Sauerstoffkonzentration im Medium | 111 |
| 7.1.10 Messung der Trübung | 111 |
| 7.1.11 Messung des Redoxpotentials | 111 |
| 7.1.12 Messung des pH-Wertes | 112 |
| 7.1.13 Fluoreszenzmessung | 112 |
| 7.2 Kulturmedien | 113 |

| | |
|---|------------|
| 7.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 113 |
| 7.2.1.1 Vollmedium | 113 |
| 7.2.1.2 Mineralmedium | 113 |
| 7.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 114 |
| 7.2.2.1 Universalmedium | 114 |
| 7.2.2.2 Vollmedium | 114 |
| 7.2.2.3 Mineralmedium | 115 |
| 7.2.2.4 Saft als Medium | 115 |
| 7.2.2.5 Schatzmann-Medium | 115 |
| 7.2.3 <i>Penicillium chrysogenum</i> | 116 |
| 7.2.3.1 Malzextraktmedium | 116 |
| 7.2.4 Tierische Zellen | 116 |
| 7.2.4.1 DMEM/Ham`s F12-Nut-Mix | 116 |
| 7.2.4.2 BioPro 1-Medium | 117 |
| 7.3 Mediatorlösung | 117 |
| 7.4 Phosphatpuffer für das Dreielektrodensystem | 117 |
| 7.5 Medienbestandteile | 117 |
| 7.6 Chemikalien | 118 |
| 7.7 Elektrodenmaterialien und Biobrennstoffzellenzubehör | 118 |
| 7.8 Geräte | 119 |
| 7.9 Technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle | 121 |
| 8 LITERATURVERZEICHNIS | 125 |

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Biomasse ist eine der wichtigsten Meßgrößen in der Biotechnologie. Um eine optimale Nutzung ihres Potentials zu erreichen, ist es notwendig, die Konzentration und die Vitalität der Mikroorganismen in der Biomasse kontinuierlich zu analysieren. Nur die permanente Überwachung ermöglicht es, rechtzeitig in das Geschehen einzugreifen und damit den Erfolg des biologischen Prozesses zu sichern.

Das betrifft u. a. solche Bereiche wie die Biotechnologie, die Mikrobiologie, die Lebensmittelindustrie, die Medizin und die Abwasseraufbereitung.

Für Prozesse, bei denen die Produktion von Biomasse, z. B. von Futterhefe, im Vordergrund steht, ist es ausreichend, die Gesamtbiomasse zu bestimmen. Eine Unterscheidung zwischen vitaler und abgestorbener Biomasse ist hierfür nicht notwendig.

Häufiger ist jedoch das Ziel der Fermentation die Herstellung hochwertiger Produkte (z. B. Antibiotika, Aminosäuren, Insulin). Hierbei ist nur die vitale Biomasse von Interesse, da nur sie in der Lage ist, die jeweils interessierenden Stoffe zu produzieren.

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, die Konzentration der Biomasse zu erfassen (Pons, 1992).

Dazu werden leistungsfähige Sensoren benötigt, die bei unterschiedlichsten Prozeßbedingungen in der Lage sind, wichtige Prozeßgrößen mit genügender Genauigkeit zu erfassen. Sensoren, die auch als Meßfühler bezeichnet werden, ermöglichen es, eine chemische, physikalische oder biologische Meßgröße z. B. in ein optisches oder elektrisches Signal zu transformieren.

Die Anforderungen an diese Sensoren sind vor allem in der Biotechnologie, wo sie zur Fermentationskontrolle eingesetzt werden sollen, sehr hoch. Kriterien für solch ideale Sensoren zur Bestimmung der Biomasse in Fermentoren sind in der Literatur beschrieben (Pons, 1992). So sollte ein idealer Sensor z. B. für eine größere Gruppe von Mikroorganismen einsetzbar sein und möglichst keine weiteren Hilfsstoffe für seine Funktion benötigen. Die meisten der heute eingesetzten Sensoren für die Bestimmung der Biomasse sind jedoch weit von den Kriterien dieses idealen Sensors entfernt.

So bestimmen viele nur den Gesamtfeststoffgehalt. Das heißt, sie ermitteln sowohl die Gesamtbiomasse als auch die Feststoffpartikel, ohne zwischen beiden unterscheiden zu können.

Vor allem in technischen Medien, wo z. B. Erdnußmehl, Sojamehl oder Kartoffelpulpe als Substrat verwendet werden, führt dies zur Verfälschung der Meßergebnisse, da diese Medien keinen konstanten Feststoffgehalt aufweisen.

Ein großes Problem für die Entwicklung von Sensoren stellt außerdem die Verschiedenartigkeit der Mikroorganismen dar.

Es existieren verschiedene Modelle von Sensoren, um die Biomassekonzentration zu ermitteln.

In der Laborpraxis sind der Coulter-Counter und das Durchflußcytometer häufig verwendete Modelle zur Bestimmung der Zellzahl. Der hohe Aufwand bei der Analyse und die beträchtlichen Kosten machen sie jedoch zu reinen offline-Verfahren.

Das Ziel jeder Fermentationskontrolle ist jedoch eine online-Prozeßüberwachung. Nur so ist es möglich, die sich im Verlauf des Prozesses ändernden Parameter, die negativ auf den Prozeß rückwirken, zu erkennen und sie in geeigneter Weise zu regulieren.

Eine vielversprechende Alternative stellen die auf dem Prinzip der Biobrennstoffzellen basierenden bioelektrochemischen Sensoren dar, da hier eine rein elektrochemische Messung erfolgt, die durch die Trübung oder einen sich verändernden Partikelgehalt im Medium nicht beeinflusst wird.

Zielsetzung

Eine Biobrennstoffzelle soll in der Form umgestaltet werden, daß es möglich wird, sie als bioelektrochemischen Sensor zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität und damit zur Überwachung des mikrobiellen Wachstums einsetzen zu können.

Es sollen Zusammenhänge zwischen dem Stromsignal und der mikrobiellen Aktivität aufgezeigt und dadurch das Stromsignal charakterisiert werden.

In verschiedenen Anwendungen soll die Funktionsfähigkeit des Sensorsystems nachgewiesen und damit zukünftige Anwendungsgebiete aufgezeigt werden.

Im Rahmen dessen soll die Biobrennstoffzelle:

- mit verschiedenen Organismen (*E. coli*, *S. cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, tierische Zellkulturen, eine Mischkultur in Klärschlamm)
- mit und ohne Zugabe von Mediator
- in verschiedenen Medien (Mineralmedium bis hin zu komplexen Medien wie Säfte)
- zur aeroben und anaeroben Fermentationskontrolle
- zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Klärschlamm
- zur Bestimmung des Gärverhaltens verschiedener Hefen in Säften
- zur Bestimmung der biologischen Aktivität von tierischen Zellen eingesetzt werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Biobrennstoffzelle

2.1.1 Die Entwicklung der Biobrennstoffzelle

Die Geschichte der Biobrennstoffzelle begann im Jahre 1911 mit den Versuchen des britischen Botanikers M. C. Potter. Er beobachtete, daß sich an einer Platinelektrode in einem anaeroben Kulturmedium, das aus Glucoselösung bestand, und das Bäckerhefe bzw. *Escherichia coli* enthielt, ein negatives Potential gegenüber einer Referenzelektrode aus dem gleichen Material ausbildete, die sich in einem zellfreien aeroben Kulturmedium befand (Potter, 1911). Die Zelle erzeugte einen Strom von 0,2 mA.

1931 gelang es Cohen, das von Potter gezeigte, schwache Stromsignal zu verstärken. Er stabilisierte das Stromsignal mit einem Redoxmediator, „giftiges Agens“ genannt, im Anodenraum.

In den frühen 60er Jahren kam es mit dem Aufschwung der Weltraumforschung zu einem erneuten großen Interesse an dem „Biostrom“. Es wurde verstärkt an der Entwicklung von Biobrennstoffzellen gearbeitet, die als energieproduzierende Abfallverwertungsmaschinen für längere Weltraumflüge dienen sollten. Dieser Boom der Erforschung solcher Biobrennstoffzellen endete jedoch etwa 1965, da für einen solchen Einsatz die Stromausbeute zu niedrig war (Cohn, 1965).

Mitte der 60er Jahre wurde dann versucht, Biobrennstoffzellen als Energiequelle für Herzschrittmacher einzusetzen. Solche Biobrennstoffzellen sollten in den Körper implantiert werden und dort mit Glucose und Sauerstoff aus dem Blut arbeiten (Sturm, 1980). Damals wurden Biobrennstoffzellen auch für den Betrieb von Radiogeräten oder für die Versorgung von Leuchtbojen und elektrischen Viehweidezäunen kommerziell angeboten (Lewis, 1966; The Financial Times, 1963).

In der darauffolgenden Zeit wurden die Arbeiten an den Biobrennstoffzellen jedoch weitestgehend eingestellt. Das Interesse wandte sich den elektrochemischen Zellen zu, den erhofften Kraftwerken der Zukunft, da hier deutlich mehr Energie gewonnen werden konnte (Randow, 1990).

In den letzten Jahren ist ein wieder erwachendes Interesse für die Biobrennstoffzellen zu beobachten. Es wird erneut ihre Nutzung als Energiequelle für Uhren und Kameras in Erwägung gezogen, aber auch für eine mögliche Energieversorgung aus industriellen Abfällen in der Dritten Welt (Bennetto, 1987).

Matsunaga et al. (1979) nutzten erstmals Biobrennstoffzellen als Biomassesensoren, um in-situ Zellkonzentrationen zu bestimmen. Sie verwendeten zwei Biobrennstoffzellen, bei denen die Anoden in eine zellhaltige Probe getaucht wurden. Eine der Anoden ist von einem Dialyseschlauch umhüllt, um den Kontakt der Mikroorganismen mit der Elektrode zu verhindern und den nur durch die elektroaktiven Substanzen bedingten Strom registrieren zu können. Die Differenz der Ströme der beiden Brennstoffzellen ist der Biomassekonzentration proportional. Probleme stellten die niedrige Sensitivität und die langen Antwortzeiten von 10 bis 15 min dar. In den darauf folgenden Jahren wurde dieses System weiter verbessert, z. B. durch eine Aufkonzentration der Probe und den Einsatz von Mediatoren (Nishikawa et. al., 1982; Turner et al., 1983).

Patchett et al. (1988) nutzte eine von Roller et al. (1984) entwickelte Biobrennstoffzelle zur Bestimmung der Zellzahl. Dabei kam Thionin als Mediator zum Einsatz. Ein Vorteil dieser Methode waren die relativ kurzen Antwortzeiten von ca. 5 min.

Sell (1991) hob die Zweiteilung des Innenraums einer zur Energieerzeugung entwickelten Biobrennstoffzelle durch Einsatz einer Sauerstoffdiffusionskathode auf. Becker (1994) und Grumann (1995) verwendeten diese Biobrennstoffzelle erstmals als Sensor.

Becker gelang es, mit ihrer Hilfe Glucosekonzentrationen zu bestimmen, Grumann ermittelte in der logarithmischen Wachstumsphase während eines Fermentationsprozesses die Zellzahl mit Hilfe einer Kalibrierkurve.

Außerdem wurde von beiden Autoren versucht, die Biobrennstoffzelle als Nachweissystem für Giftstoffe zu nutzen.

2.1.2 Die Energiegewinnung in der Biobrennstoffzelle

Es wird davon ausgegangen, daß der von der Biobrennstoffzelle erzeugte Stromfluß auf die Existenz biologisch reduzierter, elektroaktiver Stoffe zurückzuführen ist. Dies können z. B. ein infolge des Stoffwechsels der Mikroorganismen reduzierter Mediator oder Produkte der Mikroorganismen sein.

Steht im Prozeß ein Mediator zur Verfügung, dann wird dieser durch die Mikroorganismen reduziert. Diese reduzierte Form des Mediators wird an der Anode oxidiert. Dabei werden - unter Freisetzung von Protonen (Wasserstoffionen) - Elektronen abgegeben. Diese Elektronen wandern über einen äußeren Stromkreis, in den ein Widerstand integriert ist, zur Kathode. Dadurch kann an diesem Widerstand ein dem Strom entsprechendes Spannungssignal registriert werden.

Die Elektronen reagieren dann mit dem durch die Sauerstoffdiffusionskathode eindiffundierenden Sauerstoff und den an der Anode entstandenen Protonen zu Wasser.

Der Aufbau und die Funktionsweise der Biobrennstoffzelle sind in der folgenden Abbildung gezeigt (Abb. 1). Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, daß der Mediator zwei Elektronen und zwei Protonen aufnimmt bzw. abgibt.

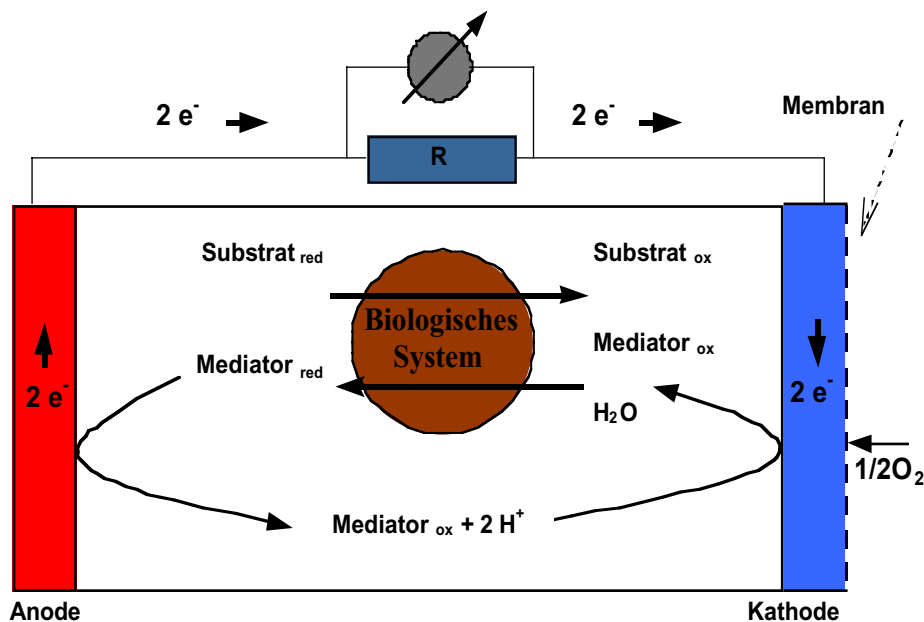


Abb. 1: Schematischer Aufbau und Funktion der Biobrennstoffzelle
ox = oxidierte Form, red = reduzierte Form, R = Widerstand

Diese Reaktion ist so lange möglich, wie die Mikroorganismen aktiv sind, d. h., wie sie im Fermentationsmedium verwertbares Substrat in ausreichender Menge vorfinden.

Steht im Fermentationsprozeß kein Mediator zur Verfügung, sind infolge des mikrobiellen Stoffwechsels entstehende reduzierte Substanzen die Ursache für das Stromsignal. Der elektrochemische und der elektrische Vorgang laufen ebenso ab, wie dies bei Vorhandensein von Mediator beschrieben wurde. Jedoch ist der Strom auf Grund der Konzentrationsverhältnisse wesentlich geringer.

2.1.3 Die Komponenten der Biobrennstoffzelle

2.1.3.1 Die elektrochemische Zelle

Die elektrochemische Zelle besteht aus Anode und Kathode, die sich in einem Gehäuse aus Plexiglas befinden.

Von Sell (1991) wurde als Anode eine Graphitelektrode, als Kathode eine Sauerstoffdiffusionselektrode verwendet.

An der Anode erfolgt der Stofftransport vorrangig durch drei Transportmechanismen (Naumer und Heller, 1997).

Diese sind

- Migration (auf Potentialgefälle beruhende Wanderung geladener Teilchen)
- Diffusion (auf Konzentrationsgefälle beruhende Teilchenbewegung) und
- Konvektion (z. B. thermische Strömungen oder auf Rühren beruhender Transport, d. h. hydrodynamische Störungen).

Die Konzentrationsverhältnisse direkt vor der Elektrode werden vor allem von den Diffusionsprozessen beeinflusst (Abb. 2). Das Plateau des Stroms in der Strom-Spannungs-Kennlinie bezeichnet man deshalb als Diffusionsgrenzstrombereich (ASTECH, 1992).

In diesem diffusionskontrollierten Teil der Strom-Spannungs-Kennlinie werden alle an die Elektrodenoberfläche gelangenden elektroaktiven Substanzen umgesetzt. D. h., der Stromfluß hängt kaum noch vom Elektrodenpotential, sondern fast nur noch von ihrer diffusionsbedingten Nachlieferung aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche ab. Er ist damit proportional zur Konzentration der elektroaktiven Substanzen.

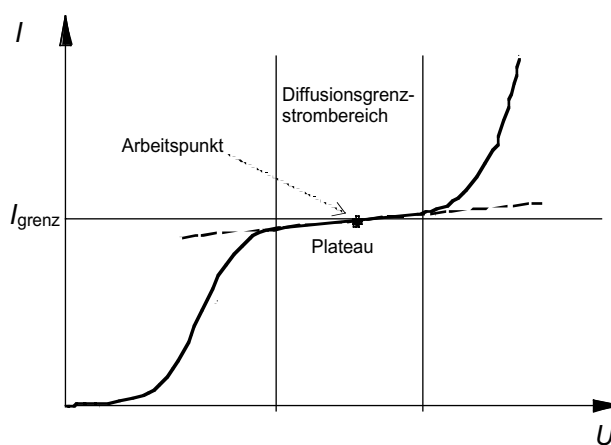


Abb. 2: Idealisierte Strom-Spannungs-Kennlinie (—) mit Diffusionsgrenzstrom I_{grenz}

Für die stationäre Diffusion an der Phasengrenze gilt nach Nernst in geringer Entfernung von der Elektrodenoberfläche, daß sich innerhalb der Diffusionsschicht mit der Dicke d die Konzentration linear ändert (Abb. 3).

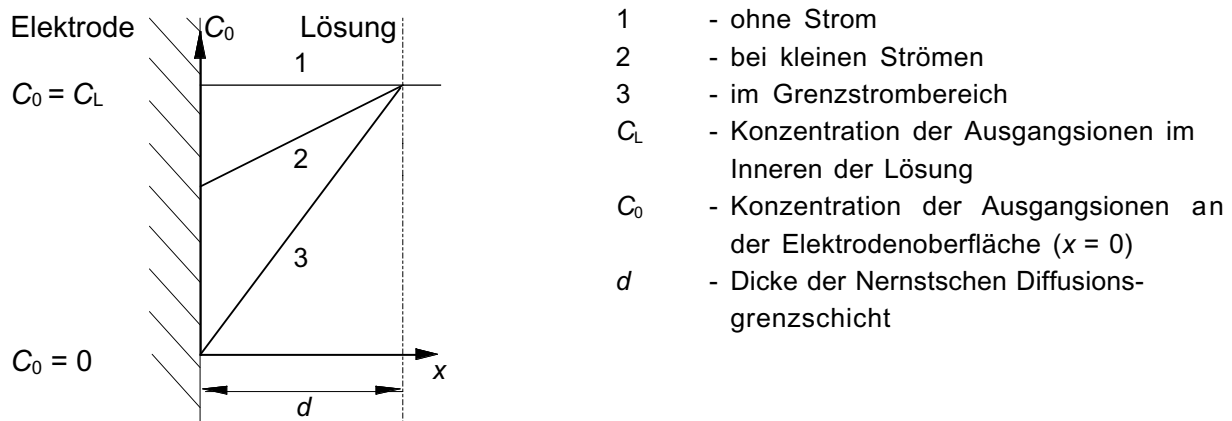


Abb. 3: Konzentrationsgradient in der Nernstschen Diffusionsgrenzschicht

Intensives Rühren führt zu einer Abnahme der Dicke der Diffusionsgrenzschicht, damit zu einer Erhöhung der Diffusionsgrenzstromdichte und so zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit des Systems.

Den Zusammenhang von Diffusionsgrenzstrom I_{grenz} und Konzentration C_D der elektroaktiven Substanz im Plateaubereich der Strom-Spannungs-Kennlinie beschreibt folgende Gleichung:

$$I_{\text{grenz}} = \frac{z \cdot F \cdot D \cdot A}{d} \cdot C_D \quad (1)$$

- I_{grenz} - Diffusionsgrenzstrom
 z - Anzahl der an der Elektrodenreaktion beteiligten Elektronen
 F - Faradaysche Konstante
 D - Diffusionskoeffizient
 A - Fläche der Arbeitselektrode
 d - Dicke der Diffusionsgrenzschicht
 C_D - Konzentration der elektroaktiven Substanz im Plateaubereich der Strom-Spannungs-Kennlinie

Wenn
$$\frac{I_{\text{grenz}}}{C_D} = \frac{z \cdot F \cdot D \cdot A}{d} = \text{konst.} \quad (2)$$

gilt, dann ist der Grenzstrom der Konzentration proportional. Gleichung 1 wird dann als Massentransportgleichung bezeichnet.

Um die Konzentration der elektroaktiven Substanz zu ermitteln, ist es notwendig, die Strom-Spannungs-Kennlinie dieser Substanz in der Probe zu kennen.

Die aktive Elektrodenoberfläche, die abhängig von Elektrodengeometrie und -oberflächenbeschaffenheit ist, beeinflusst den elektrochemischen Umsatz und damit die Verarmung des elektroaktiven Stoffes an der Oberfläche.

Für die Anode wird in der Literatur neben Graphit als Material auch die Verwendung von Platin und platinierterm Kohlenstoff vorgeschlagen (Bennetto, 1984).

Die Sauerstoffdiffusionskathode wurde erstmals von Sell (1991) in einer Biobrennstoffzelle eingesetzt. Durch sie wurden der Aufbau und der Betrieb der Biobrennstoffzelle deutlich vereinfacht. So entfiel die Notwendigkeit jeglicher Be- und Entgasungseinrichtungen, da die Elektrode den Sauerstoff direkt über ihre poröse Oberfläche aus der sie umgebenden Gasatmosphäre entnimmt. Außerdem ist keine Teilung in eine anodische und eine kathodische Kammer notwendig.

Die Sauerstoffdiffusionskathode besteht aus einem Trägernetz, auf das ein Katalysatorgemisch aufgebracht ist, und einer darauf aufgewalzten PTFE-Folie, die als Elektrolytbarriere dient. Das Trägernetz dient als Stützgerüst und zur Stromableitung. Es besteht aus einem vernickelten Kupfergitter.

Das Katalysatorgemisch besteht aus Manganoxid, Aktivkohle und PTFE. Der eigentliche Katalysator ist das Manganoxid. Das leitfähige Gerüst um die Katalysatorkörner ist eine Aktivkohle mit einer Oberfläche von $1100 \text{ m}^2/\text{g}$. Als hydrophobes Bindemittel ist PTFE verarbeitet worden.

Bedingt durch ihre ursprüngliche Anwendung in technischen Wasserstoff-Sauerstoff-Zellen sind diese Sauerstoffdiffusionselektroden auf die Erreichung hoher Stromdichten ausgelegt. Durch die Partikelstruktur des Katalysatorgemischs und der infolgedessen porösen Elektrode, die zwischen Elektrolyt und Gasraum angeordnet ist, gelingt es, die sog. Dreiphasenzone, in der Festkörper, Flüssigkeit und Gasphase unmittelbar zusammentreffen, zu vergrößern. Die elektrochemischen Reaktionen laufen dann in ringförmigen Reaktionszonen im Innern der Vielzahl von Poren ab.

Die folgende Abbildung zeigt die ursprünglich von Sell zur Erzeugung elektrischer Energie entwickelte und von Grumann erstmals als Sensor genutzte Biobrennstoffzelle (Abb. 4).

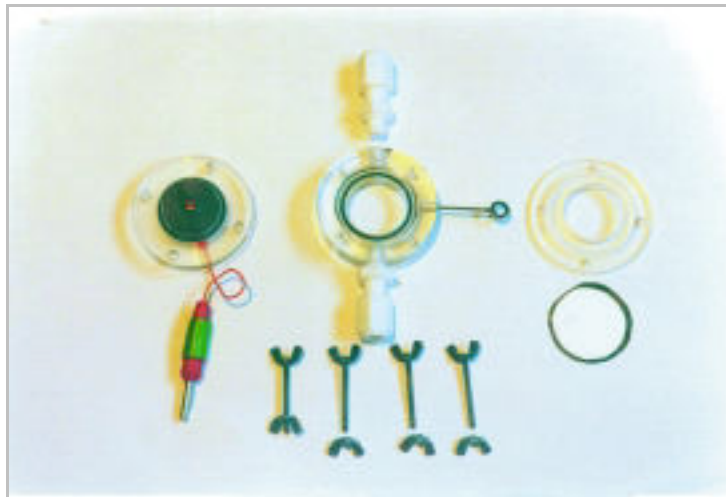


Abb. 4: Fotografische Aufnahme der Biobrennstoffzelle (Grummann, 1995)

Die Messungen mit der Biobrennstoffzelle erfolgen, während sie von der Fermentationsbrühe durchströmt wird.

2.1.3.2 Die biologische Komponente der Biobrennstoffzelle

Die biologische Komponente können entweder ganze, intakte Mikroorganismen oder isolierte Enzyme bzw. Enzymsysteme sein (Davis, 1983).

Von Sell (1991) wurden Versuche mit *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Anacystis nidulans*, *Vibrio natriegens*, *Bacillus alcalophilus*, *Wolinella succinogenes* und einer Mischkultur, bestehend aus 15 bis 20 verschiedenen Spezies durchgeführt. Sell zeigte, daß alle getesteten Mikroorganismen trotz ihrer verschiedenen Physiologie in der Lage sind, Redoxmediatoren wie z. B. 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon zu reduzieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein breites Spektrum an Mikroorganismen als biologische Komponente für die Biobrennstoffzelle zur Verfügung steht.

Die von Sell entwickelte Biobrennstoffzelle nutzte Daußmann (1997), um mit Enzymen bioelektrochemisch Energie zu gewinnen. Er untersuchte Fermentationen von *Methanosarcina barkeri* und fand aktive Hydrogenasen, die mit molekularem Wasserstoff als Substrat in der Lage waren, Methylviologen, einen künstlichen Elektronenüberträger, zu reduzieren.

2.1.3.3 Redoxmediatoren

Da der direkte Elektronenübergang vom biologischen System zur Elektrode nur in sehr geringem Umfang abläuft (Higgins, 1979), wird dem Medium zur Verbesserung des Elektronenüberganges in verschiedenen Versuchen ein Redoxmediator zugesetzt.

Die notwendigen Eigenschaften eines idealen Mediators beschreiben gleichzeitig seine Rolle beim Transport der Elektronen von der mikrobiellen Zelle zur Elektrodenoberfläche der Biobrennstoffzelle.

Der Mediator sollte (Stirling et al., 1983; Tanaka et al., 1983; Roller et al., 1984)

- in oxidierte Form in die Zelle und damit zum Elektronendonator gelangen
- schnell mit dem Elektronendonator reagieren
- danach in reduzierter Form die Zelle zügig verlassen
- die Elektronen an der Elektrodenoberfläche abgeben
- ein möglichst negatives Redoxpotential besitzen, damit eine hohe Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode gewährleistet ist
- langzeitstabil sein, d. h. er darf nicht durch das biologische System ab- oder umgebaut werden
- im Medium löslich
- aber nicht toxisch für die Organismen sein.

In der Literatur ist unter anderem der Einsatz von 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Nishikawa et al., 1982), Phenazinethosulfat (Turner et al., 1982; Ramsay et al., 1985), Thionin (Delaney et al., 1984; Thurston et al., 1985) und Mediatorcocktails (Patchett et al., 1988) beschrieben.

Von Sell (1991) und Birk (1991) wurden ebenfalls verschiedene potentielle Redoxmediatoren getestet. Sie zeigten, daß 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon (HNQ) weitgehend die Eigenschaften eines idealen Mediators besitzt und deshalb gut für einen Einsatz in der Biobrennstoffzelle geeignet ist.

HNQ gehört zu einer weit verbreiteten Naturstoffklasse von gelben Pflanzen- und Pilzfarbstoffen. Es wird aus der Pflanze *Lawsonia inermis* isoliert (Falbe und Regnitz, 1990) und wirkt in hohen Konzentrationen als Fungizid und Bakterizid. Diese Eigenschaft bleibt bei den in der Biobrennstoffzelle eingesetzten niedrigen Konzentrationen ohne meßbaren Einfluß.

HNQ hat bei einem pH-Wert von 7 ein negatives Standardpotential von -152 mV gegen Normalwasserstoff, d. h. von -364 mV gegen Silber/Silberchlorid (Rauen, 1964) und kann deshalb zur Verstärkung des Stromsignals der Biobrennstoffzelle eingesetzt werden (Kreysa und Krämer, 1989).

Die Abbildung zeigt die oxidierte und die reduzierte Form des HNQ-Moleküls (Abb. 5).

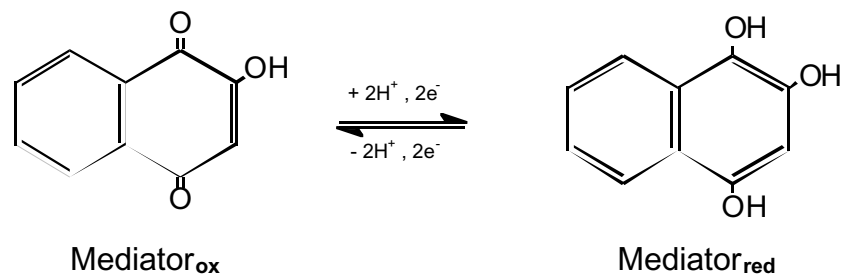


Abb. 5: Darstellung der oxidierten (HNQ, orange) und der reduzierten Form (HNQ.H₂, farblos) des 2-Hydroxy-1,4-Naphtochinons, ox = oxidiert, red = reduziert

Um die oxidierte und die reduzierte Form von HNQ in Lösungen nachzuweisen, kann ein Dreielektrodensystem verwendet werden. Es ist auf Grund seines einfachen apparativen Aufbaus sehr gut geeignet, die Reduktionsfähigkeit der Mikroorganismen zu zeigen. Der zeitliche Aufwand ist dabei gering.

Das Dreielektrodensystem besteht aus einer Arbeitselektrode (AE), einer Referenzelektrode (RE) und einer Gegenelektrode (GE), die an einen Potentiostaten angeschlossen sind (Abb. 6).

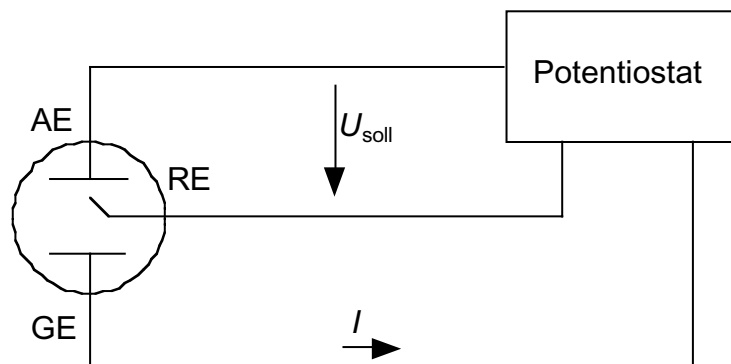


Abb. 6: Prinzip des Dreielektrodensystems

Mit Hilfe des Potentiostaten wird das Potential zwischen Referenz- und Arbeitselektrode auf einen vorgegebenen Sollwert eingestellt. Kommt es durch die Oxidation oder die Reduktion von elektroaktiven Substanzen an der Arbeitselektrode zu Abweichungen von dem Sollwert des Potentials der Arbeitselektrode, werden diese durch einen Strom zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode automatisch wieder auf den Sollwert korrigiert.

Dieser Stromfluß ist der jeweils im System vorhandenen Konzentration an elektroaktiven Substanzen proportional. Auf diese Weise erlaubt das Dreielektrodensystem, bei entsprechend ausgewählten Potentialen anhand der resultierenden Strom-Spannungs-Kennlinie darzustellen, ob elektroaktive Substanzen in einer Lösung vorhanden sind. Es kann z. B. die Konzentration

sowohl der oxidierten als auch der reduzierten Form des Mediators in einer Lösung bestimmt werden.

2.2 Vermehrung und Wachstum von Mikroorganismen

Unter Vermehrung und Wachstum der Mikroorganismen versteht man die irreversible Zunahme der lebenden Substanz, in der Regel der Zellzahl und/oder der Masse der Zellen. Im folgenden werden verschiedene Formen des Wachstums erläutert. Dabei wird stets vom Wachstum unter idealen Bedingungen ausgegangen, das heißt u. a.

- homogen durchmischter Fermenter
- konstante Wachstumsbedingungen
- keine Nährstofflimitierungen
- keine Hemmung des Wachstums durch entstehende Produkte.

2.2.1 Wachstum in einer diskontinuierlichen Kultur (Batch-Kultur)

Das Wachstum der Mikroorganismen lässt sich in vier Hauptphasen unterteilen (Crueger und Crueger, 1989):

- Anlauf (lag)-Phase
- exponentielle (log)-Phase
- stationäre Phase
- Absterbephase.

Diese Phasen sind in der folgenden Abbildung vereinfacht dargestellt (Abb. 7).

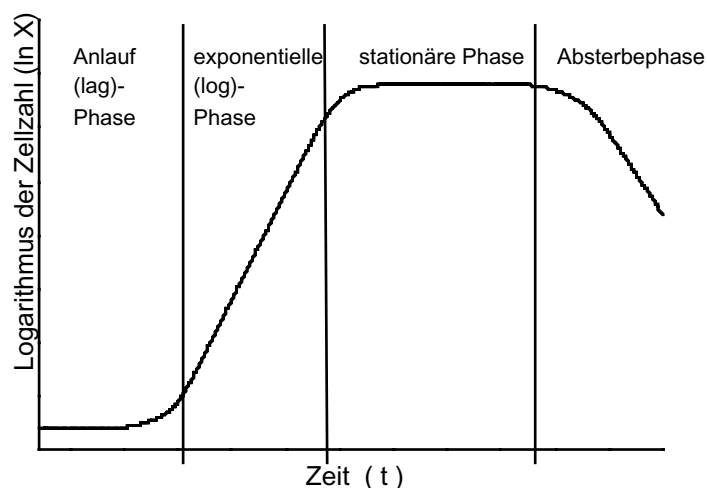


Abb. 7: Allgemeinste Form der Wachstumskurve einer diskontinuierlichen Kultur (Batch-Kultur)

Diese vier Hauptphasen sind folgendermaßen charakterisiert:

1. Anlauf (lag)-Phase:

Diese Phase beginnt mit dem Animpfen des Mediums. Die Zellen adaptieren sich an die neuen Umweltbedingungen im Medium. Diese Phase dauert bis zum Erreichen der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit.

2. exponentielle (log)-Phase:

In dieser Phase wächst die Kultur mit maximaler Wachstumsrate, die für die Organismen spezifisch und von den Milieubedingungen abhängig ist. Diese Phase ist durch eine konstante minimale Generationszeit der Mikroorganismen charakterisiert.

3. stationäre Phase:

Die stationäre Phase stellt sich ein, wenn die Zellen nicht mehr wachsen. Sie wird meist durch Substratmangel verursacht. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen neu gebildeten und absterbenden Zellen.

4. Absterbephase:

Die Konzentration der lebenden Zellen nimmt nach der stationären Phase wieder ab. Unter Umständen lösen sich die Zellen durch die Wirkung der zelleigenen Enzyme auf (Autolyse).

Das Wachstum einer diskontinuierlichen Kultur kann in allgemeinsten Form als Modell beschrieben werden. Dieses berücksichtigt nur die logarithmische und die stationäre Phase und trifft deshalb die wirklichen Verhältnisse nur in Näherung.

Für die Wachstumsgeschwindigkeit, die als die Änderung der Biomassekonzentration dX über der Zeit dt definiert ist, gilt in der exponentiellen Wachstumsphase die folgende Beziehung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3)$$

μ - spezifischen Wachstumsrate

X - Biomasse

Durch Integration dieser Gleichung 3 und mit der Anfangsbedingung

$$X = X_0 \quad \text{bei} \quad t = 0$$

erhält man:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{bzw.} \quad \ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t \quad (4)$$

Die Geschwindigkeit des Zellwachstums in der exponentiellen Phase ist konstant und gleich der spezifischen Wachstumsrate μ . Sie lässt sich entweder aus Gleichung 5 berechnen oder als Geradensteigung in Abb. 7 graphisch ermitteln, in der der Logarithmus der Zellzahl als Funktion der Zeit t aufgetragen ist.

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t_t - t_0} \quad (5)$$

Mikroorganismen bilden nicht nur Biomasse, sondern auch Produkte wie Proteine oder Stoffwechselmetabolite, die ausgeschieden werden. Durch die Berechnung von Ertragskoeffizienten (Substratertrags- und Produktionskoeffizient) lässt sich das Verhältnis zwischen der entstandenen Biomasse X bzw. der Produktmenge P und der eingesetzten Substratmenge S bei verschiedenen Kultivierungen gut vergleichen.

Substratertragskoeffizient:

$$Y_{X/S} = - \frac{dX}{dS} \quad \text{bzw.} \quad Y_{X/S} = - \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (6)$$

Produktionskoeffizient:

$$Y_{P/S} = - \frac{dP}{dS} \quad \text{bzw.} \quad Y_{P/S} = - \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (7)$$

Diese dimensionslosen phänomenologischen Ertragskoeffizienten sind in der Regel keine Konstanten, sondern Funktionen der Zeit und der Kultivierungsbedingungen. Dabei sind sie nicht nur vom Oxidationsgrad der Kohlenstoffquelle abhängig, sondern auch von der energetischen Nutzung des Substrates durch den Mikroorganismus. Im allgemeinen rechnet man bei Modellüberlegungen der aeroben Biomassebildung aus Kohlenhydraten mit $Y_{X/S} = 0,5$, da ca. 50 % des organischen Kohlenstoffs des Substrates in Form von Kohlendioxid veratmet und 50 % zur Biomassebildung verwendet werden (Gottschalk, 1988).

2.2.2 Wachstum in einer kontinuierlichen Kultur

Im Gegensatz zu einer diskontinuierlichen Kultur, wo sich die Kulturbedingungen ständig ändern, ist es bei einer kontinuierlichen Kultivierung möglich, die Zellen über lange Zeit bei gleicher Substratkonzentration und gleichen Milieubedingungen zu halten. Dazu wird dem Bioreaktor fortwährend sterile Nährlösung zugegeben und gleichzeitig die gleiche Menge umgesetzte Nährlösung mit Mikroorganismen entnommen. So gelingt es, die Mikroorganismen auch über längere Zeiträume exponentiell wachsen zu lassen.

Eine Möglichkeit der kontinuierlichen Kultivierung ist das Wachstum im Chemostaten. Hierbei wird dem Kulturgefäß sterile Nährlösung mit einer konstanten Zuflußrate zugeführt. In dem Maße, wie frisches Medium hinzutritt, tritt die Suspension mit Mikroorganismen in ein Erntegefäß aus. Die Durchfluß- oder Verdünnungsrate D gibt an, welcher Anteil des Gesamtvolumens je Stunde durchgesetzt wird. Für sie gilt, wenn das Arbeitsvolumen des Fermenters V und die pro Zeiteinheit zugeführte Nährlösungsmenge F ist:

$$D = \frac{F}{V} \quad (8)$$

Im Fermenter ergeben sich zwei gegenläufige Prozesse.

Die Geschwindigkeit, mit der die im Fermenter vorhandenen Mikroorganismen durch die Verdünnung ausgewaschen werden, beträgt, falls die Mikroorganismen nicht wachsen:

$$-\frac{dX}{dt} = D \cdot X \quad (9)$$

Für das exponentiell verlaufende Wachstum der Mikroorganismen im Kulturgefäß gilt (siehe Gleichung 3 der diskontinuierlichen Kultur):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (10)$$

Die Veränderung der Biomassekonzentration im Chemostaten ist dann durch ihre Zunahme infolge des Wachstums und durch den Verlust der Biomasse aufgrund des Durchflusses gegeben (Weide et al., 1987). Aus den Gleichungen 9 und 10 ergibt sich:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad (11)$$

Wenn $\mu \cdot X - D \cdot X = 0$ gilt, gleichen sich Bakterienwachstum und Auswaschverlust aus, und es wird ein Fließgleichgewicht (steady state) erreicht. In diesem Zustand sind alle Parameter konstant: die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, die Biomassekonzentration, die Konzentration aller Nährstoffkomponenten, die Partialdrücke von O_2 und CO_2 usw. Die Kultur im Chemostaten ist substratkontrolliert. Auf dieser Begrenzung der Wachstumsrate durch die Konzentration eines für das Wachstum notwendigen Substrates beruht die Stabilität des Systems. In der Regel wird die Kohlenstoffquelle, z. B. Glucose, als wachstumslimitierendes Substrat gewählt.

Wird in einer kontinuierlich betriebenen Anlage die Verdünnungsrate erhöht, dann muß der Organismus mit einer Verminderung der Verdopplungszeit reagieren, um erneut das Fließgleichgewicht mit $\mu = D$ zu erreichen. Die Wachstumsgeschwindigkeit kann aber nicht beliebig hoch werden, da der Mikroorganismus nicht schneller als mit der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} wachsen kann. Überschreitet die Verdünnungsrate jedoch μ_{max} , so wird mehr Biomasse aus dem Fermenter entfernt als nachwachsen kann. Es kommt zum Auswaschen der Mikroorganismen aus dem Fermenter (Einsele et al., 1985).

Die folgende Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Biomasse- und der Substratkonzentration von der Verdünnungsrate D (Abb. 8). D_c ist die kritische Verdünnungsrate, bei der der Auswaschpunkt erreicht ist, d. h., die das Fermentationsgefäß verlassende Suspension enthält keine Bakterien mehr. D_{opt} ist die Verdünnungsrate mit dem maximalen Biomasseertrag in der Suspension (Dellweg, 1987).

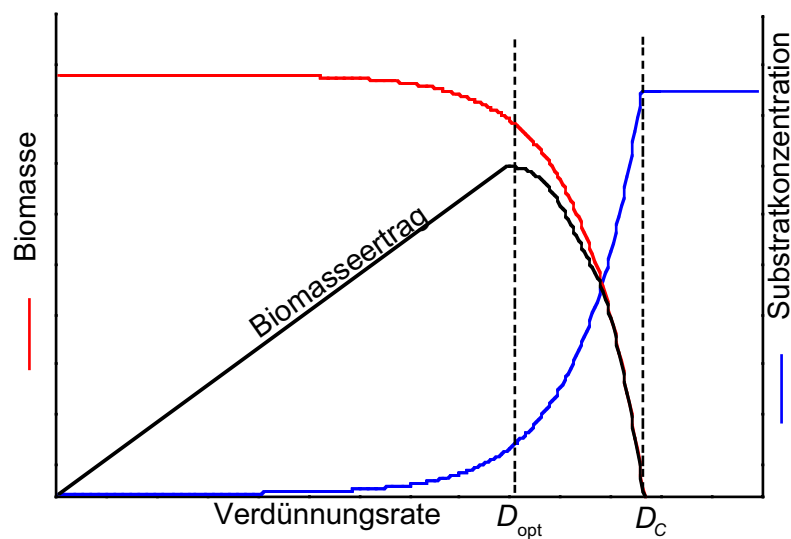


Abb. 8: Beziehungen zwischen Biomasse und Substratkonzentration im Fließgleichgewicht bei steigenden Verdünnungsraten D in einer kontinuierlichen Kultur (Chemostat)

Ein spezieller Fall des kontinuierlichen Wachstums ist das oszillierende Wachstum der Mikroorganismen. In konventionellen Batch- und kontinuierlichen Hefekultivierungssystemen befinden sich in Abhängigkeit von ihrer Position im Zellzyklus alle Zellen in verschiedenen Teilungsphasen. In einer Synchronkultur befinden sich dagegen alle Zellen annähernd im gleichen Stadium des Zellzyklus. Sie ist deshalb eine gute Möglichkeit, den mikrobiellen Stoffwechsel und im besonderen den Zellzyklus zu untersuchen (Walker, 1998).

Die durch den synchronen Zellzyklus ausgelösten Oszillationen können über viele Generationen erfolgen. Ihre Initialisierung kann auf den verschiedensten Wegen, z. B. Veränderung der Verdünnungsrate, Glucosemangel usw., verursacht werden. Ihr Abklingen wird ebenfalls mit Störungen des Systems in Zusammenhang gebracht (v. Meyenburg, 1973; Parulekar et al., 1986).

Bei den Oszillationen variieren verschiedene Parameter des Stoffwechsels zyklisch wie z. B. Gelöstsauerstoffkonzentration, Sauerstoffverbrauchsrate, Kohlendioxidproduktionsrate, Ethanolkonzentration, Glucosekonzentration, intrazelluläre Variable wie NADH-, DNA-Gehalt und auch die Biomassekonzentration (Duboc et al., 1996).

2.2.3 Bilanzierung von biologischen Prozessen

Für die Bilanzierung eines Bioprozesses sind insbesondere die Sauerstoffeintragsrate OTR , die Kohlendioxidproduktionsrate CPR und der Respirationskoeffizient RQ von Bedeutung.

Die Sauerstoffaufnahme (OTR) wird folgendermaßen errechnet:

$$OTR=Q_{O_2}=\frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{O_2}^E - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} x_{O_2}^A \right\} \quad (12)$$

Q_{O_2} - auf das Flüssigphasenvolumen bezogene Transferrate des Sauerstoffs [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

f_E - Volumenstrom des eintretenden Gases [$\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$]

V_M - Molvolumen des idealen Gases 22,41 l/mol

V_R - Arbeitsvolumen [l]

$x_{O_2}^E$ - Molenbruch des Sauerstoffs im Gaseintritt

$x_{O_2}^A$ - Molenbruch des Sauerstoffs im Gasaustritt

$x_{CO_2}^E$ - Molenbruch des Kohlendioxids im Gaseintritt

$x_{CO_2}^A$ - Molenbruch des Kohlendioxids im Gasaustritt

Die Kohlendioxidproduktionsrate (*CPR*) errechnet sich wie folgt:

$$CPR=Q_{CO_2}=\frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{CO_2}^A \cdot \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} - x_{CO_2}^E \right\} \quad (13)$$

Q_{CO_2} - auf das Flüssigphasenvolumen bezogene Transferrate des Kohlendioxids [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

Das Verhältnis von entstandenem Kohlendioxid und verbrauchtem Sauerstoff bezeichnet man als den Respirationskoeffizienten *RQ*.

$$RQ=\frac{CPR}{OTR}=\frac{Q_{CO_2}}{Q_{O_2}} \quad (14)$$

Vom Respirationskoeffizienten kann näherungsweise auf die Art der Substratverwertung geschlossen werden.

Gemäß der Atmungsgleichung ist bei Hefekultivierungen $RQ \leq 1$, wenn Biomasse und Kohlendioxid entstehen. Wird zusätzlich Ethanol gebildet, ist $RQ > 1$ (Beuse, 1998).

Da sich in der Anfangsphase der Kultivierung kleine Werte für *OTR* und *CPR* ergeben, ist das Ergebnis dort möglicherweise mit großen Fehlern behaftet und damit in diesem Bereich unsicher. Mit steigenden Werten von *OTR* und *CPR* erhöht sich die Genauigkeit der Berechnung des Respirationskoeffizienten.

Die einzelnen Reaktions- und Produktionsraten sind im allgemeinen unbekannte Funktionen der Konzentration von Enzymen, Metaboliten und zellexternen Substraten. Teilweise repräsentieren sie ganze Reaktionsketten, die zu einem komplexen koordinierten Gesamtstoffwechsel gehören.

Die in der Arbeit entwickelte Biobrennstoffzelle gibt mit ihrem Meßsignal Auskunft über die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen, wobei die detaillierten Quellen für den Stromfluß im mikrobiellen Stoffwechsel noch nicht vollständig geklärt sind. Das Signal wird in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Parametern des mikrobiellen Stoffwechsels, z. B. mit dem Respirationsquotienten verglichen, um die Aussagefähigkeit des Signals zu überprüfen.

3 Material und Methoden

Die eingesetzten Mikroorganismen, ihre Anzucht, die Stammhaltung, das Herstellen von Vorkulturen, der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung sind in den folgenden Kapiteln dargestellt (s. Kap. 3.1, 3.2).

Die Meßmethoden, die Kulturmedien, die Chemikalien, die Elektrodenmaterialien und die Geräte sind im Anhang (s. Kap. 7.1, 7.2, 7.6, 7.7, 7.8) aufgeführt.

3.1 Mikroorganismen - Anzucht, Stammhaltung und Herstellen einer Vorkultur

3.1.1 *Escherichia coli*

Das Bakterium *E. coli* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Es ist ein gram-negatives und fakultativ anaerobes Stäbchen. Verwendet wurde der Stamm *E. coli* K12 „wildtype“ (DSM 498). Er stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.

Zur Stammhaltung der Kulturen wurden feste Nährböden aus Vollmedium (s. Kap. 7.2) mit 15 g/l Agar-Agar verwendet. Nach dem Überimpfen mit einer sterilen Impföse auf eine frische Kulturplatte wurde diese für ca. 18 h bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie von *E. coli* von einer Vollmediumplatte mit einer sterilen Impföse in einen Erlenmeyerkolben (V = 250 ml) in 50 ml flüssiges Medium (s. Kap. 7.2.1.1 oder 7.2.1.2) überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem temperierbaren Rundschüttler (Typ Certomat H+R, B. Braun AG, Melsungen) bei 37°C mit 200 U/min.

Für die Fermentationen im 40-l-Fermenter (LP 351, Bioengineering AG, CH-Wald) wurde die 50-ml-Kultur zum Animpfen eines 2,5-l-Erlenmeyerkolbens mit 1 l flüssigem Medium (s. Kap. 7.2.1.1 oder 7.2.1.2) verwendet. Nach seiner Inkubation wurde dieser genutzt, um den 40-l-Fermenter (25 l Arbeitsvolumen) anzuimpfen.

3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Der Hefepilz *S. cerevisiae* ist ein Eukaryont und gehört zu den Protoascomyceten. Er vermehrt sich überwiegend asexuell durch Sprossung. Der Stamm DSM 1334, der für die meisten Untersuchungen verwendet wurde, stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.

S. cerevisiae H 620 stammt vom Institut für Technische Chemie der Universität Hannover.

Außerdem wurden die Trockenreinzuchthefen Siha-Aktiv Hefe 3 Stamm WET 136 (Firma Begerow, Langenlonsheim), Uvaferm CEG Stamm CH 158 (Danstar Ferment AG, CH-6200 Zug) und Lalvin EC 1118 (Firma Lallemand, Vertrieb Danstar Ferment AG, CH-6200 Zug) eingesetzt. Sie wurden von der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie, zur Verfügung gestellt.

5 g Trockenhefe entsprechen $1,5 \cdot 10^{11}$ lebenden Hefezellen. Es wurde mit 0,3 g Trockenhefe pro 1 l angeimpft. Diese Inokulation entspricht theoretisch einer Konzentration von $9 \cdot 10^6$ lebende Zellen pro Milliliter. Praktisch resultieren in der Kultur daraus $3-4 \cdot 10^6$ lebende Zellen pro Milliliter, da nicht alle Zellen das Quellen überleben (Herstellerangaben).

Die Stammhaltung von *S. cerevisiae* DSM 1334 erfolgte analog der von *E. coli* (s. Kap. 3.1.1). Die Inkubation wurde bei 25°C vorgenommen. Als Medium fand das Universalmedium (s. Kap. 7.2.2) Anwendung.

Die Vorkulturen wurden analog zu denen von *E. coli* (s. Kap. 3.1.1) bei einer Temperatur von 25°C in Mineralmedium (s. Kap. 7.2.2.3) hergestellt.

Die Stammhaltung von *S. cerevisiae* H 620 erfolgte bei 4°C auf festem Nährboden (s. Kap. 7.2.2.2) im Schrägagarröhrchen. Nach dem Überimpfen mit einer sterilen Impföse auf eine frische Kulturplatte wurde diese für 2 Tage bei 30°C inkubiert und dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden Kolonien von *S. cerevisiae* H 620 von einem Schrägagarröhrchen mit einer sterilen Impföse in einen Schüttelkolben ($V = 300$ ml) in 50 ml flüssiges Medium (s. Kap. 7.2) überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht (12-16 h) auf einem temperierbaren Rundschüttler (Typ Certomat H+R, B. Braun AG, Melsungen) bei 30°C mit 150 U/min. Mit diesen 50 ml wurde dann der 2-l-Fermenter (Biostat M, B. Braun AG, Melsungen) angeimpft.

Die Reinzuchthefen wurden in den Versuchen zur Vergärung von Säften direkt, ohne zusätzliches Herstellen einer Vorkultur, eingesetzt. Sie liegen als Trockenhefen in einer inaktiven, granulierten Form vor. Beim Trocknungsprozeß wurde den Hefen Wasser entzogen. Zum Erreichen ihrer vollen Aktivität mußten die Hefen das entzogene Wasser wieder aufnehmen. Dazu wurde 0,075 g Trockenhefe abgewogen und mit 5 ml Wasser (ca. 37°C) vermischt. Um zu verhindern, daß die Hefezellen Zytoplasma verlieren, wurde während des Quellens gelegentlich leicht geschüttelt, bis die Hefe vollständig suspendiert war. Das Quellen wurde mit Wasser durchgeführt, und das Animpfen des Saftes erfolgte frühestens 15 min nach Zugabe des Wassers bis spätestens 30 min danach.

3.1.3 *Penicillium chrysogenum*

Der Pilz *P. chrysogenum* ist ein Penicillinproduzent. Der verwendete Stamm DSM 1075 stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.

Die Stammhaltung von *P. chrysogenum* erfolgte analog *E. coli* und *S. cerevisiae* (s. Kap. 3.1.1, 3.1.2). Die Inkubation erfolgte bei 25°C. Als Medium fand Malzextraktmedium (s. Kap. 7.2.3.1) Anwendung.

Die Vorkulturen (vgl. Kap. 3.1.1) wurden in Malzextraktmedium bei einer Temperatur von 25°C über 62 h angezogen.

3.1.4 Tierische Zellen

Baby Hamster Kidney-Zellen

Die verwendeten Zellen waren BHK-Zellen B4/B1 (Baby Hamster Kidney). Sie produzieren den Blutgerinnungsfaktor VII. Alle Versuche erfolgten in DMEM/Ham's F12-Medium (Life Technologies, 1996-97) bei 37°C.

Chinese Hamster Ovary-Zellen

Die eingesetzten Zellen waren CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary). Sie produzieren t-PA (tissue-plasminogen activator).

Zur Kultivierung wurde das Nährmedium BioPro 1 der Firma BioWittaker (B-Verviers) eingesetzt. Seine Zusammensetzung ist nicht bekannt.

3.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

3.2.1 Potentiostatisch geregeltes Dreielektrodensystem

Das Dreielektrodensystem (Abb. 6) wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob der für die Versuche in der Biobrennstoffzelle ausgewählte Mediator für die verwendeten Mikroorganismen reduzierbar ist.

In der Arbeit wurde eine Einstabmeßkette, bestehend aus einer Referenzelektrode aus Silber/Silberchlorid (Ag/AgCl) und einer Arbeitselektrode aus Platin (EMC 30 L/SO, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg) eingesetzt. Die verwendete Gegenelektrode war eine Platinblechelektrode (6.0305.100, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt).

Es wurde ein Potentiostat (PS 6, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg) benutzt, dessen Steuerung und Meßwerterfassung (PS-Remote 2.2., Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg) mit einem Computer erfolgte.

Die Messungen wurden im 250-ml-Fermentationsgefäß (s. Kap. 7.8) bei 37°C in 200 ml Phosphatpuffer (s. Kap. 7.4) durchgeführt, da so der Einfluß von Medienbestandteilen eliminiert werden konnte.

Die Lösung enthielt eine Glucosekonzentration von 25 mM.

Es wurden Versuche mit und ohne Mediator durchgeführt. Der Mediator wurde in einer Konzentration von 1 mM eingewogen (s. Kap. 7.3).

Die Lösung wurde vor der Zugabe der Mikroorganismen zuerst 15 min mit synthetischer Luft begast, um eine vollständige Oxidation des Mediators zu gewährleisten. Anschließend wurde durch ein 15 minütiges Begasen mit Stickstoff der Sauerstoff wieder weitestgehend entfernt. Während des Versuchs wurde weiter mit Stickstoff gespült, um das Eindringen von Luftsauerstoff zu verhindern.

Als Mikroorganismen wurden *E. coli*, *S. cerevisiae* und *P. chrysogenum* verwendet. 250-ml-Vorkulturen der Mikroorganismen wurden 10 min mit 4000 g zentrifugiert, mit 10 ml Phosphatpuffer gewaschen und danach erneut zentrifugiert (Centrikon H401, Kontron Instruments, Gosheim). Die entstehenden Pellets wurden in 10 ml des Phosphatpuffers (s. Kap. 7.4) suspendiert und dann dem sauerstofffreien Phosphatpuffer zugegeben.

Wichtig ist eine gleichmäßige Rührgeschwindigkeit von 200 U/min, da sich der Strömungszustand im Fermenter auf das Meßsignal auswirkt.

Mit dem Dreielektrodensystem wurde bei Versuchsbeginn und am Versuchsende eine Strom-Spannungs-Kennlinie erfaßt. Dazu wurde das Potential in einem Bereich von -650 bis 1200 mV gegenüber Ag/AgCl variiert.

Während die oxidierte Form des HNQ orange erscheint, ist die reduzierte Form farblos. Als Kriterium für das Versuchsende wurde der Zeitpunkt der vollständigen Entfärbung der Fermentationslösung gewählt. Um zu zeigen, daß die Reduktion des Mediators durch die Mikroorganismen reversibel erfolgte, wurde nach Versuchsende Sauerstoff in das Reaktionsgefäß eingeleitet und überprüft, ob es zu einem erneuten Farbumschlag von farblos zu orange kommt.

3.2.2 Die Biobrennstoffzelle

Die im Rahmen der Arbeit entwickelte Biobrennstoffzelle besteht aus einem dreiteiligen Plexiglasgehäuse (Polymethylmethacrylat), das durch acht Schrauben mit Flügelmuttern zusammengehalten wird. Sie hat ein Fassungsvermögen von 5 ml. Zwischen den drei Gehäuseteilen wurde mit Dichtungsringen abgedichtet. Um sie in den Medienstrom einbauen zu können, hat sie an den Kopfenden jeweils einen Schlauchverbinder. Als Anode wurde ein Platinblech und als Kathode eine Sauerstoffdiffusionselektrode verwendet (s. Kap. 7.7).

In den äußeren Stromkreis war ein Widerstand integriert, für den bei allen Versuchen $R = 1 \text{ k}\Omega$ gewählt wurde. Die an diesem Widerstand abfallende Spannung wurde während des gesamten Versuchsverlaufes über ein an einen Computer (Pentium® 100 MHz / 32 MB, M. Bliefert nicht EDV-Systeme, Mainz) gekoppeltes Digitalmultimeter (Keithley 2000, Keithley, Germering) online registriert.

Die technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle findet sich in Kapitel 7.9 des Anhangs.

3.2.3 Kultivierungen mit Fermentationskontrolle

3.2.3.1 Kultivierungen mit diskontinuierlicher Fermentationskontrolle

Unter ökonomischen Gesichtspunkten ist es wichtig, daß zu viele Reinigungsschritte in der Produktaufarbeitung vermieden werden. Deshalb sollten der Fermentationslösung außer den Medienbestandteilen keine zusätzlichen Substanzen, wie z. B. Mediatoren, zugegeben werden müssen.

Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der Arbeit ein Verfahren entwickelt, bei dem der Mediator der Probe erst nach der Probenahme aus dem Fermenter zudosiert wird. Anschließend wird die Probe in die Biobrennstoffzelle eingespeist, gemessen und danach verworfen. Dieses Verfahren wird als diskontinuierliche Fermentationskontrolle bezeichnet und gestattet es, mediatorfreie Fermentationen durchzuführen.

40-l-Fermenter

| | |
|-------------------|--|
| Organismus: | <i>E. coli</i> K12 |
| Reaktor: | 40-l-Fermenter (LP 351, Bioengineering AG, CH-Wald), 25 l Arbeitsvolumen, Steuerung und Regelung über Fermentationskontrollprogramm FAS 3.08 der Firma Münzer und Diehl Electronic GmbH, Kriegsfeld |
| Temperatur: | 37°C |
| Rührerdrehzahl: | 500 U/min |
| Begasung: | 25 l/min (Druckluft) |
| pH: | 7,5 (Regulierung mit 5 M NaOH und 5 M H ₃ PO ₄) |
| Medium: | Vollmedium (s. Kap. 7.2.1.1) |
| Antischaummittel: | CONTRASPUM 300 (eingesetzte Konzentration 1:1000), Chemische Fabriken, Lahnstein |
| Messung: | online: - Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2) |

- Trübung (s. Kap. 7.1.10)
- Kohlendioxidkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)
- Sauerstoffkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)
- Sauerstoffkonzentration im Medium (s. Kap. 7.1.9)

Die folgende Abbildung zeigt den Versuchsaufbau mit dem 40-l-Fermenter mit zur diskontinuierlichen Messung integrierter Biobrennstoffzelle (Abb. 9).

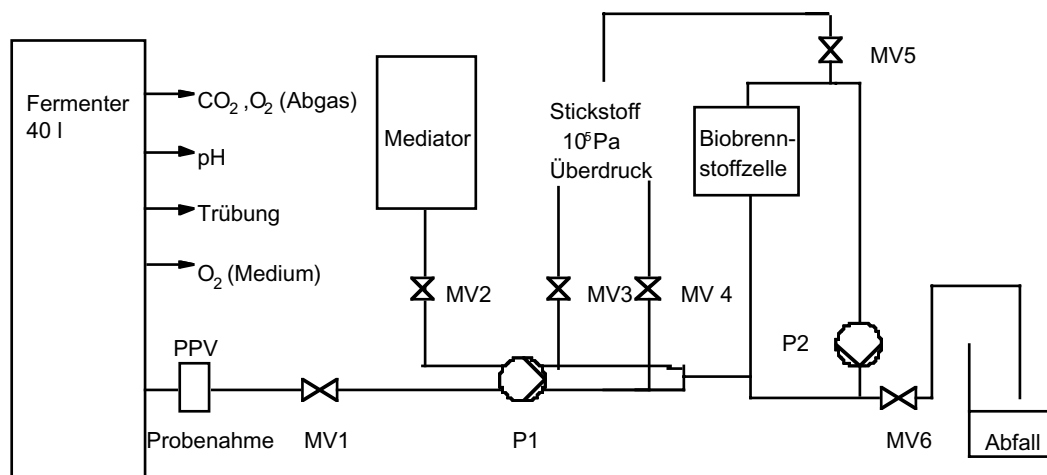


Abb. 9: Schematischer Versuchsaufbau der Anlage zur diskontinuierlichen Fermentationskontrolle mit 40-l-Fermenter (MV-Magnetventil, PPV-pneumatisches Probenahmeventil, P-Pumpe)

Vor Versuchsbeginn wurde der mit Medium befüllte Fermenter für 20 min bei 121°C sterilisiert. Anschließend wurde unsteril das Antischaummittel zugegeben und der Versuch durch Zugabe der Vorkultur gestartet.

Ein Computer (Pentium® 100 MHz / 32 MB, M. Blifernicht EDV-Systeme, Mainz) erfaßte das Stromsignal der Biobrennstoffzelle und steuerte die zur Biobrennstoffzelle und zur Probenahme gehörenden Ventile und Pumpen. Dazu wurde im Rahmen der Arbeit ein Programm unter der Programmieroberfläche Test Point der Firma Keithley, Germering, erarbeitet.

Im 15-min-Abstand wurde dem Fermenter mit einer Geschwindigkeit von 40 ml/min ca. 10 ml Probe über ein pneumatisches Probenahmeventil entnommen. Dazu wurde eine Peristaltikpumpe (Masterflex 7523-35, Cole-Pamer, USA-Illinois) mit zwei Pumpenköpfen verwendet. Der zweite Kopf pumpte die Mediatorlösung (s. Kap. 7.3). Der Strom der Fermentationslösung und der Mediatorlösung wurden über ein Y-Schlauchstück vereinigt, dadurch gemischt und dann in die Biobrennstoffzelle gepumpt. Eine zweite fabrikationsgleiche Pumpe führte anschließend das Gemisch mit 70 ml/min im Kreislauf durch die Biobrennstoffzelle. Während dieser Zeit wurde das Stromsignal der Biobrennstoffzelle erfaßt. Nach Ablauf der 15 minütigen Meßzeit wechselten die

Pumpen ihre Pumprichtung und entleerten das System. Mit Stickstoff wurde das System gespült, und danach startete ein neuer Zyklus. Diese Meßzeit hat sich bei mehreren Probeläufen bewährt, da es hier bereits zu deutlich ausgeprägten reproduzierbaren Signalen kam.

3.2.3.2 Kultivierungen mit kontinuierlicher Fermentationskontrolle

250-ml-Fermentationsgefäß

Dieser Maßstab wurde gewählt, um für die ersten Versuche eine leicht handhabbare Größenordnung zu schaffen. In einen am Fermenter angeschlossenen Kreislauf ist die Biobrennstoffzelle integriert, und es wird kontinuierlich gemessen. Bei den Versuchen, bei denen kein Mediator verwendet wird oder der Mediator von Versuchsbeginn an Bestandteil der Fermentationslösung ist, kann dem Fermentationsgefäß direkt kontinuierlich Medium entnommen und damit die Biobrennstoffzelle gespeist werden.

| | |
|-----------------|--|
| Organismen: | in Abhängigkeit vom Versuch <i>E. coli</i> K12 <i>S. cerevisiae</i> DSM 1334 <i>P. chrysogenum</i> DSM 1075 Mischkultur aus einem Klärschlamm |
| Reaktor: | 250-ml-Fermentationsgefäß (Firma Fischer, Frankfurt am Main und s. Kap. 7.8), 250 ml Arbeitsvolumen |
| Temperaturen: | 37°C bei <i>E. coli</i> bzw. 25°C bei <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. chrysogenum</i> und Klärschlamm (Wasserbad) |
| Rührerdrehzahl: | 200 U/min (Magnetrührkern), außer <i>S. cerevisiae</i> in Kapitel 4.5.5 ohne Rührung |
| Begasung: | aerobe Versuche: 2 l/h (Druckluft), außer <i>S. cerevisiae</i> in Kapitel 4.5.5 ohne Begasung und Klärschlamm: 8 l/h (Druckluft) |
| pH: | keine Regulierung |
| Medien: | Vollmedium und Mineralmedium bei <i>E. coli</i> (s. Kap. 7.2.1.1 und 7.2.1.2), Voll-, Mineralmedium und Saft bei <i>S. cerevisiae</i> (s. Kap. 7.2.2.2, 7.2.2.3 und 7.2.2.4) und Malzextraktmedium <i>P. chrysogenum</i> (s. Kap. 7.2.3.1) |
| Messung: | online: <ul style="list-style-type: none">- Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2)- optische Dichte bei 600 nm (Spektralphotometer Spectronic 1201, mit Steuer- und Auswertprogramm |

- Q-Quant, Milton Roy Instruments, Obertshausen und Durchflußküvette, 178.010-QS, Helma GmbH & Co., Müllheim)
- Redoxpotential im Medium (Einstabmeßkette Ag/AgCl/Platin, EMC 30 L/SO; Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg und s. Kap. 7.1.11)
 - pH-Wert (pH-Elektrode U455, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt und pH-Meter pH522, WTW, Weilheim)
 - Sauerstoffkonzentration im Medium (Sauerstoffelektrode Trioxmatic EO 200, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt und Sauerstoffmeßgerät OXI 530, WTW, Weilheim)

Das 250-ml-Fermentationsgefäß wurde vor Versuchsbeginn für 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Desinfektion der Biobrennstoffzelle, der Schläuche und der Durchflußküvette wurde durch Spülen mit einer 70%igen alkoholischen Lösung durchgeführt. Bei einer Pumpgeschwindigkeit der beiden Peristaltikpumpen (Masterflex 7523-35, Cole-Parmer, USA-Illinois) von 70 ml/min wurde die Lösung 20 min durch Spektralphotometer und Zelle gepumpt. Nach Ablauf dieser Zeit ersetzte man die alkoholische Lösung durch steriles Wasser und pumpte ebenfalls 20 min um.

Vor dem Befüllen des Kultivierungsgefäßes wurde der Pumpenkreislauf gestartet. Mit einer Pumpgeschwindigkeit von 70 ml/min wurde der Kreislauf des Spektralphotometers und mit 30 ml/min der der Biobrennstoffzelle umgepumpt.

Danach wurde 250 ml steriles Medium bzw. Klärschlamm zugesetzt. In den Versuchen mit Mediator wurde dieser auf der Analysenwaage eingewogen und direkt unsteril in das Fermentationsgefäß überführt (s. Kap. 7.3).

Mit Ausnahme der Versuche mit Reinzuchthefen (s. Kap. 3.1.2) und mit Klärschlamm wurden aus der jeweiligen Vorkultur 5 ml als Inokulum in das Fermentationsgefäß überführt. Nach der Zugabe der Animpfbiomasse wurde am Spektralphotometer ein Nullpunktgleich durchgeführt und der Computer zur Meßwerterfassung gestartet.

Anschließend wurde mit dem Spektralphotometer über die gesamte Dauer des Versuchs die optische Dichte bei 600 nm registriert. In allen Versuchen wurde das Stromsignal der Biobrennstoffzelle erfaßt.

Die verwendeten Schläuche bestanden aus Tygon (Cole Parmer International, USA-Illinois), einem glasklaren PVC-Elastomer. Dieses Schlauchmaterial ermöglicht, Verstopfungen und auch Verunreinigungen der Schläuche sofort zu erkennen. Dies ist vor allem für die Versuche mit mycelbildenden Mikroorganismen

besonders wichtig. Auf Grund der mechanischen Belastung der Tygonschläuche durch die Schlauchpumpen und die mit fortschreitender Versuchsdauer zunehmende Verunreinigung (z. B. Bewuchs durch die Mikroorganismen, Eindiffundieren des Mediators) wurden die Schläuche im Drei-Wochen-Rhythmus ausgewechselt.

Die Kultivierung der Hefezellen (s. Kap. 3.1.2, 7.2.2.5) und der tierischen Zellen (s. Kap. 3.1.4, 4.2.1.5) wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie der Universität Hannover durchgeführt. In dieser Arbeit werden nur das Grundschemata der Versuche und ihre Besonderheiten dargestellt:

2-l-Fermenter

| | |
|-------------------|---|
| Organismus: | <i>S. cerevisiae</i> H 620 |
| Reaktor: | 2-l-Biostat M (B. Braun AG, Melsungen), 1,5 l Arbeitsvolumen |
| Temperatur: | 30°C |
| Rührerdrehzahl: | 700 U/min |
| Begasung: | diskontinuierliche Kultivierung: 1 l/min (Druckluft) kontinuierliche Kultivierung: 1,5 l/min (Druckluft) |
| pH: | 4,0 (Regulierung mit 2,5 M NaOH und 1,1 M HCl) |
| Medium: | Schatzmann-Medium (s. Kap. 7.2.2.5) |
| Antischaummittel: | Wacker-Silikon (eingesetzte Konzentration 1:1000), Wacker Chemie GmbH, München |
| Messung: | online: <ul style="list-style-type: none">- Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2)- optische Dichte bei 590 nm (s. Kap. 7.1.4)- Kohlendioxidkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)- Sauerstoffkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)- Sauerstoffkonzentration im Medium (s. Kap. 7.1.9)- Fluoreszenzmessung (s. Kap. 7.1.13) offline: <ul style="list-style-type: none">- Glucosekonzentration (s. Kap. 7.1.1)- Ethanolkonzentration (s. Kap. 7.1.3)- Biotrockenmasse (s. Kap. 7.1.4)- optische Dichte bei 590 nm (s. Kap. 7.1.4) |

Die folgende Abbildung zeigt den Versuchsaufbau zur Fermentationskontrolle mit 2-l-Fermenter und der zur kontinuierlichen Messung integrierten Biobrennstoffzelle. Mit der Durchflußküvette wurde in einem Spektralphotometer online die optische Dichte bei 590 nm ermittelt (Abb. 10).

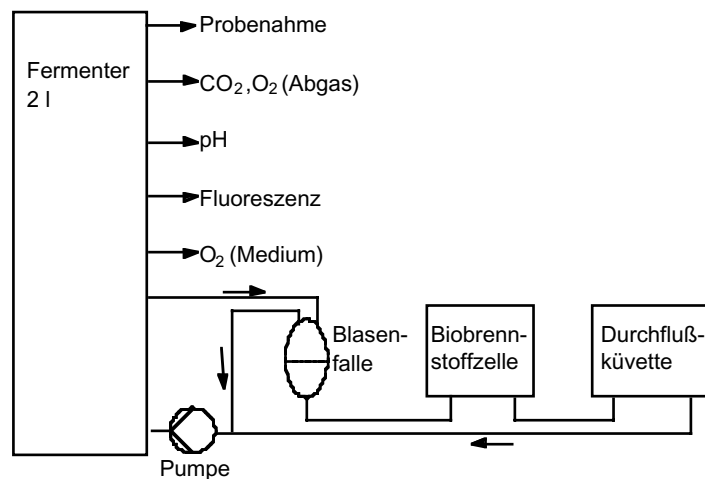


Abb. 10: Schematischer Versuchsaufbau der Anlage zur kontinuierlichen Fermentationskontrolle mit 2-l-Fermenter

Zusätzliche Informationen über die Versuchsdurchführung und die angewendeten Meßmethoden sind bei Marose (1999) nachzulesen.

6,6-l-Fermenter

| | |
|-----------------|---|
| Organismus: | Chinesische Hamster Ovary-Zellen |
| Reaktor: | 6,6-l-Biostat B (B. Braun AG, Melsungen), 5 l Arbeitsvolumen |
| Temperatur: | 37°C (Wassermantelheizung bzw. -kühlung) |
| Rührerdrehzahl: | 100 U/min (Paddelrührsystem, sehr scherstreßarm) |
| Begasung: | 10% Sauerstoffsättigung über einen gasdurchlässigen, auf einen Korb gewickelten Silikonschlauch durch Zufuhr von Stickstoff oder Druckluft |
| pH: | 7,2 (Regulierung mit 1 N NaOH und 1 N HCl) |
| Medium: | BioPro 1 (BioWittaker, B-Verviers) |
| Messung: | online: <ul style="list-style-type: none"> - Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2) - Sauerstoffkonzentration im Medium (basiert auf CLARK-Prinzip; Ag-Anode / Pt-Kathode, Broadley James, USA-Santa Ana) - pH-Wert (Gel-pH-Elektrode Pa/12; Dr. W. Ingold KG, Frankfurt) - Temperatur (Pt 100, B. Braun AG, Melsungen) offline: <ul style="list-style-type: none"> - Glucosekonzentration (s. Kap. 7.1.1) |

- Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl (s. Kap. 7.1.7)

Während der Kultivierung wurden täglich 5 ml Probe entnommen, um Auskunft über die Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl sowie die Glucosekonzentration zu erhalten.

In den Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß kontinuierliches Pumpen die Zellen zerstört, da diese sehr anfällig gegenüber mechanischen Belastungen sind. Deshalb wurde auf eine kontinuierliche Probenahme verzichtet. In einem Intervall von 55 min erfolgte jeweils 5 min lang ein Umpumpen der Fermentationsbrühe durch die Biobrennstoffzelle mit einer Peristaltikpumpe (FE 411, B. Braun AG, Melsungen), bei dem gleichzeitig gemessen wurde. Die Steuerung erfolgte über ein digitales Multifunktions-Zeitrelais (RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf). Weitere Informationen über die angewendeten Meßmethoden sind bei Lübben (1997) nachzulesen.

40-l-Fermenter

| | |
|-------------------|---|
| Organismen: | in Abhängigkeit vom Versuch <i>E. coli</i> K12 bzw. <i>S. cerevisiae</i> Siha-Aktiv Hefe 3 Stamm WET 136 |
| Reaktor: | 40-l-Fermenter (LP 351, Bioengineering AG, CH-Wald), 25 l Arbeitsvolumen, Steuerung und Regelung über Fermentationskontrollprogramm FAS 3.08 der Firma Münzer und Diehl Electronic GmbH, Kriegsfeld |
| Temperaturen: | 37°C bei <i>E. coli</i> bzw. 25°C bei <i>S. cerevisiae</i> |
| Rührerdrehzahl: | 500 U/min bei <i>E. coli</i> bzw. 100 U/min bei <i>S. cerevisiae</i> |
| Begasung: | aerobe Versuche: 25 l/min (Druckluft) anaerobe Versuche: 5 l/min (Stickstoff) |
| pH: | 7,5 bei <i>E. coli</i> (Regulierung mit 5 M NaOH und 5 M H ₃ PO ₄), keine Regulierung bei <i>S. cerevisiae</i> |
| Medium: | Vollmedium (s. Kap. 7.2.1.1) bei <i>E. coli</i> bzw. klarer Apfelsaft (s. Kap. 7.2.2.4) bei <i>S. cerevisiae</i> |
| Antischaummittel: | CONTRASPUM 300 (eingesetzte Konzentration 1:1000), Chemische Fabriken, Lahnstein |
| Messung: | online: <ul style="list-style-type: none"> - Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2) - Trübung (s. Kap. 7.1.10) - Kohlendioxidkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8) - Sauerstoffkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8) - Sauerstoffkonzentration im Medium (s. Kap. 7.1.9) - pH-Wert (s. Kap. 7.1.12) |

Vor Versuchsbeginn wurde der mit Medium befüllte Fermenter für 20 min bei 121°C sterilisiert. Anschließend wurde unsteril das Antischaummittel zugegeben. Dem Fermenter wurde während der gesamten Versuchsdauer mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Masterflex 7523-35, Cole-Palmer, USA-Illinois) kontinuierlich Fermentationslösung entnommen. Diese wurde mit 80 ml/min zuerst durch eine Blasenfalle, dann durch die Biobrennstoffzelle geleitet und anschließend mit einer zweiten gleichen Pumpe in den Fermenter zurückgepumpt.

Um zu überprüfen, ob elektroaktive Substanzen oder der direkte Kontakt der Mikroorganismen mit der Anode das Stromsignal der Biobrennstoffzelle verursachen, wurden kontinuierliche Messungen mit der Biobrennstoffzelle im 40-l-Fermenter durchgeführt. Dazu wurde die Anode mit einem Dialyseschlauch ummantelt (Thomapur „Standard“, Typ: RCT 88-09, Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, s. auch Kap. 4.4.2). Der Schlauch hatte eine nominelle Ausschlußgrenze für Moleküle größer 10 kDa.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der Biobrennstoffzelle

4.1.1 Konstruktive Veränderungen

Ausgangspunkt der Optimierung war die von Sell (1991) entwickelte Biobrennstoffzelle (Abb. 4). Da diese jedoch zur Stromerzeugung konstruiert wurde, war es notwendig, sie an einen sensorischen Einsatz anzupassen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Biobrennstoffzelle hat statt des ursprünglich runden einen kanalförmigen Reaktionsraum. Dies dient der Verkleinerung bzw. Vermeidung von Toträumen und ist die gravierendste Veränderung der ursprünglich vorhandenen Biobrennstoffzelle (vgl. Abb. 4 und Abb. 11).

Das Gehäuse ist ein leicht demontierbares dreiteiliges Plexiglasgehäuse (Polymethylmethacrylat), das eine einfachere Handhabung ermöglicht.

Für einen mehrfachen Einsatz ist es notwendig, daß die Biobrennstoffzelle sterilisiert werden kann. Deshalb wurde die Platinelektrode mit einem auch bei hohen Temperaturen beständigen 2-Komponentenkleber in das als Anode verwendete Gehäuseteil geklebt. Der elektrische Kontakt erfolgte über einen Platindraht, der an das Platinblech ohne zusätzliche Verwendung von Lot thermisch kontaktiert wurde, da sich dies als die beim Erhitzen stabilste Verbindung herausgestellt hatte. Obwohl vom Hersteller für das Polymethylmethacrylat eine Grenztemperatur von nur 70°-90°C angegeben wird, läßt sich die Biobrennstoffzelle für 20 min bei 121°C autoklavieren. Wichtig ist dabei, daß zwischen den einzelnen Gehäuseteilen keine Spannungen vorhanden sind, da es sonst zu einer Verformung des Zellkörpers kommt.

Die in früheren Arbeiten (Grummann, 1995) genutzte Ionenaustauschmembran wurde nicht weiter verwendet, da in den Versuchen mit und ohne Membran kein Unterschied festgestellt werden konnte. Die folgenden Abbildungen (Abb. 11, links und Abb. 11, rechts) zeigen die im Rahmen der Arbeit entwickelte Biobrennstoffzelle als Gesamtansicht und in Einzelteilen.

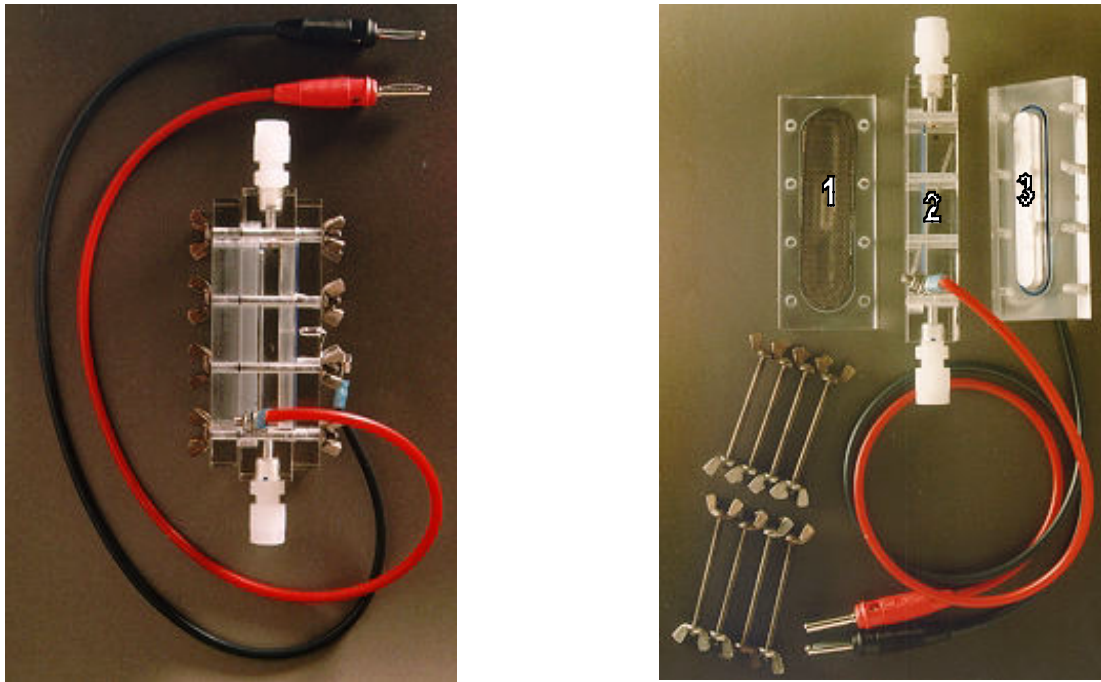


Abb. 11: Fotografische Aufnahme der in der Arbeit weiterentwickelten Biobrennstoffzelle

a) Meßzelle komplett (links)

b) Bauteile der Meßzelle (rechts)

1 Außenteil mit Sauerstoffdiffusionskathode

2 Mittelteil

3 Außenteil mit Platinanode

Die technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle befindet sich im Anhang der Arbeit (s. Kap. 7.9).

4.1.2 Wahl des Elektrodenmaterials

Ziel der Arbeit von Sell (1991) war, mit der Biobrennstoffzelle maximal mögliche Stromsignale zu erzeugen. Dazu wurde als Anode eine Graphitscheibe verwendet und der Innenraum mit einer Graphitschüttung befüllt.

Für den sensorischen Einsatz der Biobrennstoffzelle wurden verschiedene Materialien auf ihre Eignung als Anodenmaterial und ihre Tauglichkeit für die Konstruktion der Zelle als Ein- oder Mehrwegsensoren untersucht. Die Frage, ob ein Einwegsensoren nach seiner Nutzung verworfen wird, oder ob er als Mehrwegsensoren mehrmals eingesetzt werden kann, ist auch vom ökonomischen Standpunkt von Bedeutung, da die Anschaffungskosten der Anoden sehr stark variieren.

Platin, platinisiertes Titan und Glaskohlenstoff als Anodenmaterial lieferten die besten Meßergebnisse auch über längere Zeiträume. Bei gleicher Anodenfläche und gleichen Versuchsbedingungen ergaben sie annähernd gleiche Stromsignale. Graphit lieferte bei mehrmaliger Verwendung zu Versuchsbeginn höhere Ströme als Platin, platinisiertes Titan und Glaskohlenstoff. Bei Graphit handelt es sich um

ein poröses Material, in dessen Poren sich bei mehrfachem Einsatz Mikroorganismen ansiedeln. Sie führen zu Versuchsbeginn zu einem zu hohen Stromsignal, das nicht repräsentativ für den Prozeßverlauf ist. Dieser Biofilm läßt sich nur mit großem Aufwand entfernen.

Bei der Suche nach kostengünstigen Elektrodenmaterialien wurden auch mehrere molybdän- und nickelreiche Stähle getestet, da diese eine besonders hohe Korrosionsbeständigkeit aufweisen. Diese erwiesen sich als völlig ungeeignet, da bereits nach kurzer Zeit, wahrscheinlich bedingt durch die Mikroorganismen und das Medium, Korrosion einsetzte. Der resultierende Korrosionsstrom überdeckte das Meßsignal und machte eine Messung der biologischen Aktivität mit der Biobrennstoffzelle unmöglich.

Auf Titan (unplatinert) und Silber bildeten sich Passivierungsschichten, die eine Verwendung ebenfalls ausschließen.

Für einen Einwegsensoren können platinertes Titan und Graphit eingesetzt werden, da beide sehr kostengünstig sind. Graphit eignet sich für einen solchen Einsatz, da es erst bei mehrmaligem Gebrauch zum Bewuchs der Elektrode mit Mikroorganismen kommt.

Für den Mehrwegsensoren bieten sich Platin und Glaskohlenstoff an. Sie liefern auch nach längerer Versuchsdauer gleichbleibend gute Resultate, verursachen aber hohe Materialkosten.

Da die Biobrennstoffzelle in der Arbeit mehrmals eingesetzt werden sollte, wurde Platin als Anodenmaterial gewählt.

4.1.3 Einfluß von Anodenfläche und -position

Es wurden Versuche durchgeführt, um zu zeigen, wie weit sich konstruktive Veränderungen an der Biobrennstoffzelle, wie die Verkleinerung der Anodenfläche und ihrer Position, auf das Stromsignal auswirken.

Die in dieser Arbeit verwendete Anode weist eine Breite von 8 mm und eine Länge von 71 mm auf (568 mm_l). Um zu überprüfen, wie sich eine andere Größe der Anodenfläche auf die Höhe des Stromsignals auswirken würde, wurde die Anode halbiert. Die beiden entstandenen Anodenflächen hatten eine Breite von 8 mm und eine Länge von 35,5 mm (je 284 mm²).

Es sollte untersucht werden, ob innerhalb der Biobrennstoffzelle ein Konzentrationsgradient an reduziertem Mediator in Strömungsrichtung besteht, und wie sich dieser am Anfang und am Ende des kanalförmigen Innenraums der Biobrennstoffzelle auf die Höhe des Stromsignals auswirkt. Dies sollte durch die halbierten Anoden im Zellenein- bzw. Zellenausgang gezeigt werden.

Getestet wurde auch eine Biobrennstoffzelle mit einer Anode und dazu parallel eine weitere Biobrennstoffzelle mit den zwei geteilten Anoden.

Dazu wurde eine *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium (s. Kap. 7.2.1.1) mit einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM und einer Glucosekonzentration von 1 g/l durchgeführt. Es wurde mit 5 ml einer Vorkultur von *E. coli* inokuliert.

Der Versuch wurde wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben durchgeführt.

Es wurde sowohl das Stromsignal als auch die optische Dichte bei 600 nm (s. Kap. 7.1.4) erfaßt.

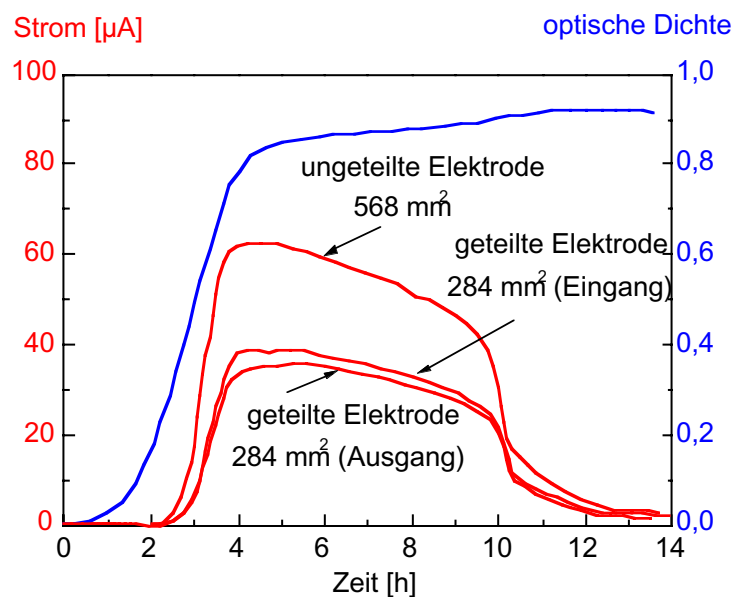


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des Stroms beim Einsatz einer ungeteilten Elektrode und zweier geteilter Elektroden (am Zelleneingang und Zellenausgang positioniert) und der optischen Dichte bei 600 nm während einer *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium mit einer Glucosekonzentration von 1,0 g/l und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM bei 37°C

Das Strommaximum der ungeteilten Anode betrug 62 μA . Das Stromsignal der geteilten Anode erreichte am Zelleneingang 40 μA und am Zellenausgang 35 μA . Der Versuch zeigt also, daß sich eine Verkleinerung der Elektrodenflächen sich in einer annähernd der Fläche proportionalen Verringerung des Stromsignals auswirkt. Dies ist das Ergebnis, das nach der Massentransportgleichung (Gleichung 2) zu erwarten war.

Der Vergleich der Stromsignale der Anode am Zelleneingang mit denen der Anode am Zellenausgang zeigt, daß der Strom am Eingang der Zelle nur geringfügig höher als an ihrem Ausgang ist (s. Kap. 4.1.3). D. h., daß es zu keiner wesentlichen Verarmung an reduziertem Mediator innerhalb des Strömungskanal kommt.

Der Versuch zeigt auch, daß die Gestaltung des Innenraums der Biobrennstoffzelle in Form eines Strömungskanals vom verfahrenstechnischen Standpunkt aus richtig war. Der Kanal bietet bessere Strömungsbedingungen, d. h. eine gleichmäßigere Durchströmung als die vorher genutzte runde Form. Die Toträume und damit die langsam durchströmten Bereiche, die ein niedrigeres Stromsignal verursachen, konnten weitestgehend beseitigt werden.

Die geringen Unterschiede zwischen dem Stromsignal am Zelleneingang und -ausgang, deuten darauf hin, daß der kanalförmige Innenraum der Biobrennstoffzelle bei Bedarf weiter verlängert werden kann.

4.1.4 Einfluß des Volumens des Innenraums der Biobrennstoffzelle

Da bei Versuchen, bei denen nach der Messung das Probenvolumen verworfen wird (s. Kap. 4.4.1), die Probemenge möglichst gering gehalten werden soll, wurde der Einfluß der Größe des Innenraums der Biobrennstoffzelle auf das Stromsignal überprüft. Dazu wurde der Abstand zwischen Anode und Kathode von ursprünglich 8 mm auf 6 mm reduziert. Das bedeutete eine Verringerung des Fassungsvermögens der Biobrennstoffzelle von 7 ml auf 5 ml. Dies war durch ein speziell für die Biobrennstoffzelle gefertigtes Außenteil, das an der Anodenseite angebracht wurde, möglich (Abb. 51).

Der Versuchsaufbau entspricht der in Kapitel 3.2.3.2 beschriebenen Apparatur. Es wurde parallel während einer Kultivierung sowohl das Stromsignal einer Biobrennstoffzelle mit 8 mm Abstand zwischen Anode und Kathode als auch mit verkleinertem Innenraum gemessen.

Der Versuch wurde mit einer *E. coli*-Kultur in Vollmedium (s. Kap. 7.2.1.1) sowie einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM und einer Glucosekonzentration von 1 g/l durchgeführt. Es wurde mit 5 ml einer Vorkultur inokuliert.

Neben der optischen Dichte bei 600 nm (s. Kap. 7.1.4) wurde das aus beiden Biobrennstoffzellen erhaltene Stromsignal registriert.

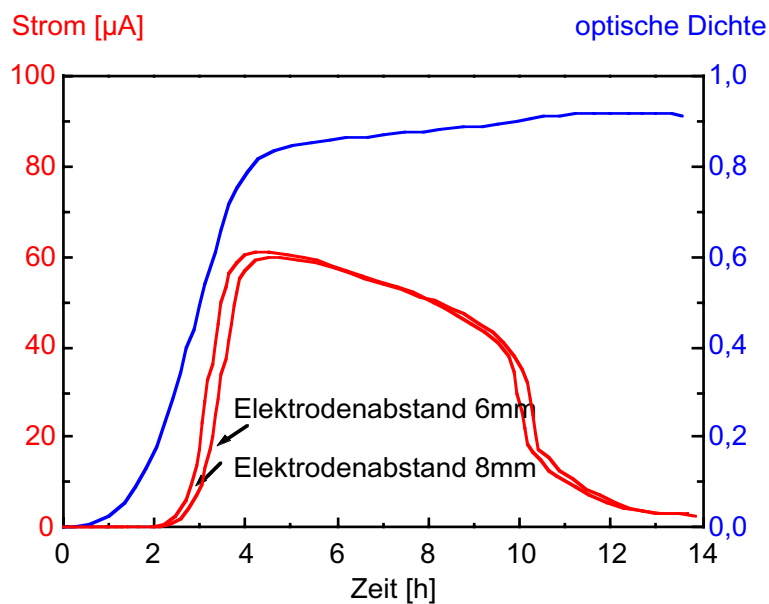


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Stroms zweier Biobrennstoffzellen mit 8 mm und 6 mm Elektrodenabstand und Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm während einer *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium mit einer Glucosekonzentration von 1,0 g/l und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM bei 37°C

Es wurde deutlich, daß eine Verringerung des Elektrodenabstands von 8 mm auf 6 mm und die daraus folgende Verkleinerung des Innenraums der Zelle ohne Einfluß auf das Stromsignal bleiben.

Das Volumen der Biobrennstoffzelle wird maßgeblich durch die Fläche der Elektroden sowie deren Abstand bestimmt. Durch eine Verkleinerung der Elektrodenflächen und ihres Abstands voneinander ist eine Reduktion des Volumens der Zelle möglich. Bei zukünftigen Anwendungen der Biobrennstoffzelle bei denen ein geringes Probenvolumen von Bedeutung ist, kann das Zellenvolumen der Biobrennstoffzelle weiter verkleinert werden.

4.2 Experimente zum Einsatz von Mediator und Mikroorganismen in der Biobrennstoffzelle

4.2.1 Experimente mit dem Dreielektrodensystem zur Eignung des Mediators für den Einsatz in der Biobrennstoffzelle

4.2.1.1 Ermittlung des optimalen Meßbereichs für die Versuche mit dem Dreielektrodensystem

Um die Biobrennstoffzelle zur Überwachung von Veränderungen der Aktivität von Mikroorganismen und tierischen Zellen einsetzen zu können, muß der Mediator durch diese reversibel reduzierbar sein. Wichtig ist hierbei zum einen, ob der Mikroorganismus oder die tierische Zelle in der Lage ist, den verwendeten Mediator zu reduzieren, und zum anderen, ob der Mediator quantitativ in ausreichender Menge reduziert wird. Nur bei genügendem Reduktionsvermögen ist ein aussagekräftiges Stromsignal zu erwarten.

Die Messungen mit dem Dreielektrodensystem erfolgten in einem 250-ml-Fermentationsgefäß (s. Kap. 7.8) mit 200 ml sauerstofffreiem, mit Stickstoff überlagertem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 (s. Kap. 7.4). Die Lösung enthielt zu Versuchsbeginn 0,1 mM vollständig oxidierten Mediator und 25 mM Glucose. Die jeweiligen Mikroorganismen wurden gewaschen und aufkonzentriert der Lösung zugegeben (3.2.1). Dadurch wurde der Versuch beschleunigt und der Einfluß von Medienbestandteilen weitgehend eliminiert.

Zusätzlich wurden Kontrollversuche ohne Zugabe von Mediator durchgeführt.

Der Versuchsaufbau und die Versuchsbeschreibung befinden sich in Kapitel 3.2.1. Es wurde 180 ml Medium mit 20 ml sterilfiltrierter 4 mM HNQ-Lösung versetzt (s. Kap. 7.3).

Um den optimalen Meßbereich zu ermitteln, in dem die oxidierte und die reduzierte Form des Mediators detektiert werden kann, wurde beispielhaft eine *E. coli*-Kultivierung durchgeführt. Bei Anwesenheit von Mediator wurde vor und nach der Kultivierung die Spannung variiert und dabei der Stromverlauf registriert (Abb. 14). Als Versuchsende wurde der vollständige Farbumschlag des Mediators von orange nach farblos definiert. Die Messungen erfolgten im Bereich von -650 mV bis 1200 mV gegen Ag/AgCl.

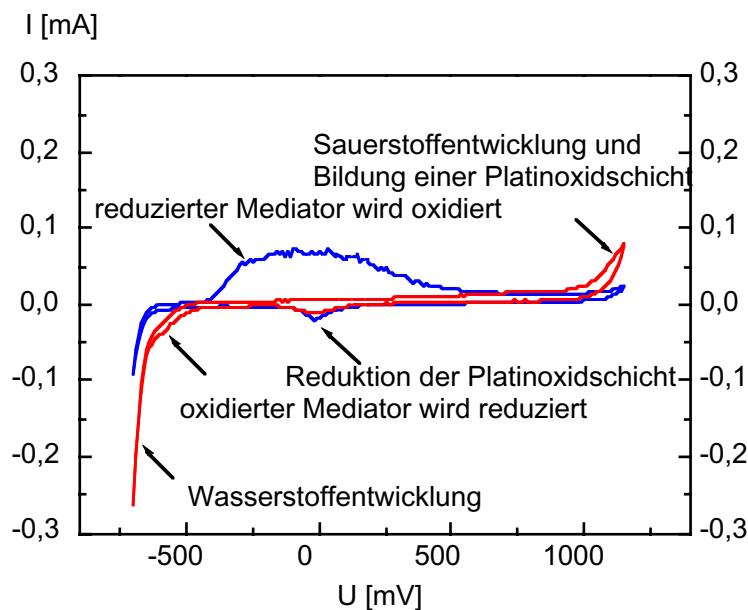


Abb. 14: Strom-Spannungs-Kennlinie einer *E. coli*-Kultur in Phosphatpuffer mit 25 mM Glucose und 1 mM Mediator unter anaeroben Bedingungen, Versuchsbeginn (rot) Versuchsende (blau)

Im Bereich von -600 mV bis -400 mV gegen Ag/AgCl zeigt sich zu Versuchsbeginn ein negatives Stromsignal (Abb. 14, rote Kurve). Dieses negative Signal ist durch die oxidierte Form des Mediators bedingt, die in diesem Spannungsbereich an der Elektrode reduziert wird. Zu Versuchsende zeigte sich im Bereich zwischen -400 mV und 600 mV gegen Ag/AgCl ein ausgeprägtes positives Stromsignal (Abb. 14, blaue Kurve), während der negative Strom zwischen -600 mV und -400 mV gegen Ag/AgCl nicht mehr zu erkennen ist (Abb. 14). Dieses positive Stromsignal wird dadurch verursacht, daß der Mediator, der zuvor durch die Mikroorganismen reduziert wurde, an der Elektrode oxidiert wird.

Im Spannungsbereich unterhalb -650 mV gegen Ag/AgCl findet eine Wasserstoffentwicklung statt, der dadurch entstehende Stromfluß überdeckt das Signal der Oxidation des Mediators. Zwischen 0 mV und 150 mV gegen Ag/AgCl kommt es zu einer Platinreduktion. Später erfolgt im Bereich zwischen 1000 mV und 1200 mV gegen Ag/AgCl die Platinoxidation und eine Sauerstoffentwicklung.

Der mit Hilfe dieser Ergebnisse für die nachfolgenden Versuche gewählte optimale Spannungsbereich von -600 mV bis 0 mV gegen Ag/AgCl erlaubt, die Oxidation sowie die Reduktion des Mediators zu zeigen. Oxidations- und Reduktionsvorgänge des Elektrodenmaterials sowie Sauerstoff- und Wasserstoffentwicklung erfolgen dagegen außerhalb dieses gewählten Bereiches.

Im folgenden wurde der Mediator mit den Mikroorganismen *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Penicillium chrysogenum* sowie ausgewählten tierischen Zellen getestet.

Um den Nachweis der Reduzierbarkeit des Mediators zu führen, wurde bei Versuchsbeginn und am Versuchsende jeweils eine Strom-Spannungs-Kennlinie erfaßt. Nach dem Ende jedes Versuchs wurde Sauerstoff in das System eingeleitet, um mit Hilfe des Farbumschlages auch die Reversibilität der Mediatorreduktion zu überprüfen.

Bei allen Versuchen mit dem Dreielektrodensystem standen qualitative Aussagen zur Reduzierbarkeit des Mediators durch die Mikroorganismen im Vordergrund.

4.2.1.2 Mediatorreduktion durch eine *Escherichia coli*-Kultur

Es wurden Versuche ohne und mit 1 mM Mediator durchgeführt.

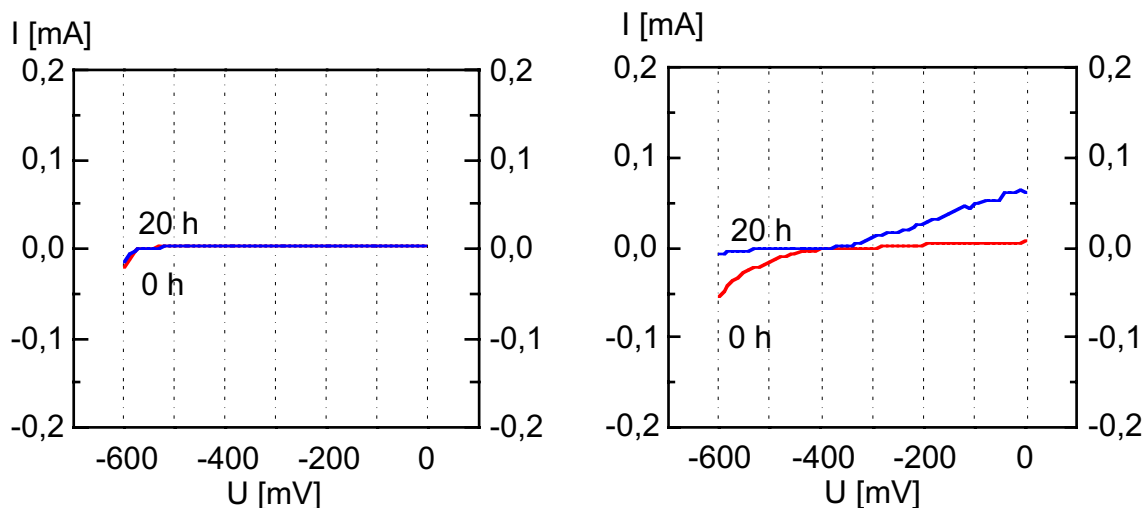


Abb. 15: Strom-Spannungs-Kennlinie einer *E. coli*-Kultur in Phosphatpuffer mit 25 mM Glucose ohne Mediator -Kontrollversuch- (links) und mit 1 mM Mediator (rechts) unter anaeroben Bedingungen, Versuchsbeginn (rot) Versuchsende (blau)

Beim Kontrollversuch ohne Mediator (Abb. 15, links) verändert sich das Stromsignal nur sehr wenig.

Beim Versuch mit Mediator (Abb. 15, rechts) zeigt sich zu Versuchsbeginn und unterhalb von -500 mV gegen Ag/AgCl ein deutlich negativerer Strom als ohne Mediator. Dieser Strom geht mit zunehmender Versuchsdauer gegen Null, was auf eine Abnahme des oxidierten Mediators zurückzuführen ist. Am Versuchsende und oberhalb von -300 mV gegen Ag/AgCl steigt das Stromsignal durch Zunahme des reduzierten Mediators an. Dies ist auch durch das Entfärben der Zelllösung sichtbar.

Nach dem Einleiten des Sauerstoffs kommt es zu einem erneuten Farbumschlag von farblos zu orange. Der Mediator wird von *E. coli* reduziert und nicht irreversibel modifiziert.

4.2.1.3 Mediatorreduktion durch eine *Saccharomyces cerevisiae*-Kultur

Es wurden Versuche ohne und mit 1 mM Mediator durchgeführt.

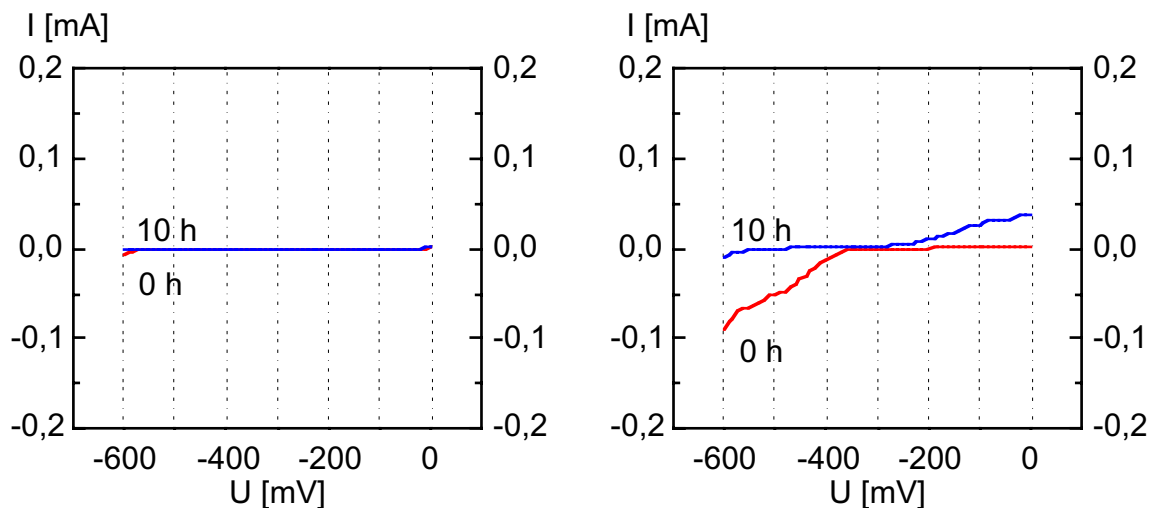


Abb. 16: Strom-Spannungs-Kennlinie einer *S. cerevisiae*-Kultur in Phosphatpuffer mit 25 mM Glucose ohne Mediator -Kontrollversuch- (links) und mit 1 mM Mediator (rechts) unter anaeroben Bedingungen, Versuchsbeginn (rot) Versuchsende (blau)

Beim Kontrollversuch ohne Mediator (Abb. 16, links) war während des Versuchsverlaufs keine relevante Änderung des Stromsignals erkennbar.

Dagegen veränderte sich der Strom beim Einsatz von Mediator deutlich (Abb. 16, rechts). Am Versuchsanfang und unterhalb von -400 mV gegen Ag/AgCl ist der Strom negativ, er geht dann auf Grund der abnehmenden Konzentration des oxidierten Mediators gegen Null. Am Versuchsende und oberhalb von -200 mV gegen Ag/AgCl steigt das Stromsignal auf Grund der quantitativen Zunahme des reduzierten Mediators an. Dies ist durch das Entfärben der Zelllösung zu beobachten.

Nach dem Einleiten von Sauerstoff verändert sich die Farbe der Zelllösung von farblos zu orange, was bedeutet, daß der Mediator auch von *S. cerevisiae* reduziert und nicht irreversibel modifiziert wird.

4.2.1.4 Mediatorreduktion durch eine *Penicillium chrysogenum*-Kultur

Es wurden auch hier Versuche ohne und mit 1 mM Mediator durchgeführt.

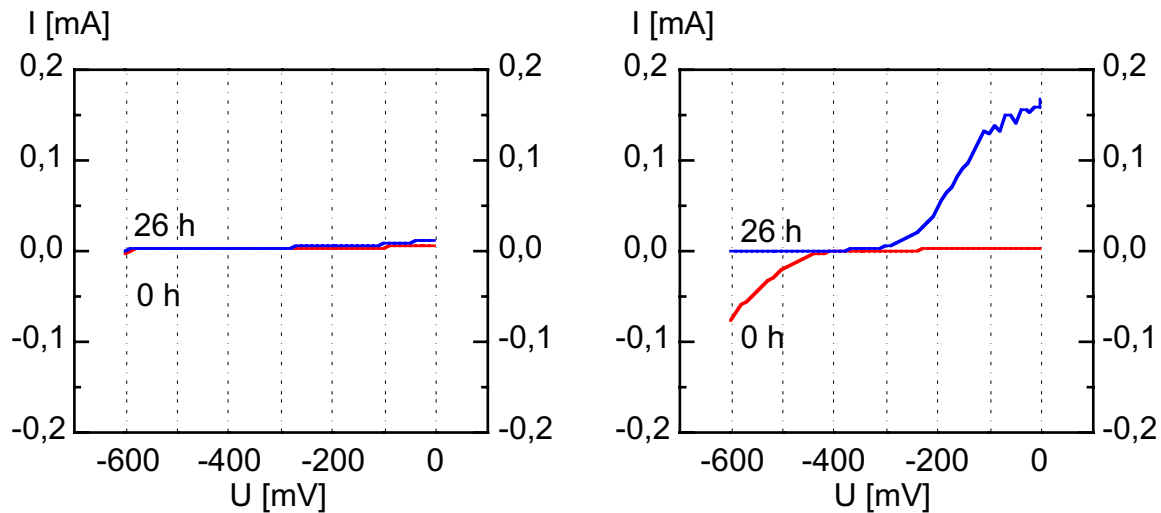


Abb. 17: Strom-Spannungs-Kennlinie einer *P. chrysogenum*-Kultur in Phosphatpuffer mit 25 mM Glucose ohne Mediator -Kontrollversuch- (links) und mit 1 mM Mediator (rechts) unter anaeroben Bedingungen, Versuchsbeginn (rot) Versuchsende (blau)

Während des Kontrollversuchs ohne Mediator (Abb. 17, links) waren keine signifikanten Änderungen im Stromverlauf erkennbar.

Der Versuch mit Mediator (Abb. 17, rechts) zeigte einen deutlichen Stromanstieg am Versuchsende oberhalb von -300 mV, was auf eine mengenmäßige Zunahme des reduzierten Mediators nach den 26 h Versuch hinweist. Damit geht eine Abnahme seiner oxidierten Form einher. Dies wurde deutlich durch den negativen, mit fortschreitender Versuchsdauer gegen Null gehenden Strom unterhalb von -450 mV. Dies war auch durch einen Entfärben der Zelllösung zu beobachten.

Das Einleiten von Sauerstoff führte zu einem Farbumschlag von farblos zu orange, da der Mediator von *P. chrysogenum* reduziert und dabei nicht irreversibel modifiziert wurde.

4.2.1.5 Mediatorreduktion durch tierische Zellen

In den Versuchen mit den tierischen Zellen wurde direkt im DMEM/F12D-Medium (s. Kap. 7.2.4.1) gemessen, da sie im Phosphatpuffer absterben würden.

Es wurden Versuche ohne und mit 0,4 mM Mediator durchgeführt.

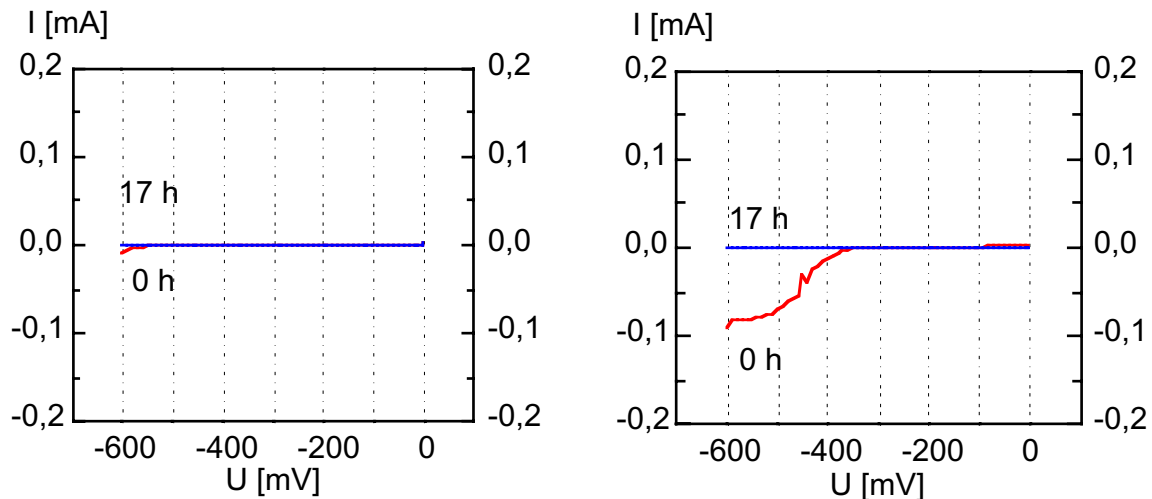


Abb. 18: Strom-Spannungs-Kennlinie einer BHK B4/B1-Kultur (tierische Zellen) in DMEM/F12D-Medium ohne Mediator -Kontrollversuch- (links) und mit 0,4 mM Mediator (rechts) unter anaeroben Bedingungen, Versuchsbeginn (rot) Versuchsende (blau)

Beim Kontrollversuch ohne Mediator (Abb. 18, links) war während des Versuchsverlaufs keine relevante Änderung des Stromsignals erkennbar.

Dagegen geht beim Versuch mit Mediator (Abb. 18, rechts) der anfangs negative Strom unterhalb von -400 mV gegen Ag/AgCl gegen Null. Auch das Entfärben der Zelllösung war zu beobachten.

Trotz der Abnahme der oxidierten Form des Mediators ist oberhalb von -200 mV gegen Ag/AgCl kein Stromanstieg erkennbar.

Beim Einleiten von Sauerstoff kommt es erneut zu einem Farbumschlag von farblos zu orange.

Während der Mediator von den Mikroorganismen *E. coli*, *S. cerevisiae* und *P. chrysogenum* reversibel reduziert wird, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob dies auch bei der tierischen Zelllinie BHK B4/B1 der Fall ist, da keine klare Aussage über das Entstehen der reduzierten Form des Mediators gemacht werden kann. Eine Ursache dafür könnte sein, daß nicht in Phosphatpuffer, sondern in einem Medium mit komplexer Zusammensetzung gearbeitet wurde. Dadurch könnten sich, bedingt durch die Polarisation der Arbeitselektrode, Passivschichten, z. B. Medienbestandteile, auf der Elektrodenoberfläche bilden, die eine Umsetzung der reduzierten Form des Mediators verhindern. Gezeigt werden konnte, daß die oxidierte Form des Mediators in seiner Konzentration abnimmt und bei Zugabe von Sauerstoff erneut zunimmt, was für die Reversibilität der Mediatorreduktion spricht. Die Ergebnisse der Versuche mit dem Dreielektrodensystem sprechen für einen weiteren Einsatz des Mediators. Eine endgültige Aussage kann aber nur durch einen direkten Einsatz in der Biobrennstoffzelle gemacht werden.

4.2.2 Einsatz der Biobrennstoffzelle zur Kontrolle des Wachstums verschiedener Mikroorganismen

Nachdem mit dem Dreielektrodensystem gezeigt wurde, daß *E. coli*, *S. cerevisiae* und *P. chrysogenum* zur Mediatorreduktion fähig sind, soll hier gezeigt werden, ob es mit der Biobrennstoffzelle möglich ist, ihr Wachstum kontinuierlich zu überwachen.

Der Versuchsaufbau entsprach der in Kapitel 3.2.3.2 beschriebenen Apparatur.

Bei Versuchen mit Mediator wurde eine Konzentration von 0,2 mM eingestellt. Das Animpfen erfolgte bei *E. coli*, *P. chrysogenum* mit 5 ml Vorkultur (s. Kap. 3.1.1) und bei *S. cerevisiae* durch direkte Zugabe der Reinzuchthefen (s. Kap. 3.1.2).

Die optische Dichte bei 600 nm wurde photometrisch erfaßt (s. Kap. 3.2.3.2.). Gleichzeitig wurde das Stromsignal der Biobrennstoffzelle gemessen (s. Kap. 3.2.2).

4.2.2.1 *Escherichia coli*-Kultivierung

Bei dem Mikroorganismus *E. coli* wurde Mineralmedium mit einer Glucosekonzentration von 1 g/l verwendet (s. Kap. 7.2.1.2).

Es wurden Versuche ohne (Abb. 19, links) und mit Mediator (Abb. 19, rechts) durchgeführt.

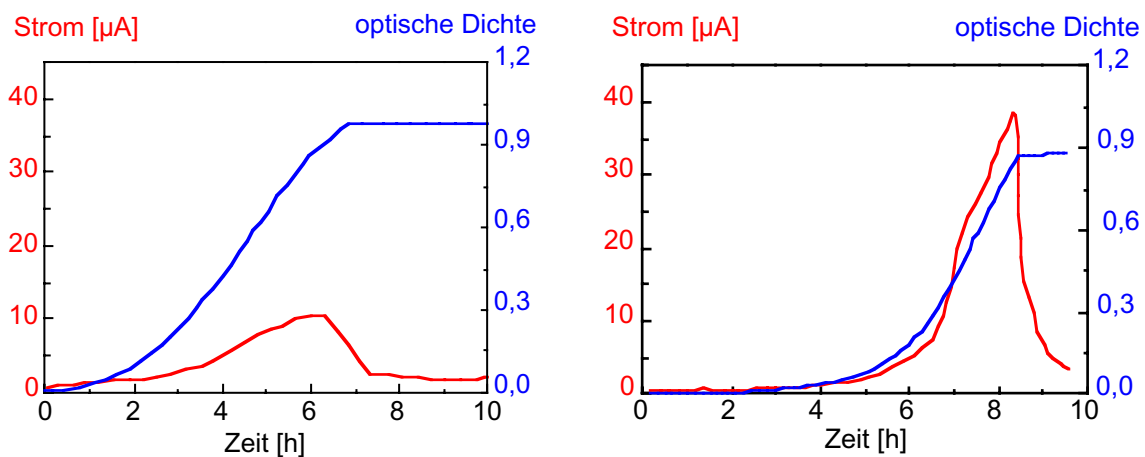


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf von Strom und optischer Dichte während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium ohne Mediator (links), mit 0,2 mM Mediator (rechts) und mit einer Glucosekonzentration von 1 g/l bei 37°C

Ein Stromsignal ist auch ohne Mediator zu registrieren. Die Kurve für den Versuch mit Mediator hat einen deutlich ausgeprägteren Verlauf, denn der Mediator verstärkt das Signal. Der Maximalwert des Stroms ist im Versuch mit Mediator (0,2 mM) um ca. den Faktor 4 höher als im Versuch ohne Mediator. In beiden Fällen ist erkennbar, daß der Zeitpunkt der Zunahme des Stromsignals annähernd mit dem

beginnenden Wachstum der Mikroorganismen übereinstimmt. Das Signal des Stroms und der optischen Dichte verlaufen analog. Stagniert das mikrobielle Wachstum, beginnen sich beide Signale zu unterscheiden. Das Stromsignal beginnt zu sinken, während die optische Dichte konstant bleibt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Stromsignal der Biobrennstoffzelle einer *E. coli*-Kultivierung bis zum Beginn der stationären Phase einen der optischen Dichte ähnlichen Verlauf ergibt und danach, die mikrobielle Aktivität wiedergebend, sinkt.

4.2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Kultivierung

Mit der Uvaferm CEG-Hefe (s. Kap. 3.1.2) wurde eine *Saccharomyces*-Spezies eingesetzt, die auch in der Praxis von Bedeutung ist und im großtechnischen Maßstab als Trockenhefe für die Weinherstellung produziert wird. Dabei fand das Mineralmedium mit einer Glucosekonzentration von 5 g/l Anwendung (s. Kap. 7.2.2.3).

Es wurden Versuche ohne (Abb. 20, links) und mit Mediator (Abb. 20, rechts) durchgeführt.

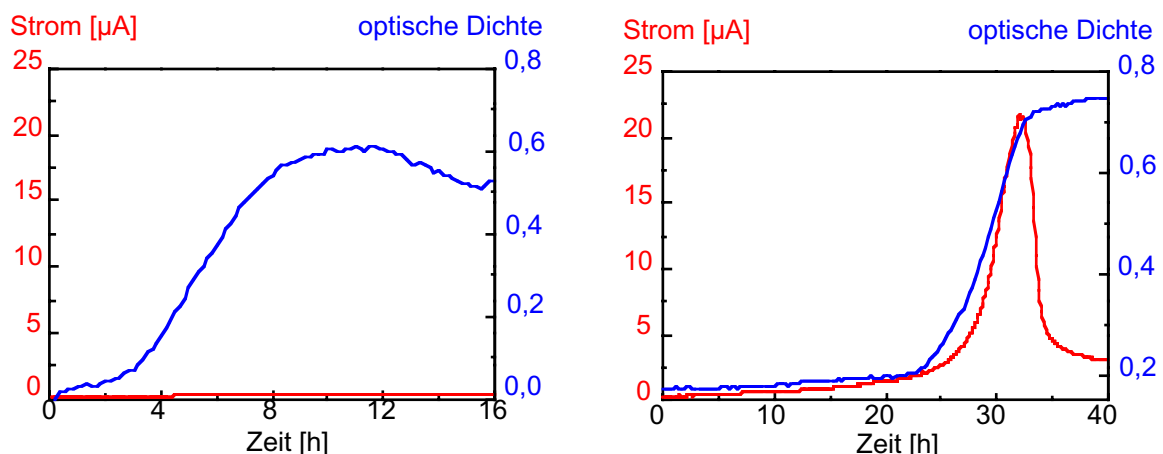


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der optischen Dichte bei 600 nm während einer *S. cerevisiae*-Kultivierung in Mineralmedium ohne Mediator (links), mit 0,2 mM Mediator (rechts) und mit einer Glucosekonzentration von 5 g/l bei 25°C

Der Versuch ohne Mediator zeigt kein erkennbares Stromsignal. Wie auch beim Versuch mit *E. coli* stimmt die Zunahme des Stromsignals mit Mediator annähernd mit dem in der optischen Dichte erkennbaren beginnenden Wachstums der Mikroorganismen überein. Das Signal des Stroms und der optischen Dichte verlaufen wie auch bei der *E. coli*-Kultivierung analog. Auch hier beginnen sich die Signale erst mit dem Ende des maximalen Wachstums und dem Beginn der stationären Wachstumsphase zu unterscheiden. Im Versuch mit Mediator hat das Stromsignal hier seinen Maximalwert, danach sinkt es sofort ab. Im Versuch mit

Mediator beginnt das mikrobielle Wachstum ca. 20 h später als im Versuch ohne Mediator. Eine Ursache dafür könnte eine in Mineralmedium auftretende retardierende Wirkung des Mediators auf das Anwachsverhalten der *S. cerevisiae*-Kultur sein.

Wie auch bei der *E. coli*-Kultivierung konnte während der *S. cerevisiae*-Kultivierung mit der Biobrennstoffzelle ein Stromsignal registriert werden, das eine Beschreibung der mikrobiellen Aktivität während des Wachstums gestattet.

4.2.2.3 *Penicillium chrysogenum*-Kultivierung

Für den Versuch mit *P. chrysogenum* wurde Malzextraktmedium verwendet (s. Kap. 7.2.3.1).

Bereits nach kurzer Versuchsdauer hatte der mycelbildende Pilz kugelförmige Pellets mit einem Durchmesser von mehreren Millimetern gebildet. Es war nicht möglich, die Pellets durch die Durchflußküvette bzw. die Biobrennstoffzelle zu pumpen.

Die bereits beim Dreielektrodensystem aufgezeigte Reduktion des Mediators durch den Mikroorganismus *P. chrysogenum* bewirkte auch hier ein Stromsignal. Auf eine Darstellung wird jedoch verzichtet, da die Versuche vorzeitig beendet werden mußten.

Die Ergebnisse sprechen trotzdem für einen Einsatz der Biobrennstoffzelle. Jedoch ist die Biobrennstoffzelle in ihrer verwendeten Ausführung hierzu nicht geeignet.

4.3 Einfluß verschiedener Faktoren auf das Wachstum von *E. coli* und das Stromsignal

4.3.1 Einfluß der Konzentration der Substrate

Das Biomassewachstum hängt u. a. vom Vorhandensein verschiedener Substrate, z. B. von der Kohlenstoffquelle, ab.

Im folgenden soll gezeigt werden, welchen Einfluß die Konzentration des Substrats auf das Signal der Biobrennstoffzelle hat (Abb. 21).

Der Wachstumsversuch (vgl. Kap. 3.2.3.2) wurde mit *E. coli* in 250 ml Mineralmedium (s. Kap. 7.2.1.2) mit einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM und einer anfänglichen Glucosekonzentration von 1 g/l durchgeführt. Der Versuch wurde mit 5 ml Vorkultur inokuliert (s. Kap. 3.1.1).

Immer, wenn das Stromsignal während der stationären Phase absank, einen Tiefpunkt erreichte und dort konstant blieb, wurde jeweils 1 g/l Glucose nachgefüllt.

Es wurde die optische Dichte bei 600 nm (s. Kap. 3.2.3.2) und das Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2) gemessen.

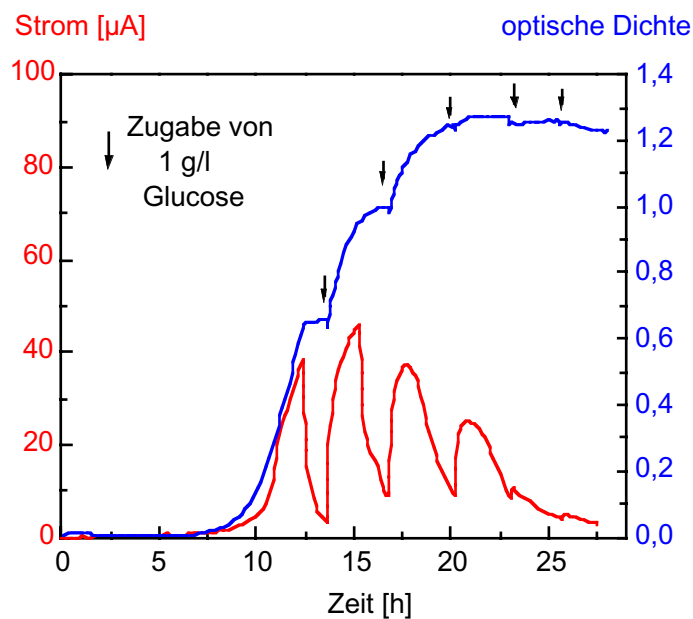


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der optischen Dichte bei 600 nm während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium mit einer anfänglichen Glucosekonzentration von 1 g/l, fünfmaligem Zudosieren von jeweils 1 g/l Glucose und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM bei 37°C

Im Versuch betrug das Stromsignal zu Versuchsbeginn ca. 3 μA . Dies ist das Basisstromsignal, das seine Ursache wahrscheinlich in unspezifischen Redoxreaktionen von Medienbestandteilen oder den Zellkomponenten der Biobrennstoffzelle und nicht in einer mikrobiellen Stoffwechselaktivität hat.

Nachdem die stationäre Wachstumsphase erreicht und das Stromsignal der Biobrennstoffzelle wieder abgesunken war, wurde nach 13,5 h zum ersten Mal 1 g/l Glucose zudosiert. Danach ging das Wachstum erneut in eine exponentielle Phase über, um nach 15,2 h eine zweite stationäre Phase zu erreichen. Sowohl Stromsignal als auch optische Dichte waren dieses Mal höher als in der ersten stationären Phase. Das Stromsignal hatte einen Maximalwert von 46 μA und die optische Dichte einen Wert von 1.

Nach 16,7 h wurde erneut Glucose mit einer Konzentration von 1 g/l zudosiert. Sofort setzte eine Zunahme der optischen Dichte bis auf 1,24 sowie ein Anstieg des Stromsignals auf 38 μA ein. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Zudosierungen trat der nachfolgende Stromabfall nicht so plötzlich ein. Er verlief innerhalb eines Zeitraumes von 2 h.

Ein erneute Zugabe von Glucose führte nicht zu einem weiteren Wachstum der Biomasse. Es war nur ein kurzer Anstieg des Stromsignals auf 25 μA , gefolgt von einem langsamen Absinken, zu beobachten.

Weitere Zugaben von Glucose führten zu keinen signifikanten Stromsignalen.

Es konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, anhand des Stromsignals der Biobrennstoffzelle zu erkennen, wann die Substrate, in diesem Fall die Kohlenstoffquelle, verbraucht ist (Abb. 21). Das Stromsignal sinkt dann analog zur Stoffwechselaktivität ab, und erst durch die Zugabe von Glucose kommt es zu einem erneuten Ansteigen. Es konnte auch sichtbar gemacht werden, daß Glucose der wachstumslimitierende Faktor ist, da die Limitierung durch Glucose zu einem sofortigen Abfall des Stromsignals und die Zugabe von Glucose zu einem sofortigen Ansteigen führen. Sind dagegen z. B. inhibierende Stoffwechselprodukte bzw. das Fehlen von Medienbestandteilen die Ursache für das Absinken des Stromsignals, wie im Versuch nach etwa 20 h, führt die Zugabe der Glucose nicht zu einer signifikanten Veränderung.

In den ersten 20 h des Versuchs konnte unmittelbar nach der Zugabe der Glucose ein Ansteigen des Stroms beobachtet werden. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, um die Biobrennstoffzelle zur online-Prozeßkontrolle und vor allem zur Prozeßsteuerung einzusetzen.

4.3.2 Einfluß der Art des Substrats

Die Kohlenstoffquelle hat einen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Biomasse. Deshalb soll die Abhängigkeit des Stromsignals von der Art der gewählten Kohlenstoffquelle gezeigt werden.

Die verwendeten Kohlenstoffquellen waren Glucose, Fructose und Lactose mit jeweils in einer Konzentration von 10 mM.

Die Fermentationen wurden wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben durchgeführt.

Beispielhaft wurde in den Versuchen der Mikroorganismus *E. coli* genutzt. Es wurde jeweils mit 5 ml Vorkultur angeimpft (s. Kap. 3.1.1). Die für die jeweilige Fermentation vorgesehenen Kohlenstoffquellen wurden bereits zur Anzucht der Vorkulturen eingesetzt.

Es wurde 250 ml Mineralmedium (s. Kap. 7.2.1.2) mit einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM verwendet.

Im Verlauf der Versuche wurden die optische Dichte bei 600 nm (s. Kap. 7.1.4) und das Stromsignal der Biobrennstoffzelle gemessen (s. Kap. 3.2.2).

Die Abbildung (Abb. 22) zeigt den Verlauf des Stroms und der optischen Dichte bei 600 nm von *E. coli*-Kultivierungen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

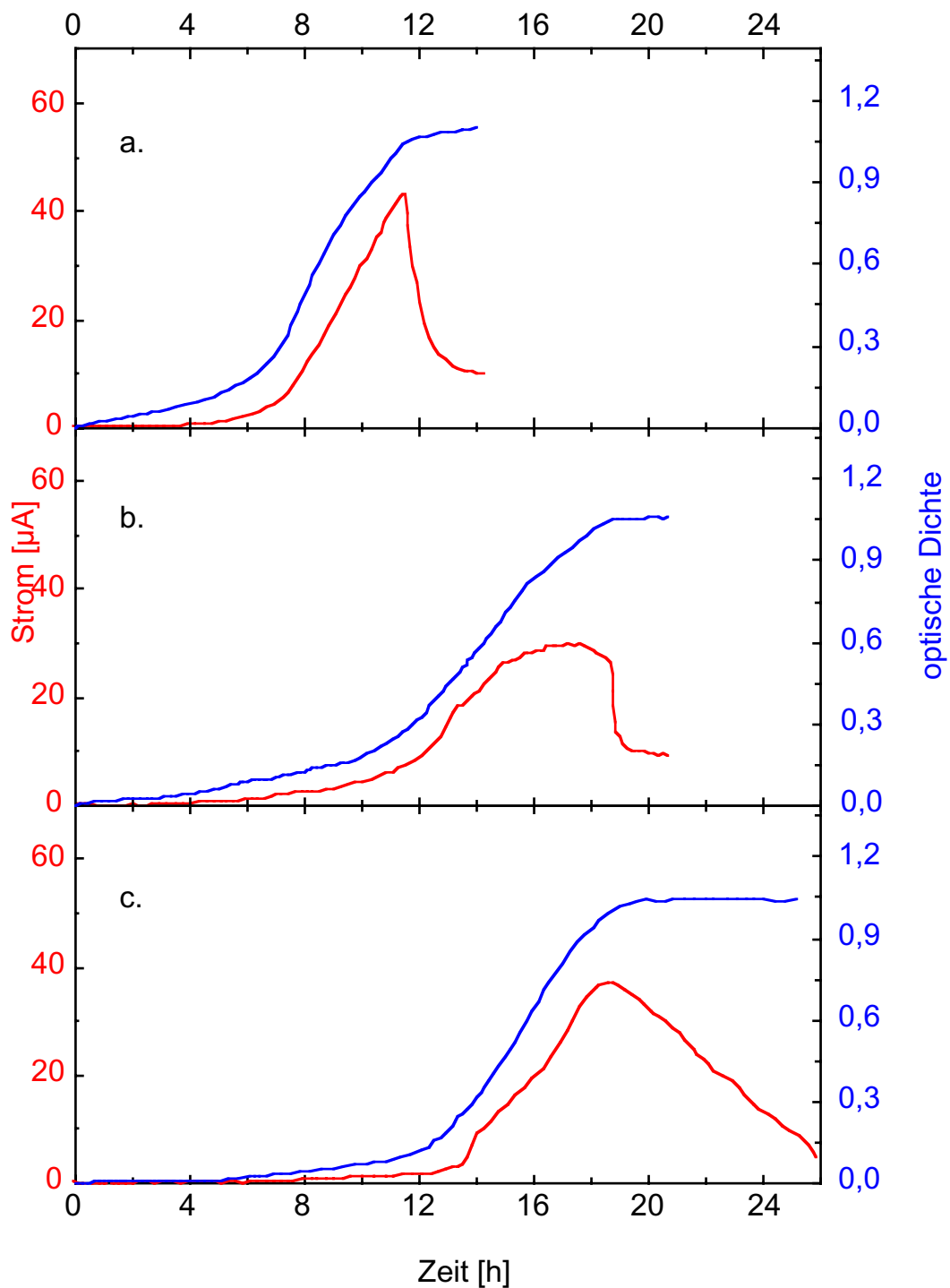


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der optischen Dichte bei 600 nm während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium mit 10 mM Glucose (a.), Fructose (b.), Lactose (c.) und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM bei 37°C

Die Wachstumskurven zeigen einen charakteristischen, aus lag-, log- und stationärer Phase bestehenden, dreiphasigen Verlauf. Bei allen Versuchen

durchlief das Stromsignal ein Maximum im Übergangsbereich von der Phase des maximalen mikrobiellen Wachstums zur stationären Phase.

Allerdings unterschieden sich die Profile der Stromkurven deutlich. Am schnellsten wird Glucose verbraucht. Das Stromsignal zeigte bereits nach 11,5 h ein scharf ausgeprägtes Maximum von 42 μA , während sich die Kurve beim Einsatz von Fructose erst nach 18 h allmählich dem Maximalwert von 30 μA näherte. Beide Kurven fielen nach dem Maximum steil ab. Dies war beim Fructose-Versuch noch deutlicher als beim Glucose-Versuch.

Im Unterschied dazu zeigte die Kurve des Stromsignals beim Einsatz von Lactose nach 18,5 h ein Maximum von 36 μA , um im weiteren Verlauf wesentlich gemäßigter auf niedrigere Werten zu sinken.

Die Versuche (Abb. 22) zeigen reproduzierbar, daß es mit der Biobrennstoffzelle möglich ist, für den Verbrauch verschiedener Kohlenstoffquellen charakteristische Profile aufzuzeichnen.

4.3.3 Einfluß von Substratgemischen

Da es möglich ist, mit Hilfe des Stromsignals den Einfluß sowohl der Konzentration des Substrats als auch dessen Art auf die mikrobielle Aktivität darzustellen, sollte es auch möglich sein, mit der Biobrennstoffzelle den Diauxieeffekt zu zeigen, der bei einigen Substratgemischen auftritt (Gottschalk, 1988).

Als Diauxie bezeichnet man das Phänomen eines mehrphasigen Wachstumszyklus, der in Nährlösungen sichtbar wird, in denen ein Gemisch von Nährstoffen vorliegt. Dabei hemmt eines der im Gemisch enthaltenen Substrate den Abbau der anderen (Substrathemmung). Erst nachdem dieses Substrat umgesetzt ist, werden die Enzyme für das nächste Substrat induziert. Danach können die verbleibenden Substrate metabolisiert werden. Ist Glucose Bestandteil des Gemischs, wird zuerst meist die Glucose abgebaut.

Für den Nachweis des Diauxieeffektes mit der Biobrennstoffzelle wurden zwei Substratgemische aus jeweils zwei Einzelsubstraten eingesetzt. Es wurden 0,5 g/l Glucose mit 0,5 g/l Sorbit und 0,5 g/l Glucose mit 0,5 g/l Lactose eingesetzt. Desweiteren wurde das Gemisch 0,5 g/l Glucose mit 0,5 g/l Fructose verwendet, bei dem keine Diauxie auftritt.

Die Versuche wurden mit *E. coli* durchgeführt. Es wurde mit 5 ml einer Vorkultur inokuliert (s. Kap. 3.1.1), bei der Glucose als Substrat verwendet wurde.

Die Fermentationen erfolgten in 250 ml Mineralmedium (s. Kap. 7.2.1.2) mit einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM und einer Gesamtsubstratkonzentration von 1,0 g/l wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben.

Die optische Dichte bei 600 nm (s. Kap. 7.1.4) und das Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2) wurden dabei gemessen.

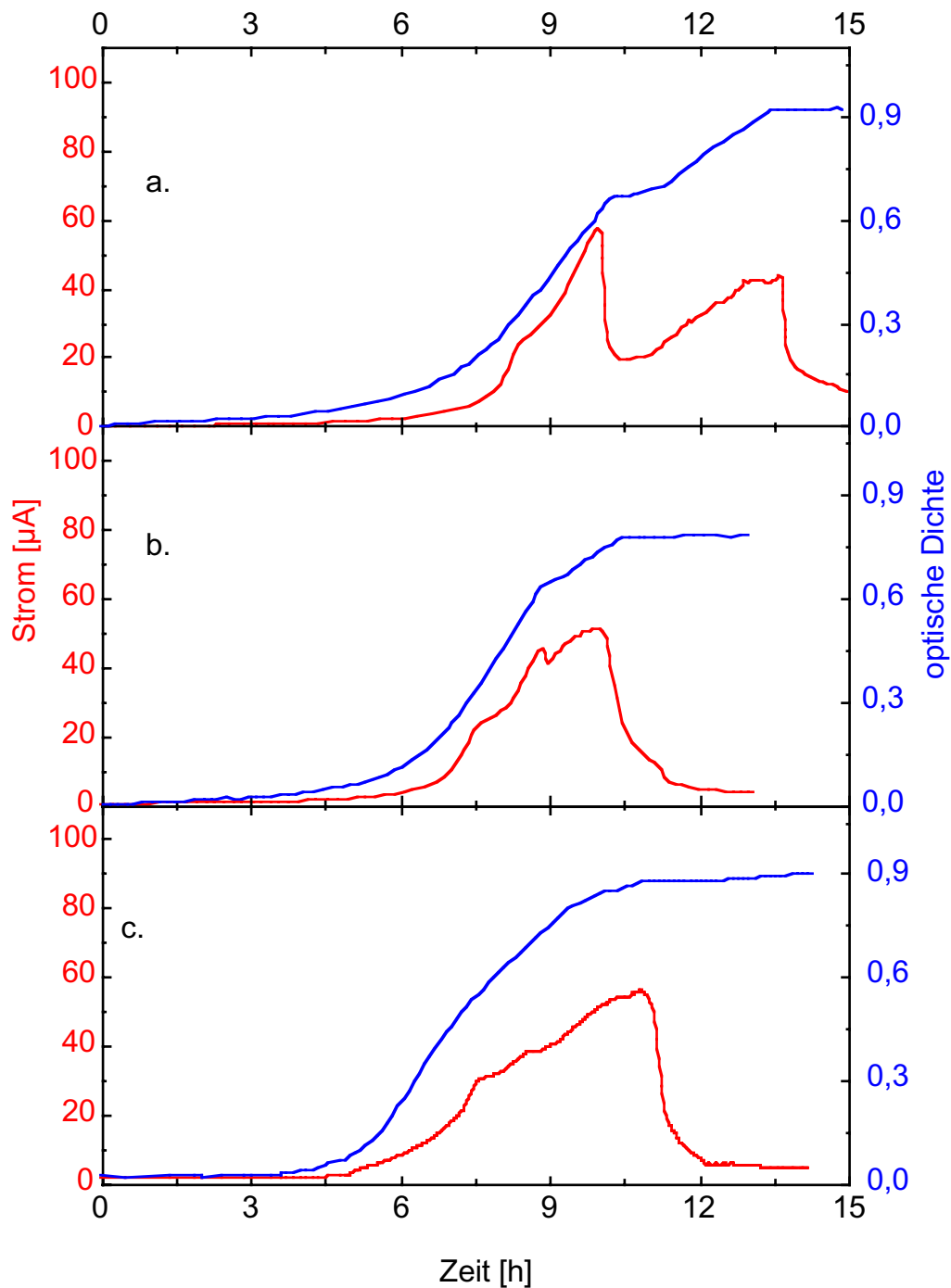


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der optischen Dichte bei 600 nm während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium mit einem Glucose-/Sorbit- (a.), Glucose-/Lactose- (b.), Glucose-/Fructosegemisch (c.) mit einer Konzentration der Anteile von 0,5 g/l und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM bei 37°C

Der Wachstumsversuch mit dem Glucose-/Sorbitgemisch (Abb. 23, a.) erreichte mit $57 \mu\text{A}$ nach 9,9 h ein erstes Maximum des Stromsignals. Bei dem Substratgemisch Glucose/Lactose (Abb. 23, b.) hatte der Strom mit $43 \mu\text{A}$ nach 8,9 h sein erstes Maximum. Danach fiel in beiden Versuchen das Stromsignal ab, wobei in dieser lag-Phase das Absinken beim Gemisch Glucose/Sorbit stärker ausgeprägt war. Nach erfolgter Stoffwechselumstellung waren erneute exponentielle Phasen erkennbar. Das Ende dieser Phasen war von erneuten Stromanstiegen bis zu weiteren Maxima gekennzeichnet. Diese betrugen beim Glucose-/Sorbitgemisch $43 \mu\text{A}$ nach 13,4 h und beim Glucose-/Lactosegemisch $50 \mu\text{A}$ nach 10,4 h. Danach erfolgte ein erneuter sofortiger Signalabfall.

Bei diesen beiden Gemischen ist aus dem Stromsignal der Biobrennstoffzelle offensichtlich, daß *E. coli* die Kohlenstoffquellen nacheinander verwertet. Die Diauxie, ein zweiphasiges Wachstum, ist deutlich zu erkennen. Im Verlauf der optischen Dichte ist sie nur schwach sichtbar.

Bei dem Versuch mit dem Gemisch Glucose/Fructose (Abb. 23, c.) gibt es erwartungsgemäß keine Diauxie (Schlegel, 1992). Beide Substrate werden gleichzeitig, Glucose allerdings schneller abgebaut. Durch Messung der Glucose- und der Gesamtzuckerkonzentration (s. Kap. 7.1.1 und 7.1.2) ist feststellbar, daß nach etwa 7,8 h bei einem Stromsignal von $30 \mu\text{A}$ die Glucose bereits vollständig verbraucht ist, wogegen noch etwa die Hälfte der Fructose vorliegt. In den folgenden zwei Stunden wird auch diese verbraucht, und der Strom steigt bis auf $56 \mu\text{A}$. Danach sinkt das Stromsignal wieder auf das Basisstromsignal und bleibt bis zum Versuchsende konstant. Im Unterschied zu den Ergebnissen mit nur einer Kohlenstoffquelle (Abb. 22) zeigt sich im Signal der Biobrennstoffzelle eine exponentielle Phase, deren Anstieg sich nach dem Verbrauch der ersten Kohlenstoffquelle, in diesem Fall Glucose, ändert. Dieses Phänomen ist im Stromsignal der Biobrennstoffzelle deutlich zu erkennen, im Gegensatz dazu ist es im Verlauf der optischen Dichte nur schwach sichtbar (Abb. 23 a, b).

Die Versuche (Abb. 23) verdeutlichen, daß es mit der Biobrennstoffzelle möglich ist, in einem zwei Kohlenstoffquellen enthaltenden Mineralmedium die Änderungen in der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen zu zeigen, die durch den Verbrauch einer Kohlenstoffquelle und den Start des Verbrauchs einer weiteren Kohlenstoffquelle bedingt sind.

4.3.4 Einfluß von physiologisch wirksamen Substanzen

Da das Stromsignal vor allem vom physiologischen Aktivitätszustand der Mikroorganismen abhängt, sollte es interessant sein, mit der Biobrennstoffzelle

auch die Wirkung von Stoffwechselgiften auf deren Metabolismus zu zeigen. Dazu wurden Versuche mit 2,4-Dinitrophenol, Natriumazid und Kupfersulfat durchgeführt. 2,4-Dinitrophenol ist ein Entkoppler, der Protonen durch die Zellmembran transportiert und so die protonenmotorische Kraft in dieser Membran zerstört. Dadurch steht kein Adenosintriphosphat (ATP) und damit keine freie Energie für den mikrobiellen Stoffwechsel zur Verfügung. Die enge Kopplung zwischen Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung wird aufgehoben und die Zellen sterben ab (Karlson et al., 1994).

Natriumazid zerstört irreversibel die Atmungskette von aeroben Mikroorganismen, in dem es mit der Ferriform des Häms a_3 reagiert. Dadurch sterben diese ab (Stryer, 1996).

Kupfer gehört zu einer Gruppe von Schwermetallen, die auch in Form ihrer Salze, wie z. B. als Kupfersulfat, als starkes Enzymgift wirken. Es bindet an die SH-Gruppen von Enzymen, verändert damit ihre Tertiär- und Quartiärstruktur und so ihre Funktionsfähigkeit und führt damit zum Absterben der Zellen (Schlegel, 1992).

Die Fermentationen erfolgten im 250-ml-Fermentationsgefäß in 250 ml Vollmedium (s. Kap. 7.2.1.1) mit einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM und einer Substratkonzentration von 1,0 g/l wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben. Es wurde mit 5 ml einer *E. coli*-Vorkultur inokuliert (s. Kap. 3.1.1).

Die Stoffwechselgifte 2,4-Dinitrophenol, Natriumazid bzw. Kupfersulfat wurden dem Fermentationsgefäß in der Mitte der stationären Wachstumsphase der *E. coli*-Kultivierung zugegeben.

Als Kontrolle wurde ein Wachstumsversuch mit *E. coli* durchgeführt. Dieser ermöglicht, das Absterben, das z. B. durch Substratmangel bzw. Produkthemmung bedingt ist, mit dem Absterben der Zellen durch die Zugabe eines Giftstoffes zu vergleichen.

Es wurden dabei die optische Dichte bei 600 nm (s. Kap. 7.2.1.1) und das Stromsignal der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 3.2.2) gemessen.

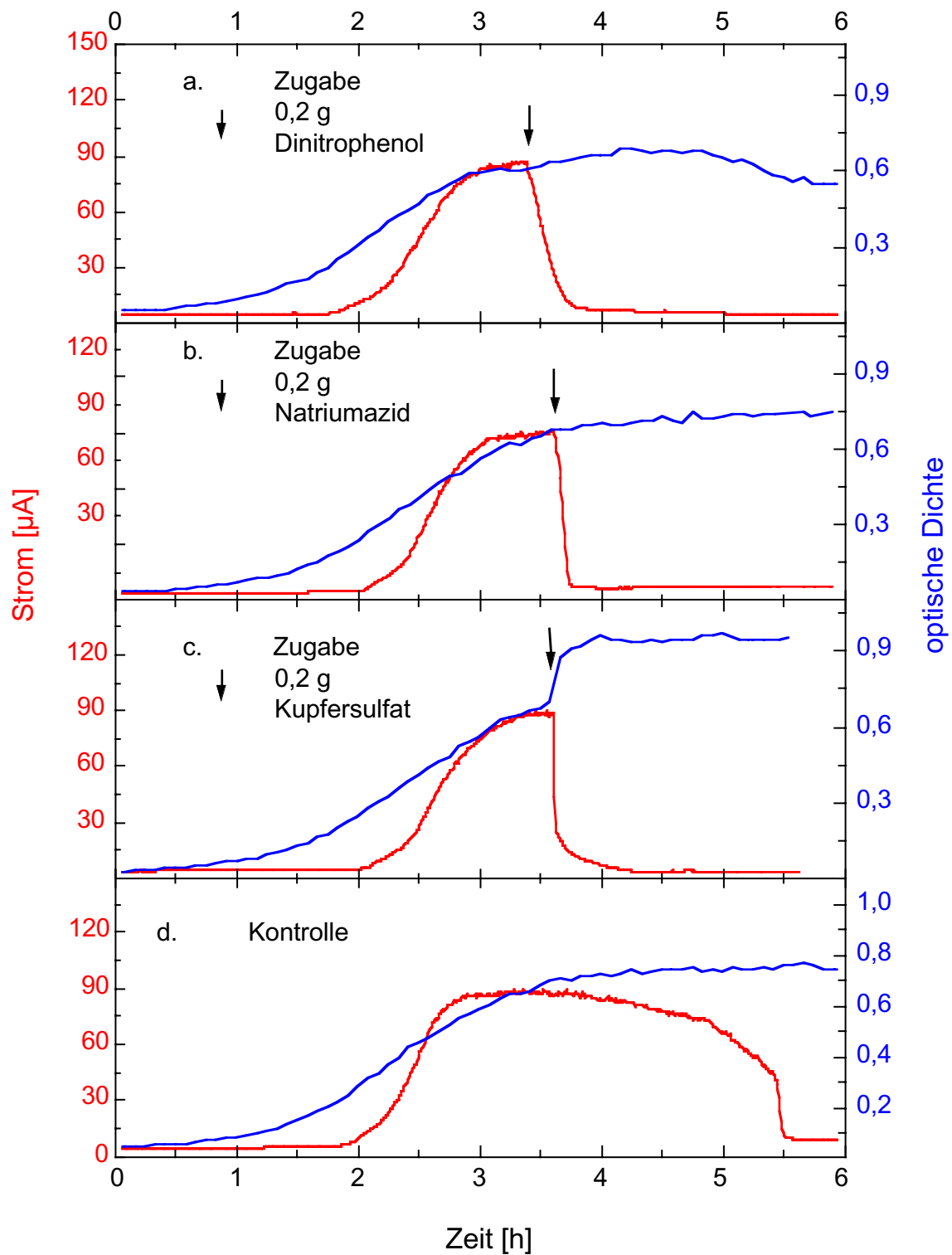


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der optischen Dichte bei 600 nm bei Zugabe von 0,2 g 2,4-Dinitrophenol (a.), 0,2 g Natriumazid (b.) und 0,2 g Kupfersulfat (c.) während einer *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium mit einer Glucosekonzentration von 5 g/l und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM bei 37°C (d. diente als Negativkontrolle)

Mit dem fortschreitenden mikrobiellen Wachstum begann das Stromsignal auf einen Wert von ca. 89 μA zu steigen und blieb dann annähernd konstant. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Zugabe der Stoffwechselgifte. Dies führte zum sofortigen Absterben der Mikroorganismen und daraus folgend zu einem schnellen Absinken auf das Basisstromsignal.

Die Werte der optischen Dichte begannen auch hier früher als das Stromsignal der Biobrennstoffzelle zu steigen. Nach der Zugabe des 2,4-Dinitrophenols und des Natriumazids blieben sie annähernd konstant. Dagegen steigen die Werte bei der Zugabe von Kupfersulfat. Erst nach einiger Zeit wurde die optische Dichte ebenfalls konstant.

Im Kontrollversuch ist im Stromsignal ein vierphasiges Wachstum zu erkennen (Abb. 24, d.). In der log-Phase stieg der Strom und blieb dann annähernd konstant, bis Substratmangel oder entstehende Produkte zu einer Hemmung des Wachstums führten. Bedingt dadurch kam es zu einem Absinken des Stromsignals bis auf das Basisstromsignal.

Der Vergleich der Versuche, bei denen 2,4-Dinitrophenol, Natriumazid bzw. Kupfersulfat zugegeben wurde, mit dem Kontrollversuch zeigt den Unterschied zwischen der sofortigen Abnahme der Stoffwechselaktivität aufgrund der Zugabe von Stoffwechselgiften (Abb. 24, a., b., c.) und dem allmählichen Absinken durch Substratmangel oder Produkthemmung (Abb. 24, d.). Außerdem ist es mit der Biobrennstoffzelle eindeutiger und schneller möglich, den Zeitpunkt des Absinkens der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen zu bestimmen, als dies durch die optische Dichte möglich ist. So bietet sich die Biobrennstoffzelle für Toxizitätstests an.

4.4 Kontrolle des Fermentationsverlaufs mit der Biobrennstoffzelle

4.4.1 Diskontinuierliche Fermentationskontrolle mit der Biobrennstoffzelle

Um die Biobrennstoffzelle auch für Fermentationen einsetzen zu können, bei denen das Produkt der Fermentation, wie z. B. Bier, Wein oder Antibiotika, im Vordergrund steht, ist es wichtig, daß der Fermentationslösung außer den Medienbestandteilen keine Substanzen, wie Mediatoren, zugegeben werden müssen.

Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem der Mediator erst nach der Probenahme zudosiert wird (Abb. 9). Anschließend wurde die Probe in eine Biobrennstoffzelle eingespeist, der Verlauf des Stromsignals gemessen und danach die Probe verworfen.

Dazu wurde eine *E. coli*-Kultivierung in einem 40-l-Fermenter mit 25 l Vollmedium für *E. coli* (s. Kap. 7.2.1.1) bei 37°C durchgeführt. Der Versuchsaufbau und die Durchführung erfolgten wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben.

Der laufenden Fermentation wurde im Abstand von 15 min 10 ml Probe entnommen und jeweils mit 10 ml Mediatorlösung (1 mM) versetzt. Daraus resultiert eine Endkonzentration des Mediators von 0,5 mM (s. Kap. 7.3). Diese höhere Konzentration erhöht die Sensitivität des Systems durch eine Verstärkung des Stromsignals. In den Versuchen ist die möglicherweise wachstumshemmende Wirkung des Mediators bei einer 0,5 mM Konzentration auf Grund der nur 15 minütigen Meßdauer ohne Bedeutung. Außerdem steht nur die momentane Aktivität und nicht das weitere Wachstum der Mikroorganismen im Vordergrund.

Durch diese Art der Probenahme entstehen 0,2 l Abfall pro Stunde, bestehend aus Fermentations- und Mediatorlösung.

Für die Fermentation wichtige Größen wie Trübung, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Abgas wurden kontinuierlich registriert. Außerdem erfolgte eine kontinuierliche Kontrolle des Sauerstoffgehaltes im Medium sowie des pH-Wertes.

Das Stromsignal wurde über den gesamten Fermentationsverlauf diskontinuierlich erfaßt und aufgezeichnet. Daraus ergibt sich für jede Probenahme eine Einzelkurve. Diese sind dann aneinandergereiht dargestellt (Abb. 25, Abb. 26).

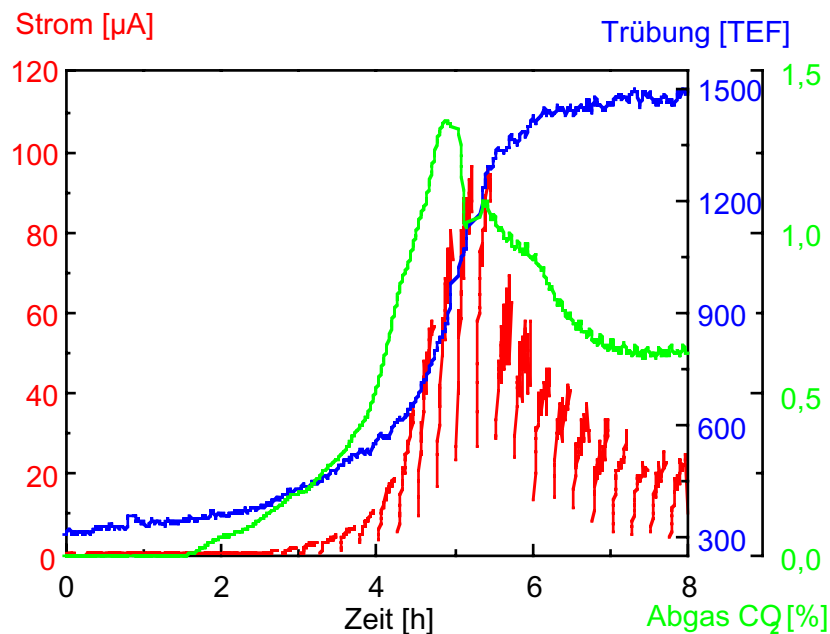


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Trübung und des Kohlendioxidgehalts in der Abluft während einer aeroben *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium mit einer Glucosekonzentration von 5,0 g/l und einer Mediatorendkonzentration von 0,5 mM bei 37°C

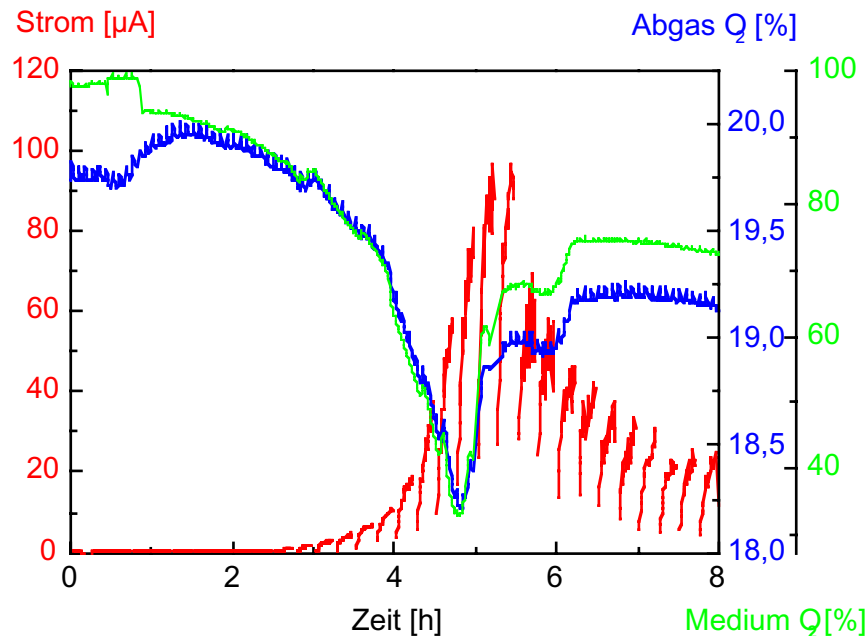


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf des Stroms, des Sauerstoffanteils in der Abluft und der Sauerstoffsättigung in der Fermentationslösung während einer aeroben *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium mit einer Glucosekonzentration von 5,0 g/l und einer Mediatorendkonzentration von 0,5 mM bei 37°C

Nach einer lag-Phase ging das Wachstum in die exponentielle Phase über. Damit ging auch ein Anstieg der Peakmaxima des Stroms der einzelnen Proben einher. Die sich aus den Einzelkurven ergebenden maximalen Stromsignale stiegen auf einen Maximalwert an, um danach sofort wieder abzufallen. Die durch die Peakmaxima beschriebene Kurve zeigt den aus der kontinuierlichen Meßwerterfassung bekannten Verlauf (Abb. 19). Nach 6,2 h erreichten die Signale der Trübungssonde mit 1500 TEF ihr Maximum. Den Maximalwerten der erhaltenen Peaks des Stromsignals ist zu entnehmen, daß nach 5,2 h mit 100 μA der höchste Wert erreicht wurde. Die Stromkurve nahm nach anfänglichem schnellem Anstieg mit Erreichen des Maximums einen kontinuierlich fallenden Verlauf.

Der Verlauf der Trübung (Abb. 25) zeigte eine starke Streuung der Meßwerte durch eingetragene Luftblasen im Medium.

Durch Nachregelung der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate sowie des pH-Wertes in der Anfangsphase der Fermentation kam es zu Schwankungen der

erhaltenen Stromsignale. Aus diesem Grunde wurden die ersten 1,5 h in den nachfolgenden Beschreibungen nicht berücksichtigt.

Eine Zunahme des Kohlendioxidanteils im Abgas (Abb. 25) wurde gegen Ende der lag-Phase sichtbar und verstärkte sich während der exponentiellen Phase. In dieser Phase, d. h. nach 5,0 h, hatte er mit 1,38 % seinen größten Wert. Im weiteren Versuchsverlauf fiel er ab, um mit Erreichen der stationären Phase einen konstanten Wert anzunehmen.

Der Sauerstoffanteil im Abgas (Abb. 26) war anfangs konstant. Mit fortschreitendem Wachstum der Mikroorganismen nahm er ab. Dieser Effekt verstärkte sich mit Beginn der exponentiellen Phase. Nach 5 h war mit 18,2 % das Minimum erreicht. In der Übergangsphase kam es zu einem Anstieg des Sauerstoffanteils. Mit Beginn der stationären Phase war dieser dann konstant.

Ebenso wie der Sauerstoffanteil im Abgas verhielt sich auch die Sauerstoffsättigung des Mediums (Abb. 26), da beide ursächlich verknüpft sind.

Der Versuch zeigt, daß eine diskontinuierliche Fermentationskontrolle mit der Biobrennstoffzelle möglich ist. Sie ist ein Weg, das Wachstum von Mikroorganismen während mediatorfreier Fermentationen zu überwachen. Der mit *E. coli* durchgeführte Versuch zeigt das sehr deutlich.

Dabei handelt es sich um eine quasi-online-Überwachung, da die Proben dem Fermenter nur alle 15 min entnommen werden, und deshalb erst mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 10 min Auskunft über den Aktivitätszustand der Mikroorganismen gegeben werden kann.

4.4.2 Kontinuierliche Fermentationskontrolle mit der Biobrennstoffzelle

Erste Hinweise, daß es mit der Biobrennstoffzelle möglich sein könnte, mikrobielle Aktivität auch ohne die Zugabe von Mediator zu beobachten, zeigten sich in Kapitel 4.2.2. Deshalb sollte nun versucht werden, aerobe und anaerobe Fermentationen kontinuierlich und ohne Mediator mit der Biobrennstoffzelle zu überwachen.

Dazu wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem dem Fermenter kontinuierlich Kulturbrühe entnommen wird. Diese durchströmt dann die Biobrennstoffzelle und wird danach in den Fermenter zurückgeführt (Abb. 10).

Die aeroben und anaeroben *E. coli*-Kultivierungen erfolgten im 40-l-Fermenter mit 25 l Vollmedium (s. Kap. 7.2.1.1) bei 37°C. Das Medium hatte einen pH-Wert von 7,5. Die Versuche wurden mit 50 ml Vorkultur angeimpft (s. Kap. 3.1.1).

Für die anaerobe *S. cerevisiae*-Kultivierung (Siha-Aktiv Hefe 3, s. Kap. 3.1.2) wurde 25 l klarer Apfelsaft aus Konzentrat der Handelskette 'Plus' (s. Kap. 7.2.2.4) als

Medium verwendet. Das Animpfen erfolgte durch Zugabe von 7,5 g Siha-Aktiv Hefe 3 (s. Kap. 3.1.2). Die Temperatur wurde konstant bei 25°C gehalten.

In der industriellen Weinproduktion erfolgt unter Normalbedingungen weder Rührung noch Begasung. Um sich diesen Bedingungen zu nähern, wurde nur mit 100 U/min gerührt.

In den aeroben Versuchen wurde mit 20 l/min Druckluft und in den anaeroben mit 5 l/min Stickstoff begast. Der Versuchsaufbau und die Durchführung erfolgten wie in Kapitel 3.2.3.2 für den 40-l-Fermenter beschrieben.

Für die Fermentation wichtige Größen wie Trübung, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Abgas wurden registriert. Außerdem erfolgte eine Kontrolle des Sauerstoffgehaltes im Medium sowie des pH-Wertes.

Das Stromsignal wurde über den gesamten Fermentationsverlauf kontinuierlich erfaßt und aufgezeichnet (s. Kap. 3.2.2).

Kontrolle einer aeroben Fermentation von *E. coli* ohne Zugabe von HNQ

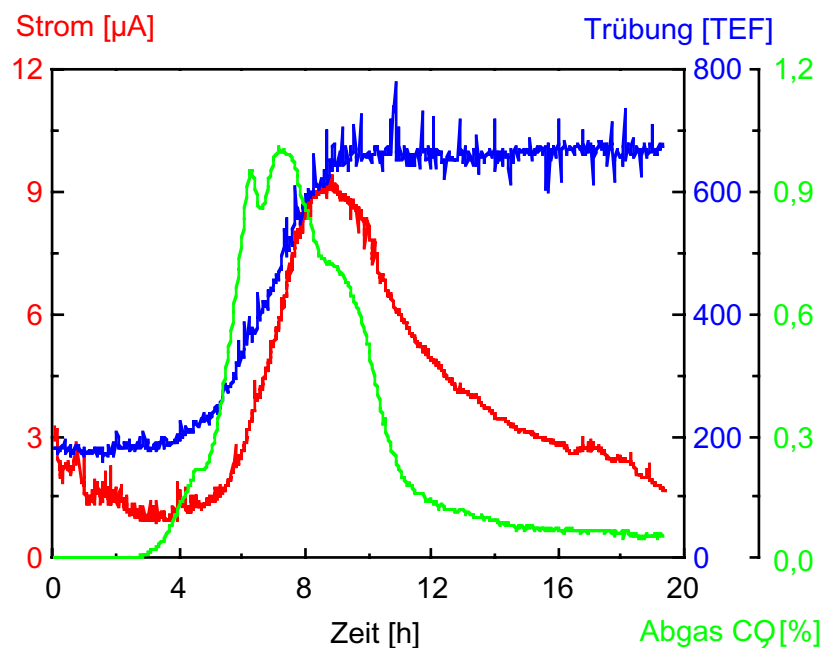


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Trübung und des Kohlendioxidanteils in der Abluft während einer aeroben *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium bei 37°C

In den ersten 3 h des Versuchs sank das Stromsignal der Biobrennstoffzelle (Abb. 27). Danach begann es zu steigen, um dann nach 8,8 h seinen Maximalwert von 9 μ A zu erreichen. Danach sank es wieder bis zum Versuchsende.

In den Meßwerten der Trübung (Abb. 27) zeigt sich eine starke Streuung durch eingetragene Luftblasen im Medium. Nach einer lag-Phase ging die

Wachstumskurve in die exponentielle Phase über, die nach ca. 9 h mit 660 TEF ihr Maximum erreichte.

Eine Zunahme des Kohlendioxidanteils im Abgas (Abb. 27) wurde erst nach 3 h, am Ende der lag-Phase, sichtbar. Nach 7,3 h hatte der Kohlendioxidanteil mit 0,99 % seinen größten Wert. Danach fiel er ab, um mit Erreichen der stationären Phase einen annähernd konstanten Wert anzunehmen.

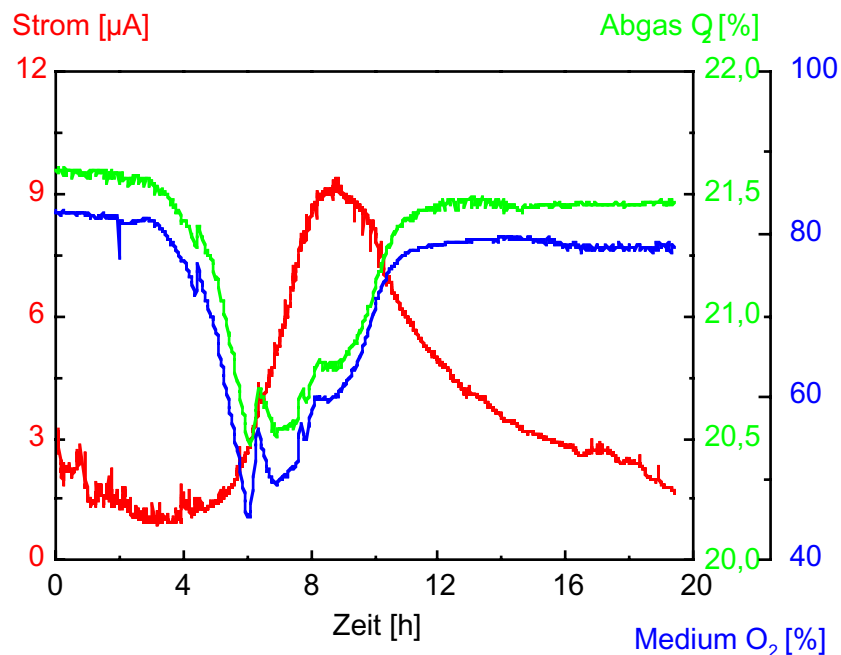


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf des Stroms, des Sauerstoffanteils in der Abluft und der Sauerstoffsättigung in der Fermentationslösung während einer aeroben *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium bei 37°C

Der Sauerstoffanteil im Abgas (Abb. 28) nahm mit fortschreitendem Wachstum der Mikroorganismen ab. Dieser Effekt verstärkte sich mit Beginn der exponentiellen Phase. Bereits nach 6,1 h war mit 20,5 % das Minimum erreicht. Danach stieg der Sauerstoffanteil, um nach 11,4 h bei ca. 21,5 % konstant zu werden.

Ebenso verhielt sich die Sauerstoffsättigung des Mediums (Abb. 28).

Im Kohlendioxid- und im Sauerstoffanteil im Abgas sowie in der Sauerstoffsättigung im Medium gibt es nach dem Minimalwert nach ca. 6 h eine Schwankung, deren Ursache nicht geklärt ist.

Wie bereits in früheren Versuchen wird bei dieser aeroben Fermentation eine Ähnlichkeit zwischen dem Stromsignal und der Trübung der Fermentationslösung sichtbar. Im Gegensatz zur Trübung läßt jedoch das Stromsignal gut erkennen, daß die Aktivität der Mikroorganismen mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wieder abnimmt.

Deutliche Analogien zeigen sich auch im Verlauf des Stromsignals und des entstehenden Kohlendioxids im Abgas. Allerdings beginnt das Stromsignal erst ca. 1,5 h später zu steigen. Ursache dafür könnte eine Oxidation des Elektronendonors sein, die durch Sauerstoff verursacht wird. Dies macht sich aber nur beim beginnenden Wachstum der Mikroorganismen bemerkbar.

Der Versuch zeigt, daß eine kontinuierliche Fermentationskontrolle der aeroben *E. coli*-Kultivierung mit der Biobrennstoffzelle auch ohne Mediator möglich ist.

Kontrolle einer anaeroben Fermentation von *E. coli* ohne Zugabe von HNQ

Bei anaeroben Fermentationen stehen häufig zur Prozeßbeschreibung genutzte Prozeßparameter wie z. B. die Sauerstoffsättigung im Medium nicht zur Verfügung. Interessant wäre deshalb, wenn mit der Biobrennstoffzelle auch die Überwachung einer anaeroben *E. coli*-Kultivierung möglich wäre.

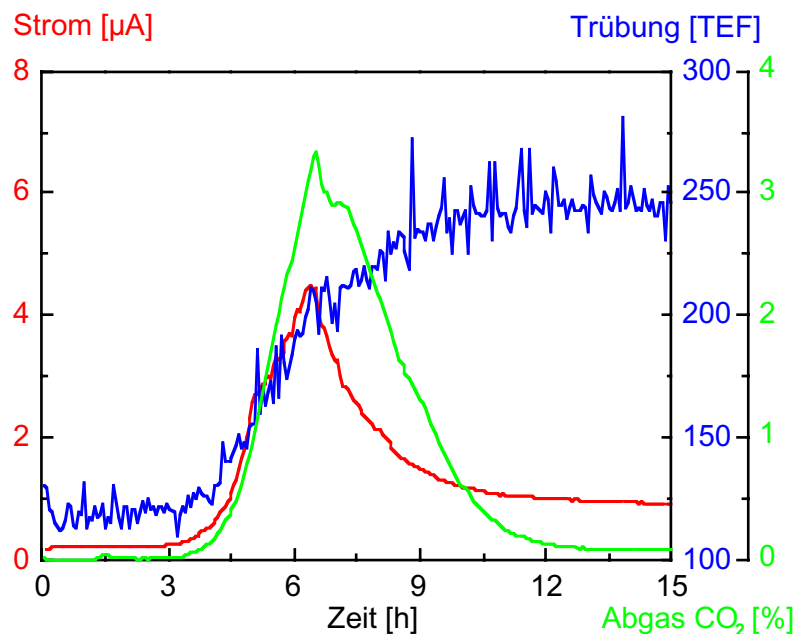


Abb. 29 Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Trübung und des Kohlendioxidanteils in der Abluft während einer anaeroben *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium bei 37°C

In den ersten 4 h blieb das Stromsignal der Biobrennstoffzelle (Abb. 29) konstant. Danach begann es, steil anzusteigen und erreichte 6,5 h nach Versuchsbeginn mit 4,5 μA seinen Maximalwert und fiel in den darauffolgenden 6 h bis auf das Basissignal ab.

Die Trübung begann ebenfalls nach 4 h zuzunehmen und erreichte nach etwa 10 h einen Wert von 250 TEF, auf dem er bis zum Versuchsende annähernd konstant blieb.

Das Signal des Kohlendioxids im Abgas verlief weitgehend analog zum Stromsignal der Biobrennstoffzelle.

Im Gegensatz zum kontinuierlichen aeroben Versuch begannen beim anaeroben Versuch das Stromsignal und der Kohlendioxidanteil etwa zeitgleich anzusteigen. Dies spricht für die beim aeroben Versuch gemachte Aussage, daß der Elektronendonator möglicherweise durch den Sauerstoff oxidiert wird.

Die Höhe des Stromsignals beim anaeroben Versuch war mit einem maximalen Stromsignal von 4,5 μA nur halb so groß wie beim aeroben mit 9 μA .

Die Meßergebnisse zeigen, daß auch die kontinuierliche Kontrolle einer anaeroben *E. coli*-Kultivierung mit der Biobrennstoffzelle möglich ist.

Kontrolle einer anaeroben Fermentation von *E. coli*; Anode mit einem Dialyseschlauch ummantelt

Weitgehend ungeklärt ist, welcher Elektronendonator das Stromsignal der Biobrennstoffzelle verursacht. Zum einen wird in der Literatur davon ausgegangen, daß elektroaktive Substanzen, die an der Anode oxidiert werden, die Ursache sind (Aston und Turner, 1984). Andererseits gibt es Hinweise (Matsunaga et al., 1979), daß ein direkter Transfer der Elektronen von den Mikroorganismen zur Anode stattfindet. Um dazu Auskunft zu erhalten, wurde die Anode mit einem Dialyseschlauch ummantelt. Der Versuch wurde analog zum vorhergehenden Experiment durchgeführt.

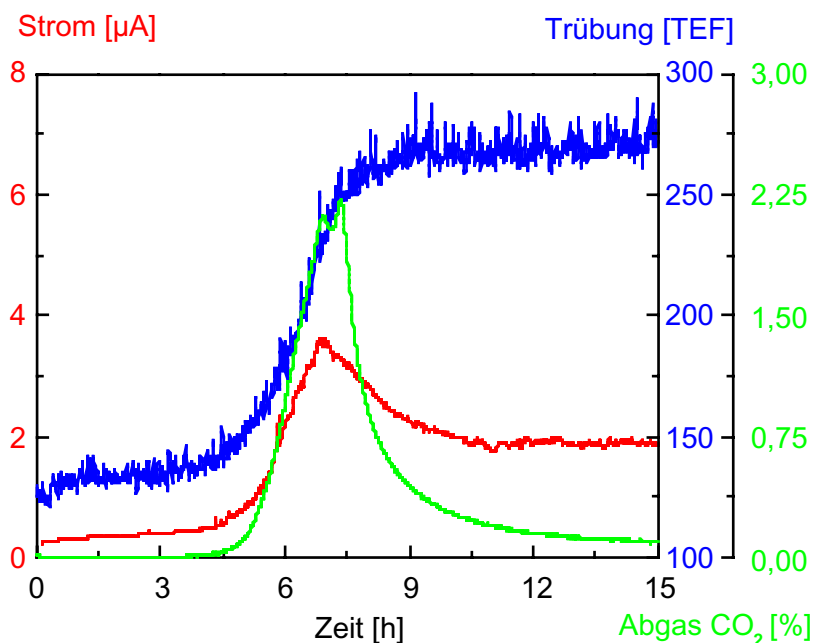


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Trübung und des Kohlendioxidanteils in der Abluft während einer anaeroben *E. coli*-Kultivierung in Vollmedium; Abgrenzung der Fermentationslösung von der Anode durch einen Dialyseschlauch (nominelle Ausschlußgrenze für Moleküle größer 10 kDa)

Die Verläufe der Meßsignale (Abb. 30) sind denen des vorhergehenden Versuchs (Abb. 29) sehr ähnlich. Die ersten 4,5 h blieb das Stromsignal der Biobrennstoffzelle (Abb. 30) konstant. Anschließend begann es steil anzusteigen und erreichte 7 h nach Versuchsbeginn mit 3,3 μA sein Maximum. In den darauffolgenden 6 h fiel es bis auf 1,7 μA ab.

Die Trübung begann nach 4,5 h zuzunehmen und erreichte nach etwa 9 h ca. 270 TEF, wo der Wert bis zum Versuchsende blieb.

Die Werte der Kohlendioxidkonzentration im Abgas verliefen weitgehend analog zum Signal der Biobrennstoffzelle.

Das Stromsignal im Versuch mit Dialyseschlauch ist mit 3,3 μA niedriger als im Versuch ohne Dialyseschlauch (4,5 μA).

Eine Ursache für die Verringerung könnte sein, daß das Einfügen des Dialyseschlauchs die Strömungsverhältnisse vor der Platinanode verändert und sich dadurch die Diffusionsgrenzschicht vergrößert.

Der Dialyseschlauch hat eine nominelle Ausschlußgrenze für Moleküle größer 10 kDa. Dadurch ist kein direkter Kontakt zwischen den Mikroorganismen und der Elektrodenoberfläche der Anode möglich. Dieser wäre jedoch für die direkte Übertragung von Elektronen von den Mikroorganismen zur Elektrode notwendig. So kann anhand der ähnlichen Stromsignale bei den Versuchen mit und ohne Dialyseschlauch gezeigt werden, daß nicht die Mikroorganismen allein, sondern vor allem elektroaktive Substanzen, die den Dialyseschlauch passieren können, die Ursache für das Stromsignal sein müssen.

Kontrolle einer anaeroben *S. cerevisiae*-Fermentation ohne Zugabe von HNQ

Die Fermentationen in der industriellen Weinproduktion sind anaerobe *S. cerevisiae*-Fermentationen. Der folgende Versuch im 40-I-Fermenter soll die Anwendbarkeit der Biobrennstoffzelle für die Überwachung einer solchen Kultivierung zeigen.

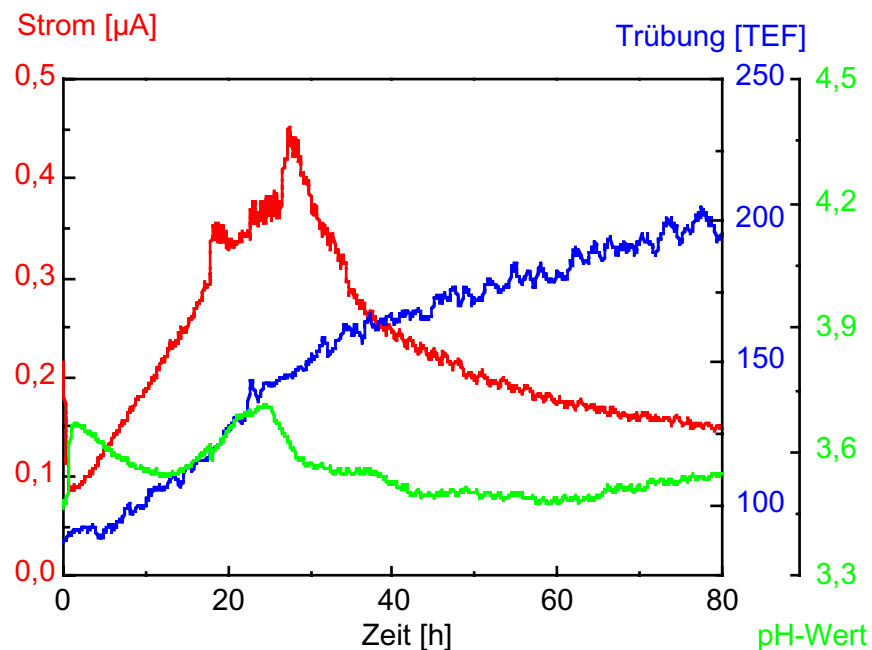


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Trübung und des pH-Wertes während einer anaeroben *S. cerevisiae*-Kultivierung (Siha-Aktiv Hefe 3) in klarem Apfelsaft

Vor dem Animpfen des Fermenters wurde gewartet, bis das Stromsignal konstant war. Nach der Zugabe der Mikroorganismen begann es sofort anzusteigen (Abb. 31). In der Zeit von 17,5 h bis 35 h kam es trotz der vorgeschalteten Blasenfalle zum Einströmen von Kohlendioxidblasen in die Biobrennstoffzelle und dadurch zu einem Schwanken des Stromsignals. Der Maximalwert der Stromwerte wurde nach 28 h mit 0,44 μA erreicht. Danach fiel das Signal bis zum Versuchsende kontinuierlich ab.

Die Trübung (Abb. 31) kann nur begrenzt Auskunft über die aktuelle Anzahl der Mikroorganismen geben, da nur sehr langsam gerührt wurde und es keine homogene Verteilung der Mikroorganismen im Fermenter gab. Trotzdem läßt sich die sofort mit Versuchsbeginn zunehmende Menge an Biomasse deutlich erkennen.

Die Änderung des pH-Wertes (Abb. 31) war während des Versuchs minimal. Er bewegte sich zwischen 3,46 und 3,72.

Ebenfalls mit Versuchsbeginn setzte eine registrierbare Kohlendioxidproduktion ein. Nach 17 h bis zum Versuchsende waren 100% des aus dem Fermenter austretenden Gases Kohlendioxid (Ergebnisse nicht gezeigt). Deshalb kann sie bei anaeroben Prozessen im Gegensatz zu den aeroben Fermentationen nicht als Parameter für die mikrobielle Aktivität genutzt werden. Eine sinnvolle Meßgröße zur

Prozeßbeschreibung wäre bei vorhandener Meßtechnik die Messung der entstehenden Menge an Kohlendioxid.

Es konnte auch in diesem Versuch die Eignung der Biobrennstoffzelle zur Überwachung von anaeroben Fermentationen gezeigt werden. Deutlich sind in diesem Prozeß die Probleme mit der üblicherweise eingesetzten Meßtechnik zu erkennen. Die Biobrennstoffzelle ermöglicht ohne großen Aufwand, den Zeitpunkt zu erkennen, an dem die Aktivität der Hefezellen zu sinken beginnt. Wichtig ist lediglich, eine genügend große Blasenfalle der Biobrennstoffzelle vorzuschalten, um das Eindringen von Gasblasen zu verhindern.

4.5 Charakterisierung des Stromsignals der Biobrennstoffzelle anhand verschiedener Prozeßparameter

4.5.1 Darstellung verschiedener Prozeßparameter während einer *Escherichia coli*-Kultivierung

Die Biobrennstoffzelle soll als mikrobieller Aktivitätssensor eingesetzt werden und eine Alternative zu den zur Zeit eingesetzten, teilweise zeitintensiven Meßmethoden bilden. Deshalb soll das Stromsignal der Biobrennstoffzelle weiter charakterisiert werden. Dazu wurde eine Fermentation mit *E. coli* durchgeführt, bei der verschiedene für das Wachstum der Mikroorganismen relevante Parameter mit Hilfe der zugehörigen Meßmethoden erfaßt und mit dem Stromsignal der Biobrennstoffzelle verglichen wurden.

Diese Prozeßparameter sind:

- Biomasse (s. Kap. 7.1.4)
- Glucosekonzentration (s. Kap. 7.1.1)
- Redoxpotential (s. Kap. 7.1.11, 3.2.3.2)
- pH-Wert (s. Kap. 3.2.3.2)
- Sauerstoffkonzentration im Medium (s. Kap. 3.2.3.2).

250 ml Mineralmedium mit einer Ausgangskonzentration von 1 g/l Glucose und einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM wurden mit 5 ml *E. coli*-Vorkultur inokuliert (s. Kap. 3.1.1).

Der Versuch erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.2 für das 250-ml-Fermentationsgefäß beschrieben.

Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen und daraus die Biomasse berechnet (s. Kap. 7.1.4). Die Messungen des Redoxpotentials, des pH-Wertes und des Sauerstoffgehaltes erfolgten im Fermentationsgefäß. Die Glucose wurde offline enzymatisch bestimmt.

Das Stromsignal der Biobrennstoffzelle wurde kontinuierlich erfaßt (s. Kap. 3.2.2).

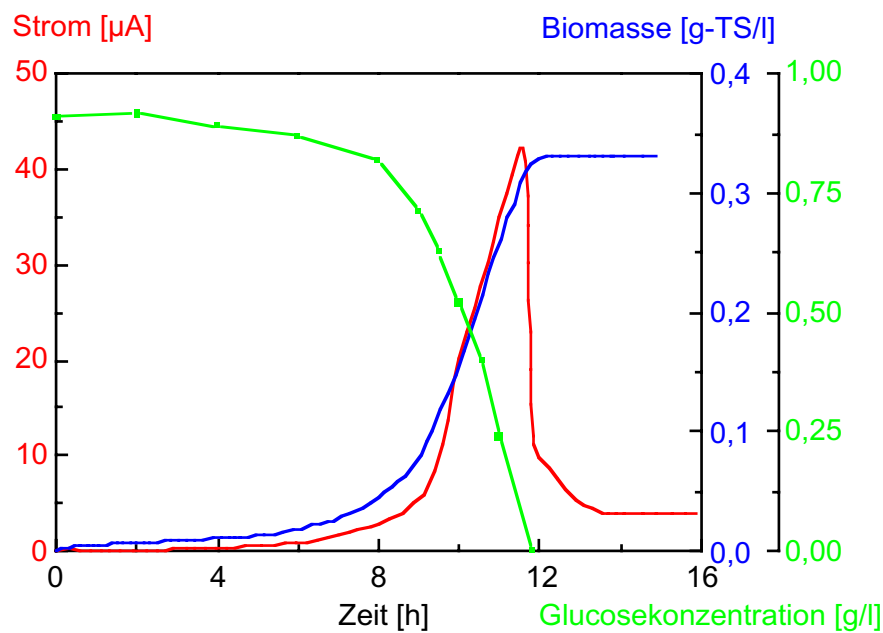


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Konzentration der Biomasse und der Glucose während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium mit einer Anfangskonzentration der Glucose von 1 g/l und 0,2 mM Mediator HNQ bei 37°C

Eine Zunahme des Stromsignals der Biobrennstoffzelle (Abb. 32) war erst nach 6 h zu beobachten. Der Strom erreichte nach 11,8 h mit 42 μ A seinen Maximalwert und fiel anschließend annähernd auf das Basisstromsignal ab.

Die Konzentration der Biomasse begann ebenfalls nach ca. 6 h zu steigen. Nach 12 h stagnierte das mikrobielle Wachstum, und die Konzentration der Biomasse erreichte mit 0,34 g-TS/l ihren größten Wert.

Der Vergleich des Verlaufs des Stromsignals der Biobrennstoffzelle mit dem der Biomassekonzentration zeigt, daß das Stromsignal annähernd so lange steigt, wie die Biomasse zunimmt. Wenn das Signal der Biomassekonzentration konstant wird, sinkt das Stromsignal. Offensichtlich gibt es einen proportionalen Zusammenhang zwischen Biomasse und Stromsignal nur für den Bereich, in dem die Biomassekonzentration zunimmt.

Mit sinkender Glucosekonzentration war ein steigendes Stromsignal zu beobachten. Je schneller die Glucose verbraucht wurde, um so stärker stieg das Stromsignal. Als die Glucose nach 11,7 h verbraucht war, sank auch das Stromsignal der Biobrennstoffzelle.

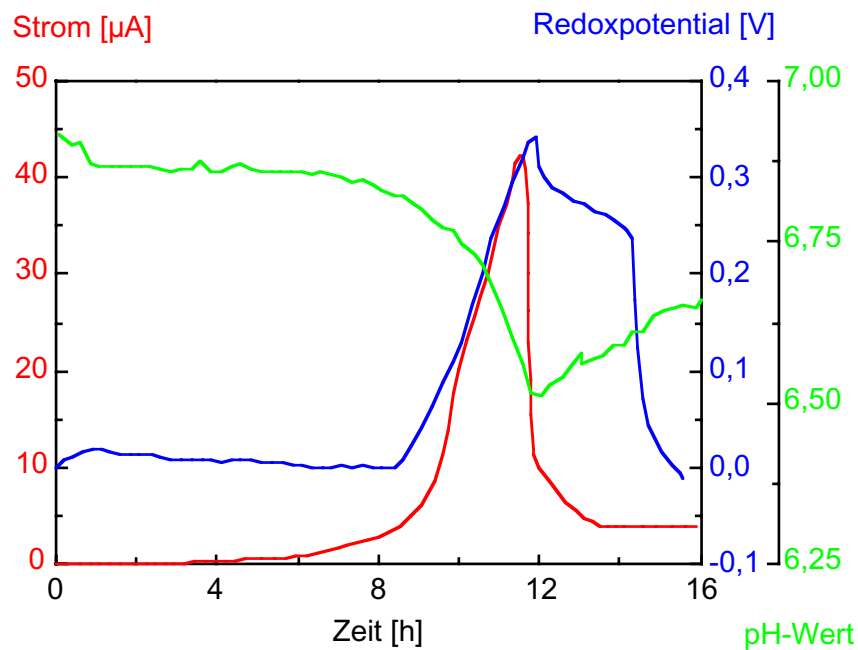


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf des Stroms, des Redoxpotentials und des pH-Wertes während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium mit einer Anfangskonzentration der Glucose von 1 g/l und 0,2 mM Mediator HNQ bei 37°C

Das Redoxpotential (Abb. 33) begann erst nach ca. 8 h zu steigen und erreichte nach ca. 12 h mit 0,34 mV sein Maximum. Danach fiel es kurzzeitig stark ab, um dann über 2 h verlangsamt und danach wieder stark abzufallen.

Das Redoxpotential begann etwa gleichzeitig wie das Stromsignal zu steigen. Nach einem etwa zeitgleichen Maximum begannen beide Signale zu fallen. Danach unterscheiden sich beide Signale, das Stromsignal sinkt kontinuierlich ab, wogegen das Redoxpotential nur minimal absinkt und dann für 2 h auf einem Plateau verbleibt, bevor es absinkt.

Der pH-Wert veränderte sich nur minimal im Bereich zwischen 6,5-6,8.

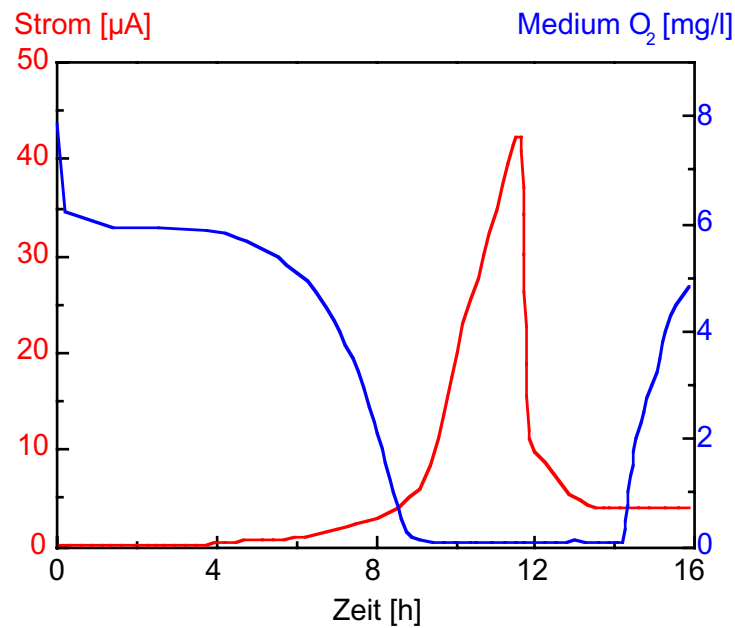


Abb. 34: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der Sauerstoffkonzentration im Fermentationsmedium während einer *E. coli*-Kultivierung in Mineralmedium mit einer Anfangskonzentration der Glucose von 1 g/l und 0,2 mM Mediator HNQ bei 37°C

Zu Beginn der Messung der Sauerstoffkonzentration im Medium (Abb. 34) wurde nach einer Nachregelung der Drehzahl des Rührers und der Begasung eine konstante Konzentration gemessen. Ein verstärktes Biomassewachstum führte zum Absinken der Sauerstoffkonzentration. Erst nach 14 h war wieder ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration zu beobachten. Eine Erhöhung der Begasungsrate im 250-ml-Fermentationsgefäß war aufgrund der daraus resultierenden Schaumbildung, die zu einem Medienaustrag geführt hätte, nicht möglich.

Beim Vergleich der Verläufe der verschiedenen Prozeßparameter mit dem Stromsignal der Biobrennstoffzelle wird deutlich, daß es abschnittsweise Übereinstimmungen gibt, die Aussagen zum Prozeßverlauf ermöglichen.

Die größte Übereinstimmung gibt es zwischen dem Stromsignal und dem Redoxpotential. Das Redoxpotential wird jedoch in der Regel nicht zur Aktivitätsbestimmung genutzt, da es keine Auskunft über die absoluten Konzentrationen von elektroaktiven oxidierten oder reduzierten Substanzen gibt, sondern nur deren Verhältnis widerspiegelt (s. Kap. 7.1.11). Das Stromsignal der Biobrennstoffzelle dagegen ist eine konzentrationsabhängige Größe, die eine eindeutige Auskunft über die Menge an reduzierten elektroaktiven Substanzen gibt und damit den mikrobiellen Stoffwechsel charakterisiert.

Bei der gemeinsamen Betrachtung aller Prozeßgrößen, ergibt sich für das Stromsignal der Biobrennstoffzelle, daß es eine Funktion der Anzahl der lebenden Zellen und ihrer Aktivität ist.

4.5.2 Darstellung verschiedener Prozeßparameter während einer *Saccharomyces cerevisiae*-Kultivierung

Analog zu dem Versuch mit *E. coli* (s. Kap. 4.5.1) wurde bei einer *S. cerevisiae*-Kultivierung (*S. cerevisiae* H 620) verfahren, um auch bei diesem Mikroorganismus den Verlauf des Stromsignals der Biobrennstoffzelle mit den Verläufen verschiedener für das Mikroorganismenwachstum relevanter Parameter zu vergleichen.

Diese sind

- optische Dichte bei 590 nm (s. Kap. 7.1.4)
- Kohlendioxidkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)
- Sauerstoffkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)
- Sauerstoffkonzentration im Medium (s. Kap. 7.1.9)
- NAD(P)H-abhängige und tryptophanabhängige Fluoreszenz mit Bioview (s. Kap. 7.1.13)

Die Biobrennstoffzelle wurde in eine an der Universität Hannover, von Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie, durchgeführte Fermentation integriert (Marose, 1999). Der Versuch erfolgte anders als der mit *E. coli* (s. Kap. 4.5.1) ohne Zugabe von Mediator. Es wurden 1,5 l Schatzmann-Medium (s. Kap. 7.2.2.5) mit einer Ausgangskonzentration von 30 g/l Glucose eingesetzt. Der pH-Wert wurde konstant auf 4 gehalten. Das Starten des Versuchs erfolgte durch Zugabe von 50 ml Vorkultur (s. Kap. 3.1.2).

Der Versuchsaufbau und die -durchführung erfolgten wie in Kapitel 3.2.3.2 für den 2-l-Fermenter beschrieben.

Die optische Dichte bei 590 nm wurde nach der Biobrennstoffzelle im gleichen Bypass gemessen (Abb. 10).

Im Abgas wurde der Anteil an Kohlendioxid und Sauerstoff bestimmt. Die Messung des Sauerstoffgehaltes des Mediums erfolgte im Fermentationsgefäß. Auch wurde mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie die relative Fluoreszenzintensität gemessen und anschließend Wellenlängenpaare ausgewählt. Für die weiteren Betrachtungen wurde zum einen Fluoreszenzwerte bei der Extension 290 nm und der Emission 350 nm (Ex 290/Em 350 nm) verwendet. Sie können als ein Maß für die in der Fermentationslösung enthaltene Menge an Tryptophan und damit den Proteingehalt betrachtet werden, da in diesem Bereich vor allem Tryptophan fluoresziert. Außerdem wurde die relative Fluoreszenz bei Ex 370/Em 450 nm

gemessen. Sie spiegelt annähernd die Konzentration an NAD(P)H in der Fermentationslösung wider.

Das Stromsignal der Biobrennstoffzelle wurde über den gesamten Versuchsverlauf kontinuierlich erfaßt und aufgezeichnet (s. Kap. 3.2.2).

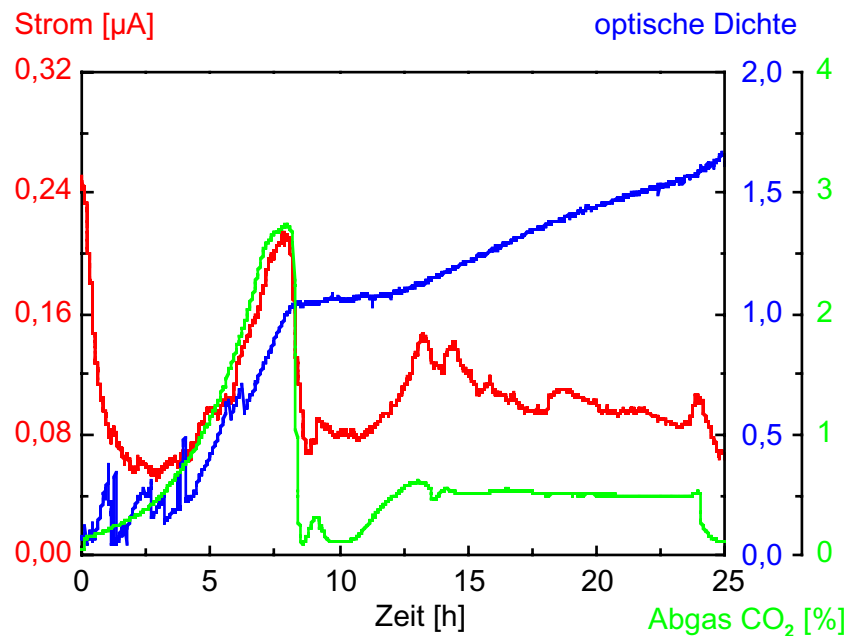


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der optischen Dichte bei 590 nm und der Konzentration des Kohlendioxids im Abgas einer aeroben *S. cerevisiae*-Kultivierung in Schatzmann-Medium mit einer Anfangskonzentration der Glucose von 30 g/l bei 30°C

In den ersten 2,5 h der Strommessung (Abb. 35) sinkt das Stromsignal von 0,25 μA auf 0,06 μA . Dies ist nicht durch die mikrobielle Aktivität, sondern wahrscheinlich durch die Biobrennstoffzelle selbst bedingt.

Danach beginnt, basierend auf dem Verbrauch der Glucose aus dem Medium, der Strom zu steigen und erreicht nach etwa 8 h mit ca. 0,21 μA seinen Maximalwert, um danach sofort wieder abzufallen, da nun die Glucose verbraucht ist (Marose, 1999).

Danach stellt sich der mikrobielle Stoffwechsel auf den Verbrauch einer neuen Kohlenstoffquelle, wahrscheinlich den Verbrauch des Acetats, um. Dadurch kommt es zu einem erneuten kurzen Ansteigen des Stromsignals auf 0,07 μA .

Nach etwa 11 h beginnt der Verbrauch des Ethanols durch die Mikroorganismen, und es folgt ein weiterer Anstieg des Stromsignals auf 0,14 μA . Nach 23 h ist auch das Ethanol verbraucht und das Signal sinkt allmählich auf 0,06 μA .

Die optische Dichte bei 590 nm schwankt in den ersten 7 h prozeßbedingt stark. Trotzdem läßt sich bereits nach 2 h ein Anstieg feststellen. Nach ca. 7 h hat die

optische Dichte einen Wert von 1 erreicht. Danach steigt die optischen Dichte bis zum Versuchsende allmählich an.

Wie auch schon in den Versuchen zur Diauxie (s. Kap. 4.3.3) sichtbar wurde, zeigt das Stromsignal der Biobrennstoffzelle das Absinken der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen beim Substratwechsel, z. B. Glucose-Acetat, Acetat-Ethanol, an. Dagegen bleibt die optische Dichte in diesen Phasen lediglich konstant.

Der Kohlendioxidanteil im Abgas beginnt sofort nach Versuchsbeginn zu steigen und erreicht gleichzeitig mit dem Stromsignal der Biobrennstoffzelle seinen Maximalwert. Sowohl der Acetat- als auch der Ethanolverbrauch spiegeln sich in einer erhöhten Kohlendioxidproduktion wider.

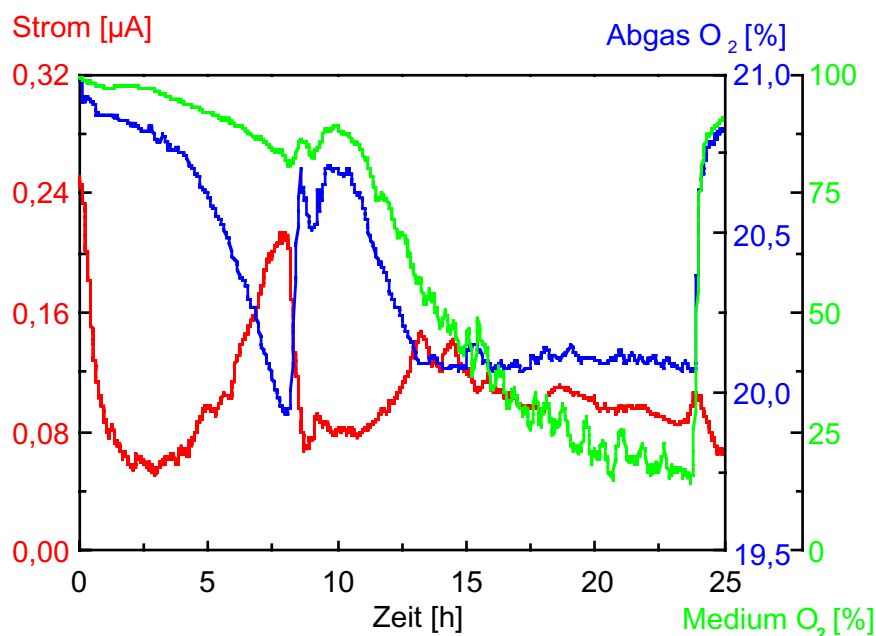


Abb. 36: Zeitlicher Verlauf des Stroms, der Konzentration des Sauerstoffs im Abgas und im Medium während einer aeroben *S. cerevisiae*-Kultivierung in Schatzmann-Medium mit einer Anfangskonzentration der Glucose von 30 g/l bei 30°C

Die Sauerstoffkonzentration im Abgas (Abb. 36) spiegelt genau wie die Kohlendioxidkonzentration deutlich die einzelnen Wachstumsphasen wider. Mit Beginn des Wachstums nehmen die Werte ab. Nach 8 h erreichen sie ihr Minimum, während das Stromsignal der Biobrennstoffzelle zeitgleich sein Maximum erreicht. Nach einem deutlichen Anstieg der Sauerstoffkonzentration folgt ein kurzes erneutes Absinken von ungefähr einer Stunde Dauer. Ein drittes Minimum der Sauerstoffkonzentration tritt etwa 11 h nach Versuchsbeginn auf und endet 12 h später.

Somit entspricht der Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Abgas annähernd einem Spiegelbild des Verlaufs des Stromsignals. Die gleichen Änderungen sind, wenn auch schwächer, in der Konzentration des Sauerstoffs im Medium sichtbar.

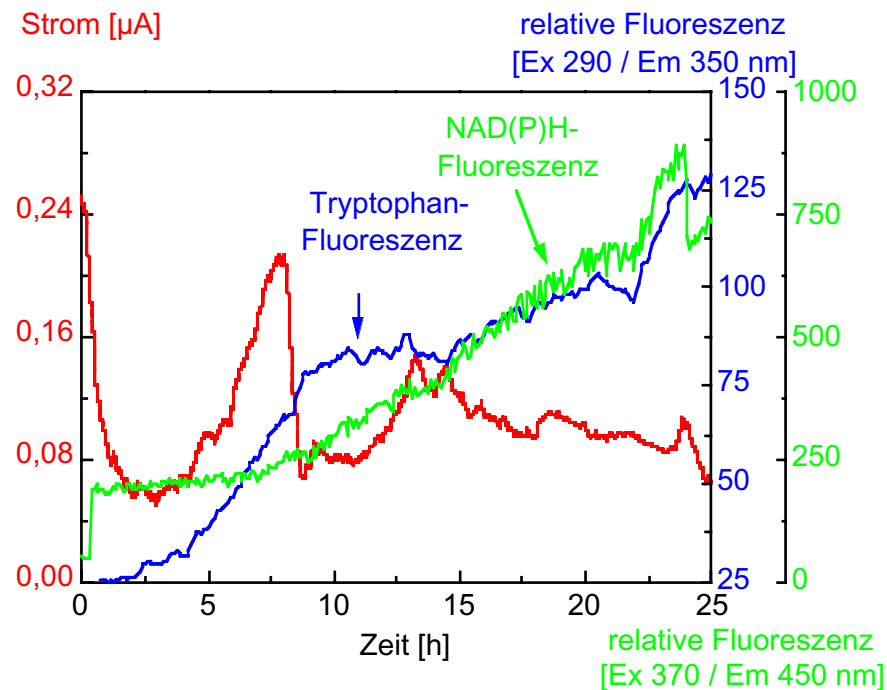


Abb. 37: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der relativen Fluoreszenz bei Ex 290/Em 350 nm (Fluoreszenz des Tryptophans) und bei Ex 370/Em 350 nm (NAD(P)H-Fluoreszenz) während einer aeroben *S. cerevisiae*-Kultivierung in Schatzmann-Medium mit einer Anfangskonzentration der Glucose von 30 g/l bei 30°C

Die Kurve der tryptophanabhängigen Fluoreszenz (Abb. 37) hatte ihren maximalen Anstieg in den ersten 10 h des Versuchs. Danach nahm der Anstieg ab. Etwa 2 h vor Versuchsende kam es zu einer erneuten starken Zunahme.

Die NAD(P)H-abhängige Fluoreszenz steigt, beginnend am ersten Maximalwert des Stromsignals, kontinuierlich bis zum Versuchsende mit annähernd konstanter Steigung.

Die größten Analogien sind zwischen dem Stromsignal und der Konzentration an Kohlendioxid im Abgas und der gespiegelten Darstellung der Konzentration des Sauerstoffs im Abgas zu erkennen. Direkte Korrelationen zur tryptophanabhängigen und zur NAD(P)H-abhängigen Fluoreszenz konnten nicht beobachtet werden.

4.5.3 Darstellung verschiedener Prozeßparameter einer oszillierend wachsenden *Saccharomyces cerevisiae*-Kultur

Um zu den während der kontinuierlichen Fermentation (s. Kap. 4.5.2) gewonnenen Daten zusätzlich Informationen über den mikrobiellen Stoffwechsel zu erhalten und das Signal der Biobrennstoffzelle weiter zu charakterisieren, wurde die in Kapitel 4.5.2 beschriebene kontinuierlich wachsende Kultur durch gezielt eingesetzte Störungen in eine oszillierend wachsende Kultur überführt. Dadurch konnten die Vorteile einer synchron wachsenden Kultur (z. B. alle Zellen sind annähernd im gleichen Stadium der Zellteilung) genutzt werden (s. Kap. 2.2.2).

Erfaßt wurden:

- Kohlendioxidkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)
- Sauerstoffkonzentration im Abgas (s. Kap. 7.1.8)
- NAD(P)H-abhängige und tryptophanabhängige Fluoreszenz mit Bioview (s. Kap. 7.1.13)

Der Respirationskoeffizient wurde aus Gleichung 14 berechnet.

Die optische Dichte bei 590 nm (s. Kap. 7.1.4) wurde im Bypass nach der Biobrennstoffzelle gemessen (Abb. 10). Die stark schwankenden Resultate wurden nicht weiter verwendet, sondern statt dessen die offline ermittelte optische Dichte eingesetzt. Ethanol wurde gaschromatographisch bestimmt (s. Kap. 7.1.3).

Das Stromsignal der Biobrennstoffzelle wurde über den gesamten Versuchsverlauf kontinuierlich erfaßt und aufgezeichnet (s. Kap. 3.2.2).

Die *S. cerevisiae*-Batchkultivierung aus Kapitel 4.5.2 wurde zuerst in eine kontinuierlich und anschließend in eine oszillierend wachsende Kultur überführt.

Die Oszillationen wurden durch eine Erhöhung der Verdünnungsrate von $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ induziert.

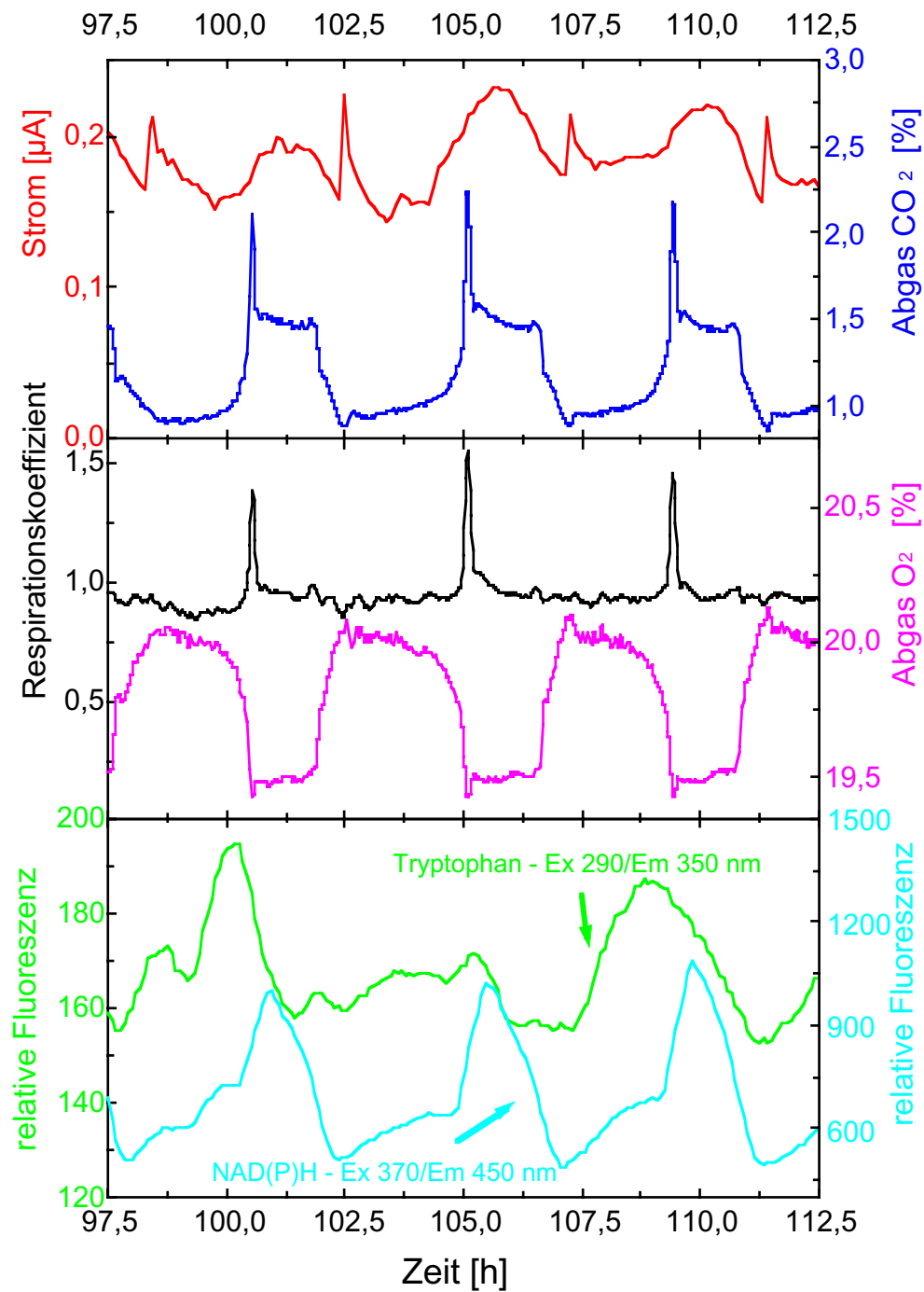


Abb. 38: Strom, Konzentration des Kohlendioxids im Abgas, Respirationskoeffizient, Konzentration des Sauerstoffs im Abgas, relative Fluoreszenz bei Ex 290/Em 350 nm und bei Ex 370/Em 450 nm während einer aeroben kontinuierlich oszillierend wachsenden Synchronkultur von *S. cerevisiae* in Schatzmann-Medium mit einer Konzentration der Glucose im zugeführten Medium von 30 g/l bei 30°C

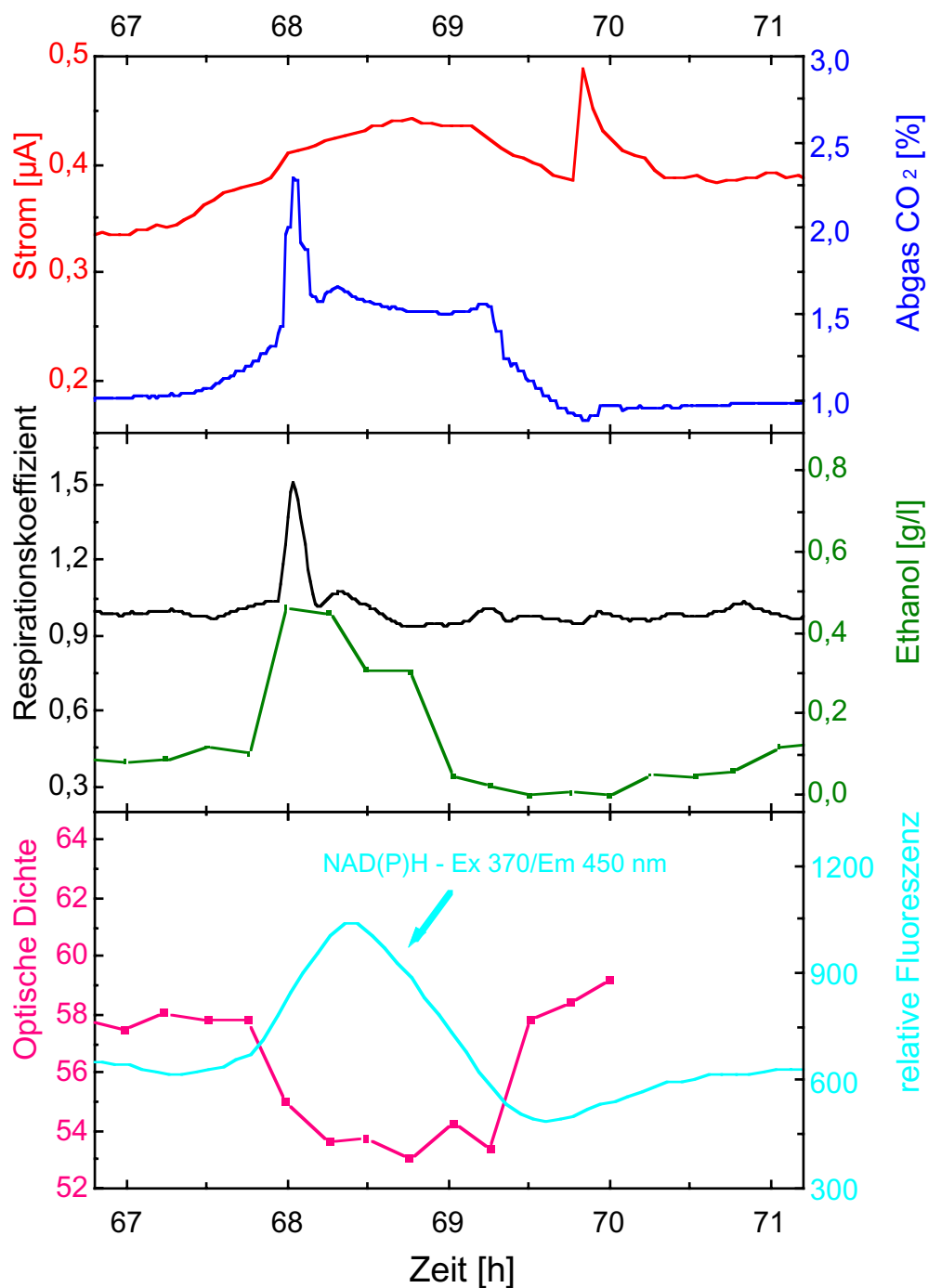


Abb. 39: Strom, Konzentration des Kohlendioxids im Abgas, Respirationskoeffizient, Ethanolkonzentration, optische Dichte bei 590 nm, relative Fluoreszenz bei Ex 370/Em 450 nm während einer Periode einer aeroben kontinuierlich oszillierend wachsenden Synchronkultur von *S. cerevisiae* in Schatzmann-Medium mit einer Konzentration der Glucose im zugeführten Medium von 30 g/l bei 30°C

Alle abgebildeten Prozessgrößen (Abb. 38) zeigen ein periodisches Verhalten und erlauben so die Bestimmung der Dauer einer Periode. Diese sowohl aus den

Peakmaxima des Stromsignals der Biobrennstoffzelle als auch aus den der Konzentration des Kohlendioxids im Abgas bestimmte Periode betrug 4,3 h.

Der in der Abbildung (Abb. 39) dargestellte Bereich hat die Länge einer Periode, und sein Beginn wird auch als Anfang der Periode definiert.

Das Stromsignal hatte innerhalb einer Periode zuerst einen hügelartigen Verlauf von 3 h Dauer, danach stieg es in wenigen Minuten steil an und sank dann langsam wieder ab. Diese Art des Verlaufes konnte über 115 h, also ca. 33 Perioden lang, beobachtet werden.

Desweiteren wurde die Konzentration an Kohlendioxid im Abgas gemessen (Abb. 39). Hier zeigte sich zu Beginn jeder Periode zuerst ein sehr kurzer schmaler Peak. Danach sank die Konzentration etwa auf die Hälfte der Peakhöhe ab, um dann auf einem Plateau von ca. 1,3 h Dauer zu verweilen. Anschließend sank sie auf das gleiche Niveau wie zu Beginn der vorhergehenden Periode, um dann wieder in die nächste Oszillation überzugehen.

Aus den Daten der Abgasanalyse errechnen sich die Werte der Sauerstoffeintragsrate OTR, der Kohlendioxidproduktionsrate CPR und aus diesen der Respirationskoeffizient RQ (Gleichung 14). Nur kurzzeitig steigt er über $RQ > 1$. Dieser Peak stimmt mit dem des Kohlendioxids im Abgas überein.

Die Konzentration an Sauerstoff im Abgas (Abb. 39) verhält sich genau umgekehrt. Nahm die Konzentration an Kohlendioxid im Abgas zu, sank die an Sauerstoff. Im Gegensatz zur Kohlendioxidkonzentration ist bei der Sauerstoffkonzentration der Peak zu Beginn jeder Periode deutlich schwächer ausgeprägt.

Die Konzentration des Ethanol (Abb. 38) nimmt am Beginn jeder Periode schnell zu, um dann bis zu ihrem Ende wieder langsam abzusinken.

Die optische Dichte bei 590 nm (Abb. 39) wurde offline bestimmt. Sie hat ein gegenläufiges Verhalten zur relativen NAD(P)H-Fluoreszenz. Am Anfang einer Periode war sie konstant, nach 0,8 h sank das Signal, um danach wieder anzusteigen und gegen Ende der Periode wieder konstant zu werden.

Die relative Fluoreszenz bei Ex 370/Em 450 nm (Abb. 38, Abb. 39) spiegelt die in der Fermentationslösung enthaltene Menge an NAD(P)H wider. Sie nahm zuerst langsam, dann stärker zu, um schließlich wieder abzusinken.

Die relative Fluoreszenz bei Ex 290/Em 350 nm (Abb. 38) ist ein Maß für die in der Fermentationslösung enthaltene Menge an Tryptophan und damit indirekt auch für die Menge an Gesamtprotein. Zu Beginn jeder Periode stieg sie stark an und sank danach wieder.

Die Ergebnisse zeigen, daß es in einer Synchronkultur möglich ist, mit dem Stromsignal der Biobrennstoffzelle oszillierendes Wachstum zu überwachen und

dabei bisher noch nicht verwendete Prozeßparameter zur Charakterisierung des Stromsignals heranzuziehen.

Für eine nähere Betrachtung wurde in einer Periode der oszillierend wachsenden Kultur das Stromsignal der Biobrennstoffzelle in zwei getrennte Abschnitte unterteilt. Zum einem wurde der Abschnitt mit einem hügelförmigen Verlauf des Stromsignals zum Anfang jeder Periode betrachtet, zum anderen der nachfolgende Abschnitt mit dem steil ansteigenden Stromsignal, das nach dem Erreichen eines Maximalwertes allmählich wieder absinkt.

Der erste Abschnitt stimmt mit dem Steigen und dem Sinken der Konzentration an Kohlendioxid im Abgas, der Ethanolkonzentration, der NAD(P)H- und der Tryptophan-Fluoreszenz zeitlich überein. Gegenläufig dazu entwickelte sich die Konzentration des Sauerstoffs im Abgas. In diesem Abschnitt wird zuerst Glucose verbraucht, sichtbar durch den hohen schmalen Peak in der Kohlendioxidproduktion. Dabei entsteht Ethanol, das anschließend verbraucht wurde, erkennbar am Plateau der Kohlendioxidkonzentration im Abgas.

Betrachtet man den zweiten Abschnitt genauer, kann bei den anderen gemessenen Prozeßgrößen kein zu dem Strompeak analoges Signal gefunden werden.

4.5.4 Bestimmung der biologischen Aktivität von Klärschlamm

Die Fähigkeit aerober und anaerober Mikroorganismen zum Abbau organischer Substanzen wird in Kläranlagen genutzt. Häufig werden die Anlagen jedoch noch auf dem technologischen Stand der 50er Jahre betrieben (Präve et al., 1994), wodurch die Umsatzraten und die Stabilität der Prozesse z. T. gering sind .

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden (s. Kap. 4.3), daß es mit der Biobrennstoffzelle möglich ist Stoffwechselgifte zu detektieren. Aus diesem Grund soll die Biobrennstoffzelle auf ihre Eignung zur Überwachung der biologischen Aktivität von Klärschlamm überprüft werden. Sie könnte die Möglichkeit bieten, Aussagen über die Qualität des zuströmenden Abwassers zu machen. Damit ergäbe sich ein Ansatzpunkt, z. B. durch Mischen verschiedener Abwässer, die Aktivität des Klärschlammes zu regulieren.

Dazu wurde Klärschlamm aus der Kläranlage in Frankfurt-Niederrad untersucht. Er wurde dem Ablauf des Belebungsbeckens entnommen. Dieses Becken ist die Stelle mit der höchsten biologischen Aktivität in der gesamten Anlage.

Die Klärschlammproben wurden nach der Entnahme auf Eis gelagert und spätestens nach zwei Stunden im Versuch eingesetzt. Es wurden nur 500 ml Probe in einer 2-l-Flasche transportiert, um einen Übergang des Klärschlammes vom aeroben in den anaeroben Zustand weitestgehend zu vermeiden.

Die Versuche erfolgten im 250-ml-Fermentationsgefäß wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben. Der Klärschlamm wurde mit 8 l/h Luftsauerstoff belüftet und die Temperatur bei 25°C konstant gehalten.

Um zu verhindern, daß die Biobrennstoffzelle verstopft, wurde der Klärschlamm durch ein textiles Tuch filtriert. So konnten grobe Feststoffpartikel, v. a. Papierstücke, aber auch ein Teil der stäbchenförmigen Bakterien, die sich zu großen Verbänden gesellen, zurückgehalten werden.

Zuerst wurde ein Versuch mit 2,5 mg/l Mediator (Abb. 40) durchgeführt, um ein möglichst deutliches Stromsignal zu erhalten. Erst danach erfolgte ein Versuch ohne Mediator (Abb. 41).

Der Mediator wurde erst zugefügt, nachdem das Stromsignal konstant geworden war. Zeitlich verzögert wurden 0,25 g/l Glucose und 25 mg/l Natriumazid zugegeben.

Während der Versuche wurde das durch die biologische Aktivität des Klärschlammes in der Biobrennstoffzelle entstandene Stromsignal mit einem Digitalmultimeter erfaßt und mit dem Computer ausgewertet (s. Kap. 3.2.2).

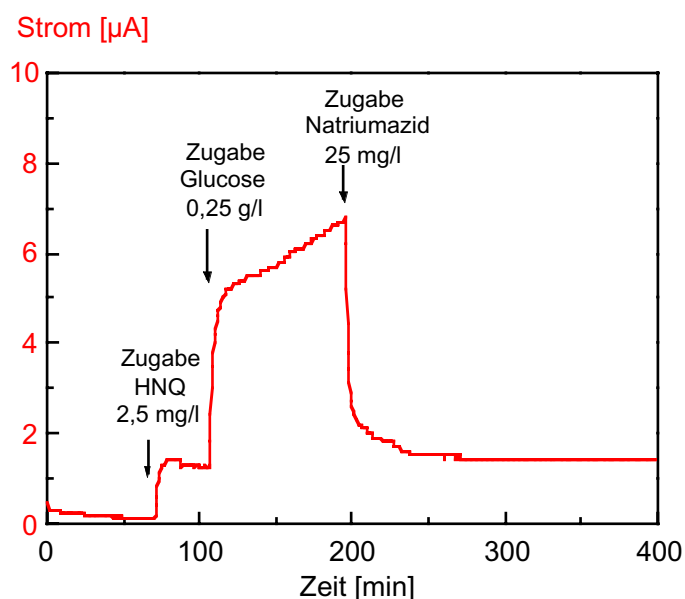


Abb. 40: Zeitlicher Verlauf des Stroms eines filtrierten Klärschlammes bei zeitlich versetzter Zugabe von 2,5 mg/l Mediator HNQ, 0,25 g/l Glucose und 25 mg/l Natriumazid bei 25°C

Beim Versuch mit Zugabe von Mediator betrug das Stromsignal zu Versuchsbeginn nur ca. 260 nA und sank dann bis auf 110 nA ab. Der Mediator wurde ca. 70 min nach Versuchsbeginn zugegeben, dadurch stieg der Strom auf ca. 1,4 μA und blieb dann annähernd konstant. Erst die Zugabe der Glucose führte zu einem deutlichen

Anstieg des Stromsignals, zuerst zu einem steilen Anstieg, der ab ca. $5,1 \mu\text{A}$ mit einer geringeren Steilheit weiter bis auf $6,7 \mu\text{A}$ anstieg.

Die Zugabe des Natriumazids führte zu einem sofortigen Absinken des Stromsignals auf das gleiche Niveau wie nach der Zugabe des Mediators. Danach blieb das Stromsignal bis zum Abbrechen des Versuchs annähernd konstant.

In diesem Versuch war das Stromsignal sehr niedrig, da die Substrate durch die Mikroorganismen weitestgehend verbraucht waren. Durch die Zugabe des Mediators wurde es verstärkt, aber nicht sein Verlauf verändert. Erst die Zugabe der Glucose führte zu einem deutlichen Anstieg des Stromsignals, da die lebenden, aber inaktiven Zellen, wieder aktiviert wurden. Das Signal blieb bis zur Zugabe des Natriumazids auf hohem Niveau. Die hierbei zu beobachtende weitere Zunahme ist auf das Zellwachstum zurückzuführen. Durch die Vergiftung des aeroben Stoffwechsels durch Natriumazid kam die Stoffwechselaktivität im Klärschlamm sofort zum Erliegen. Natriumazid führt zum Absterben der aeroben Bakterien, indem es die Atmungskette irreversibel schädigt (Schlegel, 1992). Daher sank das Stromsignal nach seiner Zugabe steil ab und blieb nach dem Absterben unverändert.

Beim Versuch ohne Mediator wurde dem Klärschlamm nach etwa 45 min $0,25 \text{ g/l}$ Glucose zugefügt. Außerdem wurde zeitlich verzögert zweimal 25 mg/l Natriumazid zugegeben (Abb. 41).

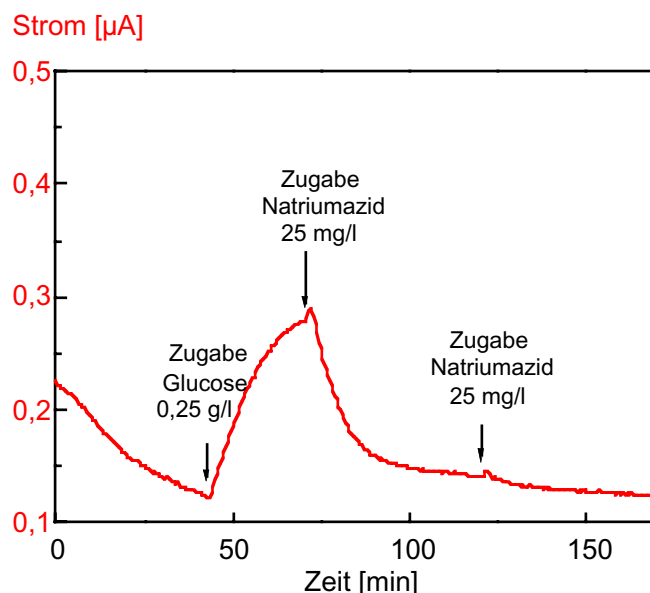


Abb. 41: Zeitlicher Verlauf des Stroms eines filtrierten Klärschlammes bei zeitlich versetzter Zugabe von $0,25 \text{ g/l}$ Glucose und zweimal 25 mg/l Natriumazid bei 25°C

Das Stromsignal betrug zu Versuchsbeginn nur ca. 220 nA und sank mit fortschreitender Versuchsdauer bis auf 120 nA ab. Durch die Zugabe der Glucose

stieg der Strom auf ca. 270 nA. Die Zugabe des Natriumazids führte zu einem sofortigen Absinken des Stromsignals. Gegen Versuchsende erfolgte eine weitere Zugabe von Natriumazid. Dies hatte jedoch keinen nennenswerten Einfluß auf das Stromsignal. Es wurde gegen Versuchsende annähernd konstant und betrug ca. 120 nA.

Durch die Zugabe der Glucose wurde die Aktivität der Mikroorganismen erhöht. Dadurch stieg das Stromsignal an. Die Zugabe des Natriumazids führte zu einem Absterben der Zellen, daher sank das Stromsignal bis zum Versuchende kontinuierlich ab.

Bei diesen Versuchen mit Klärschlamm handelte es sich um Vorversuche, mit denen gezeigt werden sollte, daß sich die Biobrennstoffzelle auch für die Überwachung von Mischkulturen in komplex aufgebauten Lösungen, wie sie z. B. ein Klärschlamm darstellt, eignet. Es konnte gezeigt werden, daß der Mediator für den Einsatz der Biobrennstoffzelle in der Kläranlage zur Überwachung der Aktivität nicht notwendig ist. Dies führt zu einer wesentlichen Vereinfachung des Verfahrens.

Für einen künftigen Einsatz der Biobrennstoffzelle zur Überwachung der biologischen Aktivität von Klärschlamm ist jedoch eine Änderung der Form des Reaktionsraums notwendig, um ein Verstopfen durch die Partikel im Klärschlamm zu verhindern und ihn direkt, ohne vorher zu filtrieren, einsetzen zu können.

4.5.5 Bestimmung des Gärverhaltens verschiedener Hefen in Säften

Ein Produkt eines der ältesten bekannten Fermentationsprozesse ist der Wein. Seine Herstellung erfolgt aus Saft durch Vergärung mit Hefen, z. B. *S. cerevisiae* var. *ellipsoides* oder var. *pastorianus* mit oder ohne Zuckerzusatz.

Die Weinherstellung ist ein traditionelles Handwerk, für das bis heute wenig moderne Meßmethoden zur Verfügung stehen bzw. bei dem weitgehend auf ihren Einsatz verzichtet wird. Der Gärvorgang ist ein Prozeß, dessen Kontrolle vor allem durch das Gespür und die Erfahrung des Winzers erfolgt.

In der Arbeit wurde sich mit zwei Problemen, die bei der Weinherstellung von Bedeutung sind, auseinandergesetzt.

Zum einen treten in den letzten Jahren bei der Gärung immer häufiger Stockungen auf, deren Ursachen weitgehend unklar sind. Als ein möglicher Grund werden u. a. die sich verändernden Anbaumethoden vermutet. So führt der weitgehende Verzicht auf Düngung zu stickstoffarmem Saft und Grundwein, eine Tatsache, die möglicherweise zu Gärstockungen, vor allem bei der traditionellen Flaschengärung in der Sektherstellung, führen kann. Diese Stickstoffarmut kann jedoch nicht der einzige Grund sein, da diese Probleme auch schon bei konventioneller

Bodenbearbeitung aufgetreten sind. Bei den in der Arbeit zu diesem Problemkreis durchgeführten Experimenten handelt es sich um Vorversuche, um später ein Schnelltest-System auf der Basis der Biobrennstoffzelle entwickeln zu können, das es ermöglicht, Säfte auf ihre Angäreigenschaften zu untersuchen (Abb. 42, Abb. 43). Solch ein Schnelltest könnte Kosten vermeiden, die durch den Einsatz von minderwertigen Grundweinen oder Säften entstehen, die ungeeignet für die Gärung sind.

Zum anderen bietet sich die Biobrennstoffzelle für eine online-Prozeßkontrolle an. Diese würde es ermöglichen, auf Probleme, die während des Gärprozesses auftreten, z. B. durch eine gezielte Veränderung der Temperaturverhältnisse, zu reagieren. Diese Kontrolle würde sich recht einfach und weniger subjektiv gestalten, als dies heute allein durch die Beobachtungen des Winzers geschieht.

Dazu wurden mit der Biobrennstoffzelle Versuche zu Gärverläufen von drei verschiedenen Reinzuchthefen (Siha-Aktiv Hefe 3, Uvaferm CEG und Lalvin, s. Kap. 3.1.2) durchgeführt, die heute häufig in der Wein- und Sektherstellung eingesetzt werden, um den Gärvorgang einzuleiten (Abb. 43 - Abb. 45).

Um die Gäreigenschaften verschiedener Säfte (s. Kap. 7.2.2.4) zu überprüfen, wurden die Versuche (Abb. 42, Abb. 43) mit Uvaferm CEG in naturtrübem Apfelsaft und Traubensaft durchgeführt.

Die Versuche erfolgten in einem 250-ml-Fermentationsgefäß und wurden wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Es wurde auf Rührung und Begasung der gärenden Säfte verzichtet, um sich den realen Prozeßbedingungen so weit wie möglich zu nähern.

Mit Ausnahme eines Versuchs mit Uvaferm CEG-Hefe in Traubensaft (Abb. 43, links) wurden zur Meßsignalverstärkung Mediator zugegeben.

Ein weiterer Versuch erfolgte in einem 40-l-Fermenter mit klarem Apfelsaft und kann in Kapitel 4.4.2 nachgelesen werden.

Durch das Stromsignal der Biobrennstoffzelle wurden die Vergäreigenschaften von naturtrübem Apfelsaft und Traubensaft (Abb. 42, Abb. 43) untersucht.

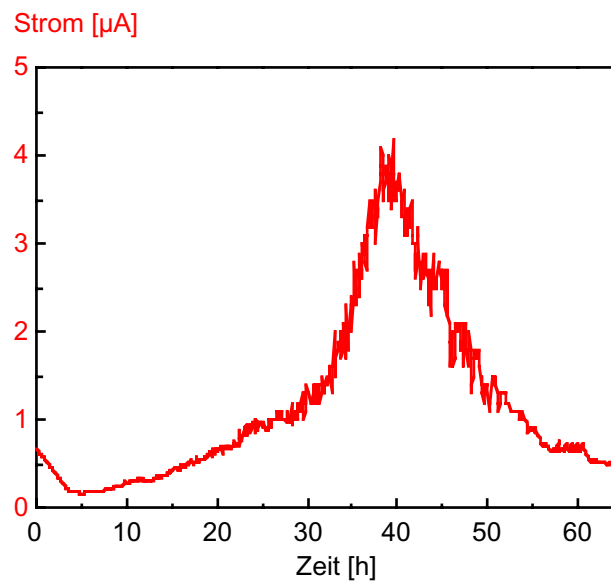


Abb. 42: Charakteristischer zeitlicher Verlauf des Stroms der Vergärung eines naturtrüben Apfelsaftes durch eine Uvaferm CEG-Hefe mit 0,2 mM Mediator HNQ und auf 25°C temperiert

Das Rauschen des Stromsignals im Versuch mit naturtrübem Apfelsaft und der Uvaferm CEG-Hefe basiert auf der starken Kohlendioxidproduktion durch die Hefe in diesem Saft (Abb. 42).

Um zu untersuchen, ob das Gärverhalten von Hefe in Saft auch ohne Mediator von der Biobrennstoffzelle wiedergegeben werden kann, wurden Versuche ohne Mediator (Abb. 43, links) und mit Mediator (Abb. 43, rechts) durchgeführt.

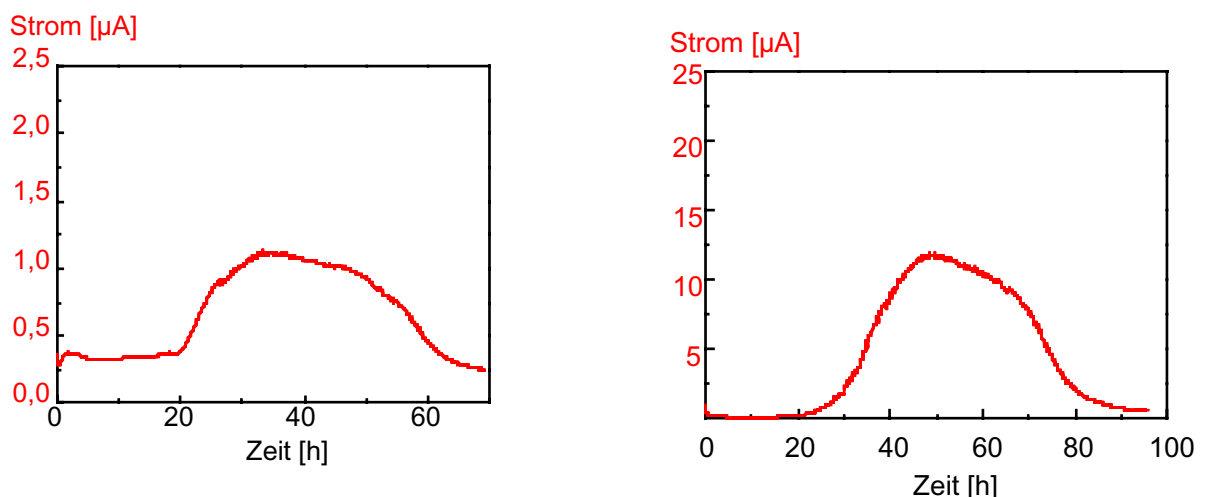


Abb. 43: Charakteristischer zeitlicher Verlauf des Stroms der Vergärung eines Traubensaftes durch eine Uvaferm CEG-Hefe ohne (links) und mit 0,2 mM Mediator HNQ (rechts) bei 25°C

Der naturtrübe Apfelsaft enthält nur etwa 10 g/l mehr Gesamtzucker als der Traubensaft, das sind 10 % (Abb. 42, Abb. 43). Trotzdem unterscheiden sich die Maximalwerte der Stromverläufe deutlich, 4 μA beim naturtrüben Apfelsaft und ca. 12 μA beim Traubensaft.

Es zeigte sich (Abb. 43, links), daß ein Stromsignal auch ohne Mediator registrierbar ist. Der eingesetzte Mediator verstärkt dieses Stromsignal (Abb. 43, rechts) in der gewählten Konzentration ungefähr um den Faktor 10. Mit einer entsprechend sensitiven Signalaufnahme kann daher auf den Einsatz eines Redoxmediators zum Monitoring des Gärverlaufes verzichtet werden.

Die Vergäreigenschaften von naturtrübem Apfelsaft und Traubensaft (Abb. 42, Abb. 43, rechts) wurden vergleichend mit Uvaferm CEG mit der Biobrennstoffzelle untersucht. Die Hefe benötigt im naturtrüben Apfelsaft und dem Traubensaft (Abb. 42, Abb. 43) annähernd die gleiche Zeit, bis die Gärung einsetzt. Die Versuche unterscheiden sich vor allem in der Form der Gärprofile der Biobrennstoffzelle und der Höhe des maximalen Stromsignals. Das Stromsignal bei naturtrübem Apfelsaft steigt in der exponentiellen Wachstumsphase steil bis auf 4,5 μA und sinkt nach dem Erreichen dieses Maximalwertes sofort wieder ab. Bei Traubensaft erreicht das Stromsignal einen höheren Maximalwert (12 μA) und sinkt danach allmählich ab.

Außerdem wurden verschiedene Hefen mit der Biobrennstoffzelle auf ihre Gäreigenschaften untersucht (Abb. 43 - Abb. 45).

Die CEG-Hefe hat ein gleichmäßiges ruhiges Gärverhalten (Abb. 43) und schäumt nur sehr wenig. Dies wird auch im stabilen Stromsignal der Biobrennstoffzelle sichtbar.

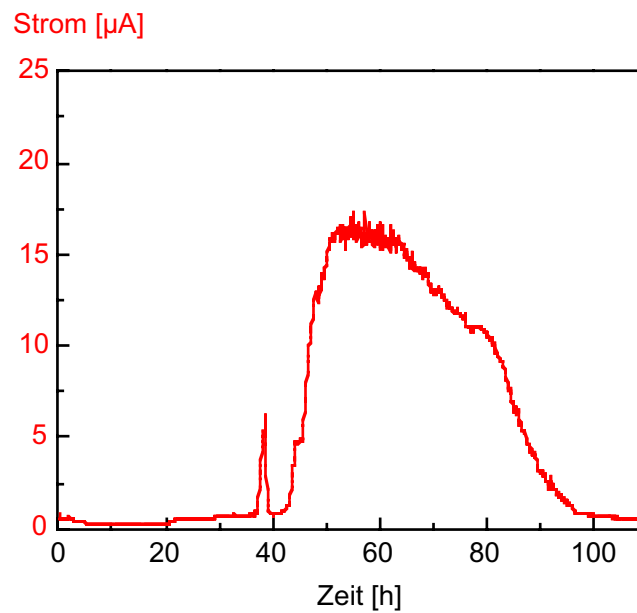


Abb. 44: Charakteristischer zeitlicher Verlauf des Stroms der Vergärung eines Traubensaftes durch eine Siha-Aktiv Hefe 3 mit 0,2 mM Mediator HNQ bei 25°C

Die Siha-Aktiv Hefe 3 hat ein sehr unruhiges Gärverhalten (Abb. 44) und schäumt sehr stark, dies ist die Ursache für das schwankende Stromsignal. In allen Versuchen, die mit dieser Hefe durchgeführt wurden, gibt es einen deutlichen schmalen Peak vor dem üblicherweise erscheinenden breiten Peak. Sein Ursprung ist noch unbekannt.

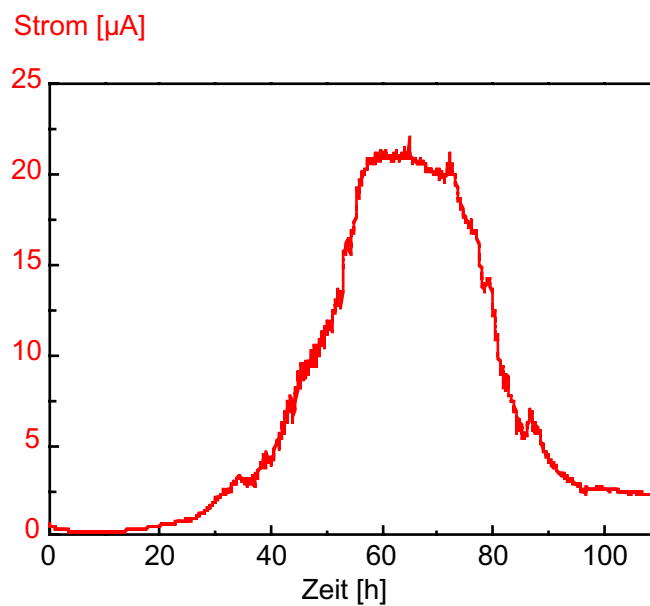


Abb. 45: Charakteristischer zeitlicher Verlauf des Stroms der Vergärung eines Traubensaftes durch eine Lalvin-Hefe mit 0,2 mM Mediator HNQ bei 25°C

Die Lalvin-Hefe (Abb. 45) wurde ursprünglich bei der Champagnerherstellung isoliert. Sie zeichnet sich durch eine starke Schaumbildung während der Gärung aus. Deshalb kommt es auch zu den Schwankungen des Stromsignals.

In allen mit Hefen und Säften durchgeführten Versuchen zeigen sich durch das Stromsignal entstehende Gärprofile mit charakteristischem Verlauf. Zuerst ist eine ausgeprägte lag-Phase zu erkennen, deren Länge von der eingesetzten Hefe und der Zusammensetzung des Saftes abhängt. Dann folgt eine Phase mit maximalem Wachstum, in der das Stromsignal stark zunimmt und danach in ein Plateau übergeht oder sofort wieder absinkt.

Dies waren erste Versuche zur Entwicklung eines Schnelltest-Systems zur Untersuchung der Vergäreigenschaften von Hefe in verschiedenen Säften für die Wein- und Sektherstellung auf der Basis der Biobrennstoffzelle (Abb. 42, Abb. 43). Die Biobrennstoffzelle erwies sich als geeignet, aber für einen zukünftigen Einsatz sind vor allem verfahrenstechnische Optimierungsschritte notwendig, um die Prozeßzeit zu reduzieren.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Biobrennstoffzelle auch zur online-Prozeßkontrolle von Gärverläufen bei Wein- und Sekthefen anbietet (Abb. 43 - Abb. 45). Dabei muß aber in Betracht gezogen werden, daß jede Gärung einzigartig ist (Troost, 1988). Es ist deshalb selbst bei zwei unter gleichbleibenden äußeren Bedingungen ablaufenden Gärprozessen Versuchen nur in begrenztem Umfang möglich, identische Gärprofile zu erhalten.

Die Versuche zeigen jedoch, daß es möglich ist beim Einsatz der gleichen Hefe im gleichen Saft, charakteristische Gärprofile durch das Stromsignal aufzuzeichnen. Auf diese Weise könnten deutliche Abweichungen vom normalen Gärverlauf erkannt und entsprechende Entscheidungen über die weitere Prozeßführung getroffen werden.

4.5.6 Bestimmung der biologischen Aktivität von tierischen Zellen

Tierische Zellen sind für die Produktion von monoklonalen Antikörpern, Blutgerinnungsfaktoren, Impfstoffen, Hormonen, Enzymen, Interferonen usw. von Bedeutung. Die Palette ihrer Einsatzmöglichkeiten nimmt bis heute ständig zu.

Deshalb ist die Messung ihrer biologischen Aktivität besonders interessant. Die für die mikrobiellen Zellen verwendeten Meßmethoden sind hier zum Großteil nicht einsetzbar, da es einige wesentliche Unterschiede zwischen mikrobiellen und tierischen Zellen gibt, die den Umgang mit ihnen erschweren.

Sie haben keine feste Zellwand als äußere Begrenzung, wie sie normalerweise den Zellen mikrobiellen Ursprungs eigen ist. Das Zytoplasma hat lediglich eine dünne Membran als Abgrenzung gegen die Umgebung der Zelle. Dadurch sind die Zellen sehr anfällig gegenüber mechanischen und osmotische Belastungen, was eine Reihe technologischer Probleme mit sich bringt.

Außerdem ist die Gefahr der Infektion durch Mikroorganismen sehr groß, da die tierischen Zellen nur langsam und auch nur in komplexen, reichhaltigen Wachstumsmedien wachsen.

Eine Probenahme erfolgt üblicherweise offline, indem täglich einmal eine Probe dem Fermenter entnommen wird. In dieser Probe werden anschließend verschiedene Prozeßparameter wie Zellzahl, Glucose- und Lactatkonzentration erfaßt. Dies ermöglicht, nur zeitverzögert auf Veränderungen wie Limitierungen durch Substratmangel oder Kontaminationen zu reagieren.

Eine online-Messung der biologischen Aktivität der sensiblen, streßempfindlichen Zellen mit Hilfe der Biobrennstoffzelle ist somit eine technisch interessante Aufgabenstellung. Sie sollte für die online-Messung gut geeignet sein, da bereits in anderen, mikrobiellen Systemen gezeigt werden konnte, daß sie ermöglicht, Veränderungen in der Aktivität der Zellen ohne große zeitliche Verzögerung zu erkennen.

Für die online-Messung wurde die Biobrennstoffzelle vor Versuchsbeginn in einen Kreislauf des Fermentationslösungsflusses integriert. So ist sie Bestandteil eines geschlossenen Systems und stellt kein zusätzliches Kontaminationsrisiko, wie bei den offline-Probenahmen, dar.

Bedingt durch die Streßempfindlichkeit der tierischen Zellen wurde bei der online-Messung auf einen kontinuierlichen Betrieb des Bypass-Systems verzichtet. Es wurde im Abstand von 55 min jeweils 5 min gemessen, und die tierischen Zellen wurden auch nur während dieser Zeit mit 10 ml/min durch die Biobrennstoffzelle gepumpt.

Die Biobrennstoffzelle wurde in eine an der Universität Hannover, von Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie, durchgeführte Fermentation integriert. Als tierische Zelllinie wurden CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) verwendet.

Die Versuche erfolgten im 6,6-l-Fermenter in BioPro 1-Medium (s. Kap. 7.2.4.2) wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, wobei die Biobrennstoffzelle zusammen mit dem Fermenter autoklaviert wurde.

Es wurden der Strom, die Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl (Abb. 46) sowie die Glucosekonzentration bestimmt (Abb. 47).

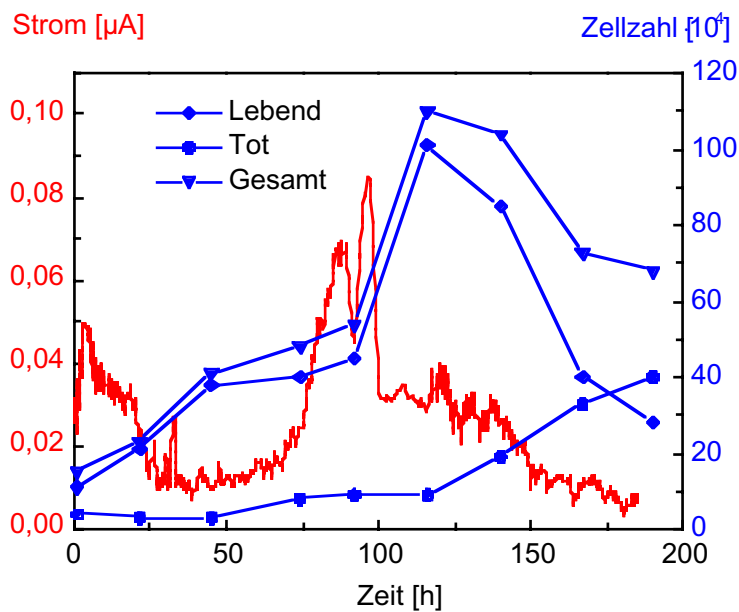


Abb. 46: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der Konzentration der Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl einer Kultivierung von CHO-Zellen in BioPro 1-Medium bei 37°C

Das Signal der Biobrennstoffzelle schwankte sehr stark, da es keinen kontinuierlichen Fluß der Fermentationslösung durch die Biobrennstoffzelle gab und deshalb auch nicht kontinuierlich gemessen wurde. Zu Versuchsbeginn kam es zum Absinken des Stromsignals. Wahrscheinlich unabhängig vom Stoffwechselgeschehen der tierischen Zellen, vergehen von Versuchsbeginn etwa 25 h bis sich ein konstantes Stromsignal der Biobrennstoffzelle einstellt. Erst von diesem Zeitpunkt an kann man davon ausgehen, daß das Signal der Biobrennstoffzelle die Aktivität der tierischen Zellen widerspiegelt.

Nach ca. 75 h Stunden ist ein Ansteigen des Stromsignals registrierbar. Dies ist deutlich früher, als sich Wachstum und Zunahme der Zellen in der Lebend- und Gesamtzellzahl bemerkbar machen. Nach etwa 100 h kommt es zu einem allmählichen Absinken des Stromsignals. Zu diesem Zeitpunkt steigen aber die Lebend- und die Gesamtzellzahl noch weiter an. Deren Absinken und eine sichtbare Zunahme der toten Zellen erfolgt erst ca. 15 h (115 h nach Versuchsbeginn) später.

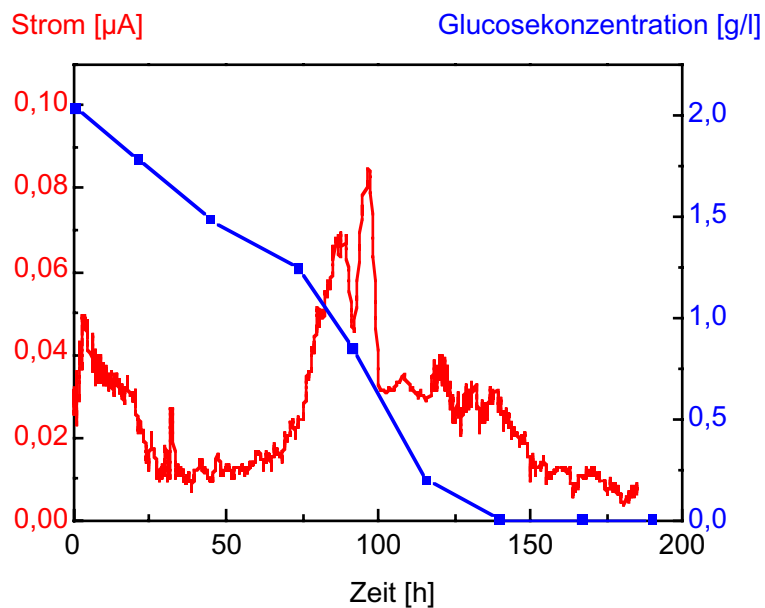


Abb. 47: Zeitlicher Verlauf des Stroms und der Konzentration der Glucose während einer Kultivierung von CHO-Zellen in BioPro 1-Medium bei 37°C

Während des Versuchs wurde auch die Glucosekonzentration ermittelt (Abb. 47). Sie sinkt vom Versuchsbeginn an.

Das Stromsignal der Biobrennstoffzelle sinkt während der ersten 25 h. Danach kommt es zu einem Ansteigen des Stromsignals, bedingt durch die zunehmende Aktivität der Zellen. Die Glucosekonzentration sinkt währenddessen weiter. Mit dem Verbrauch der Glucose geht auch das Stromsignal erneut auf die sich zu Versuchsbeginn einstellende Basislinie.

Die Ergebnisse deuten in diesem Fall darauf, daß sich die Biobrennstoffzelle eignet, das Wachstum von tierischen Zellen zu überwachen. Die Stromsignale sind ohne Mediator sehr niedrig, da die tierischen Zellen sehr langsam wachsen.

Aber, wenn der Prozeß mehrmals mit den gleichen tierischen Zellen, dem gleichen Medium und unter gleichen Prozeßbedingungen mit der Biobrennstoffzelle überwacht würde, erhielte man wahrscheinlich einen charakteristischen Verlauf. Aus diesem könnte man dann, ohne das System zu öffnen und die Gefahr einer Kontamination einzugehen, eine Aussage über die Wachstumsphase bzw. den Aktivitätszustand der tierischen Zellen treffen. Anschließend könnte eine Entscheidung über den weiteren Verlauf, wie z. B. den Abbruch oder die Zufütterung von neuem Medium, getroffen werden.

Bei der Messung der Stoffwechselaktivität handelt es sich um eine quasi-kontinuierliche Messung, da nur alle 55 min die Zellen für 5 min durch die

Biobrennstoffzelle gepumpt wurden. Doch da die tierischen Zellen nur langsam wachsen, erwies sich diese Meßwertdichte noch als aussagekräftig.

Trotzdem wäre es für einen zukünftigen Einsatz günstiger, ein schonendes Transportverfahren zu entwickeln, das es ermöglicht, die Zellen kontinuierlich durch die Biobrennstoffzelle zu fördern, ohne sie dabei mechanisch zu belasten.

In der Zukunft könnte die Biobrennstoffzelle eine Alternative zur offline-Probenahme darstellen. Durch das Einbauen der Zelle in den Prozeß würden die Probenahmen unnötig.

5 Diskussion und Ausblick

Optimierung der Biobrennstoffzelle

Der im Rahmen der Arbeit aus einer Biobrennstoffzelle zur Energiegewinnung (Sell, 1991) entwickelte Sensor hat einen sehr einfachen Aufbau. Er besteht lediglich aus der Biobrennstoffzelle und einer Einheit, die das Erfassen des Stromsignals ermöglicht, z. B. einem Multimeter oder einem Computer.

Die Biobrennstoffzelle wurde durch verschiedene konstruktive Veränderungen für einen sensorischen Einsatz, vor allem für die online-Prozeßüberwachung, optimiert (s. Kap. 4.1).

Die wichtigsten Veränderungen sind die kanalförmige Gestaltung des Innenraums und die Bestimmung des am besten geeigneten Elektrodenmaterials.

Die Kanalförmigkeit wurde gewählt, da diese günstigere Strömungsbedingungen bietet, und Toträume weitgehend vermieden werden.

Nach der Untersuchung verschiedener Elektrodenmaterialien wurde für die in der Arbeit eingesetzte Anode Platin gewählt, da die Biobrennstoffzelle in den Versuchsreihen damit zu reproduzierbaren Stromsignalen führte.

Für zukünftige Anwendungen wird die Konstruktion von Einweg- und Mehrwegsensoren vorgeschlagen. Für Einwegsensoren wird als Anodenmaterial Graphit oder platinisiertes Titan, für Mehrwegsensoren Glaskohlenstoff und Platin empfohlen. Diese Auswahl erfolgte unter Berücksichtigung der Kosten des Materials und seiner elektrochemischen und mechanischen Eigenschaften bei einem langfristigen Einsatz. Bei entsprechender Verkleinerung der Biobrennstoffzelle und damit auch der Anode wären für einen Einsatz in Einwegsensoren in der Praxis auch die kostenintensiveren Materialien wie Glaskohlenstoff und Platin denkbar.

Momentan werden die größten Kosten durch die Einzelfertigung des mehrteiligen Plexiglasgehäuses verursacht. Diese ließen sich bei einer Serienproduktion wesentlich verringern.

Vergleich der diskontinuierlichen und der kontinuierlichen Fermentationskontrolle

Ausgehend von der Annahme, daß für die Funktionsfähigkeit der Biobrennstoffzelle ein Mediator notwendig sei, wurde ein diskontinuierliches Verfahren entwickelt, bei dem der Mediator erst nach der Entnahme einer Probe aus dem Fermenter zugefügt wurde. So erfolgt die Fermentation ohne, die Messung in der Biobrennstoffzelle jedoch mit Mediator.

Dem Fermenter wurde diskontinuierlich Fermentationslösung entnommen, Mediator zugegeben und danach die durch die Mikroorganismen bedingte Mediatorreduktion mit Hilfe der Biobrennstoffzelle bestimmt. Auf diesem Weg wurden erfolgreich aerobe *E. coli*-Kultivierungen überwacht (s. Kap. 4.4.1).

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß eine relativ große Menge zu verwerfendes Probematerial anfällt. Bei einem etwa 10 h andauernden Versuch entstand eine Abfallmenge von ca. 2 l, wovon jeweils die eine Hälfte Fermentationslösung und die andere Mediatorlösung war. Im Falle der Verwendung dieses Verfahrens sollte deshalb die Biobrennstoffzelle und das dazugehörige Schlauchsystem verkleinert werden, um die Abfallmenge zu reduzieren. In speziellen Versuchen konnte gezeigt werden, daß es bei einer Halbierung der Elektrode von 568 mm² auf 284 mm² zu einer Verringerung des Stromsignals von ca. 57 µA auf 40 µA kommt, d. h., daß eine Verkleinerung der Anodenfläche möglich ist. Die Sauerstoffdiffusionskathode ist, bedingt durch ihre ursprüngliche Anwendung in Wasserstoff-Sauerstoff-Zellen, für hohe Stromdichten konzipiert. Es ist deshalb zu erwarten, daß auch sie in einem begrenzten Rahmen weiter verkleinert werden kann. In den Versuchen mit Klärschlamm (s. Kap. 4.5.4) stellten Messungen im Nanoampere-Bereich mit der vorhandenen Biobrennstoffzelle und der dazugehörigen Meßtechnik kein technisches Problem dar und lieferten reproduzierbare Ergebnisse. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß eine Verkleinerung der Biobrennstoffzelle ohne Probleme möglich ist.

Es handelt sich um keine echte, sondern um eine quasi-online Überwachung, da man bei der diskontinuierlichen Fermentationskontrolle verfahrensbedingt verwertbare Stromsignale jeweils 5-10 min nach der Probennahme erhält.

Die diskontinuierliche Fermentationskontrolle ist dann von Interesse, wenn der Einsatz des Mediators direkt im Fermenter nicht erwünscht ist, oder wenn die Rückführung des Meßgutes in den Fermenter nicht möglich oder zulässig ist.

Nachdem Ergebnisse (s. Kap. 4.2.1.2) darauf hindeuteten, daß Messungen mit der Biobrennstoffzelle auch ohne Mediator zu aussagekräftigen Resultaten führen, wurde das diskontinuierliche Verfahren in eine kontinuierliche Fermentationskontrolle überführt. Dabei wurde dem Fermenter kontinuierlich Fermentationslösung entnommen, dieser aber kein Mediator zugegeben. Die Probe floß direkt durch die Biobrennstoffzelle. Dabei wurde der Strom registriert und anschließend die Fermentationsbrühe in den Fermenter zurückgeführt.

Für Prozeßüberwachungen ist in den meisten Fällen die kontinuierliche Messung der diskontinuierlichen Fermentationskontrolle vorzuziehen, da kein Abfall entsteht und die Biobrennstoffzelle ohne prozeßbedingte Zeitverzögerung Signale liefert. Anzustreben ist eine Ausführung der Biobrennstoffzelle, die direkt in den Fermenter

integriert werden kann und damit die Verwendung eines Bypass-Systems für die Integration in den Prozeß unnötig macht.

Das Stromsignal der Biobrennstoffzelle bei der online-Prozeßüberwachung

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Versuche ohne Zugabe als auch mit Mediator durchgeführt. Die Versuche ohne Mediator liefern deutlich niedrigere Stromsignale als die Versuche mit Mediator. Die Verläufe der Stromkurven ähneln sich. Einen wesentlichen Unterschied gibt es zu Versuchsbeginn. Während sich in den Versuchen mit Mediator meist bereits nach wenigen Minuten ein Basisstromsignal einstellt, kommt es in den Versuchen ohne Mediator meist zu einem Absinken oder Ansteigen der Meßwerte der Biobrennstoffzelle über einen längeren Zeitraum, bis sich dann auch hier ein Basisstromsignal einstellt. Eine mögliche Erklärung ist das Eindiffundieren des Mediums in die Sauerstoffdiffusionskathode bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes. Dies hat sich auch in Kontrollversuchen ohne Mikroorganismen gezeigt (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieser Prozeß wird wahrscheinlich durch den deutlich höheren Stromfluß bei den Versuchen mit Mediator überlagert.

Deshalb sollte vor Versuchsbeginn mit dem Animpfen des Mediums gewartet werden, bis das Basisstromsignal erreicht ist.

Nach dem Animpfen bleibt das Stromsignal bis zum Beginn des mikrobiellen Wachstums konstant.

Danach unterscheiden sich die Ergebnisse der aeroben und der anaeroben Versuche.

Werden das Ansteigen der optischen Dichte und der Konzentration des Kohlendioxids im Abgas mit Beginn des mikrobiellen Wachstums als vergleichende Parameter genutzt, erkennt man, daß in den aeroben Versuchen der Strom gegenüber diesen Meßgrößen deutlich später zu steigen beginnt (Abb. 27). In den anaeroben Versuchen dagegen beginnen Stromsignal, optische Dichte und Konzentration des Kohlendioxids im Abgas annähernd gleichzeitig zu steigen (Abb. 29).

Für das verzögerte Ansteigen des Stromsignals bei den aeroben Versuchen sind zwei Ursachen denkbar. Zum einen könnte der Sauerstoff, der dem System für die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen zugeführt wurde, die reduzierten, elektroaktiven Substanzen, die das Stromsignal verursachen, oxidieren. Dieser Prozeß würde sich vor allem zu Versuchsbeginn bei niedrigen Biomassekonzentrationen bemerkbar machen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß andere elektroaktive Substanzen als bei den anaeroben Versuchen das Stromsignal verursachen. Diese Substanzen würden erst zu einem späteren Zeitpunkt des mikrobiellen Wachstums produziert werden.

Eine exakte Auskunft müssen zusätzliche Versuche geben. Klärend könnte z. B. die Messung der Sauerstoffverhältnisse vor der Anode zu verschiedenen Zeitpunkten des mikrobiellen Wachstums sein. Diese Frage war für die Problemstellung der Arbeit nicht relevant.

In der Phase des maximalen mikrobiellen Wachstums steigt in Übereinstimmung mit der maximalen Teilungsrate auch das Stromsignal der Biobrennstoffzelle maximal. In dieser Phase kann durch vorherige Erstellung von Kalibrierkurven bei analoger Versuchsdurchführung über die Höhe des Stromsignals auch die Zellzahl bestimmt werden.

Alle bisher entwickelten Biomassesensoren (s. Kap. 2.1.1) auf der Basis von Biobrennstoffzellen machen sich diesen Zusammenhang zunutze, um die aktuelle Zellzahl zu ermitteln (Matsunaga et al., 1979; Nishikawa et al., 1982; Turner et al., 1983). Die in der Arbeit verwendete Biobrennstoffzelle wurde in einem früheren Entwicklungsstadium von Grummann (1995) ebenfalls für die offline-Bestimmung von Biomassekonzentrationen genutzt. Diese Anwendungen zur Zellzahlbestimmung sind jedoch nur auf die exponentielle Wachstumsphase beschränkt.

Beginnt die Teilungsrate deutlich zu sinken, hat auch das Stromsignal seinen Maximalwert erreicht und beginnt zu fallen. In dieser Hinsicht gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den aeroben und den anaeroben Versuchen. Das spricht ebenfalls dafür, daß die Ursache für den zeitverzögerten Anstieg des Stromsignals der Biobrennstoffzelle bei Beginn des mikrobiellen Wachstums wahrscheinlich im Einfluß des Sauerstoffs zu suchen ist.

Das Verhalten des Stromsignals in der folgenden Phase, in der das Wachstum stagniert, hängt davon ab, inwieweit es noch verbleibende mikrobielle Aktivität gibt, denn dann fällt das Stromsignal allmählich ab. Sind alle Nährstoffe verbraucht, oder haben sich für die Mikroorganismen toxische Stoffwechselprodukte angesammelt, sinkt der Strom schnell bis auf das Basissignal vom Versuchsanfang.

Der Verlauf des Signals der Biobrennstoffzelle gleicht einer Kurve, die sich aus der Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen und deren Aktivität ergibt.

Charakterisierung des Stromsignals der Biobrennstoffzelle mit Hilfe verschiedener das mikrobielle Wachstum betreffender Phänomene und Prozeßparameter

Bekannte Phänomene mit Einfluß auf den physiologischen Aktivitätszustand von Mikroorganismen, wie Substratmangel, Diauxie und physiologisch aktive Substanzen, wurden dazu eingesetzt, das Signal der Biobrennstoffzelle zu charakterisieren (s. Kap. 4.3). Durch die Versuche wurde offensichtlich, daß die Biobrennstoffzelle die Möglichkeit eröffnet, Veränderungen im mikrobiellen

Stoffwechsel augenblicklich zu registrieren. Daraus ergeben sich zukünftige Anwendungsmöglichkeiten für die Biobrennstoffzelle. So wird in den Versuchen mit physiologisch aktiven Substanzen bzw. Stoffwechselgiften klar (s. Kap. 4.3.4), daß sich die Biobrennstoffzelle auch zur Durchführung von Toxizitätstest eignet. So könnte der Effekt beliebiger Substanzen auf die mikrobiellen Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden.

Der Einfluß von Stoffwechselgiften wurde im Rahmen der Arbeit in einem mehrere Stunden andauernden Wachstumsversuch gezeigt. Daraus folgernd wäre die Entwicklung eines Schnelltests denkbar, bei dem die Biobrennstoffzelle zuerst mit bereits stoffwechselaktiven Mikroorganismen und evtl. Mediator befüllt, ein Basissignal abgewartet und dann die zu testende Substanz zugegeben wird. Diese Prozedur würde maßgeblich die Prozeßzeit verkürzen.

Aus dem Spektrum der sich zum Vergleich anbietenden Prozeßparameter wurde die Gruppe der im Routinebetrieb am häufigsten verwendeten Prozeßgrößen ausgewählt. Optische Dichte, Trübung und Biotrockenmasse geben, wenn auch unterschiedlich in Qualität und Aufwand, Auskunft über die Biomassekonzentration oder beschreiben die Umgebung der Mikroorganismen und liefern so indirekt Informationen zur Biomasse. Beispielhaft dafür wurden Kohlendioxid- und Sauerstoffanteil im Abgas, Sauerstoffsättigung im Medium, Redoxpotential, Kulturfluoreszenz, Glucose- und Ethanolkonzentration und pH-Wert gemessen. Deutlich wurde, daß das Stromsignal zeitweise zu optischer Dichte, Trübung und Biotrockenmasse analoge Signale liefert. Das geschah jedoch nur so lange, wie diese Größen ansteigen. Bleiben sie konstant, existierte auch keine Proportionalität mehr. Ein wesentlicher Vorteil des Stromsignals gegenüber diesen Prozeßparametern ist, daß der Strom unabhängig von inaktiven bzw. abgestorbenen Zellen und Feststoffpartikeln im Medium die Vitalität der Mikroorganismen widerspiegelt. Auch ist das Stromsignal eine augenblicklich vorliegende Information, die sofort in Maßnahmen umgesetzt werden kann, die den Prozeß regulieren. Die Verknüpfung des Stromsignals mit den Prozeßparametern Kohlendioxid- und Sauerstoffanteil im Abgas, Sauerstoffsättigung im Medium und Redoxpotential ist deutlich stärker ausgeprägt als bei den direkt mit der Biomasse verknüpften Größen, da sie Funktionen der mikrobiellen Aktivität sind. Ein Vorteil der Biobrennstoffzelle ist, daß sich das Stromsignal auch zur Beschreibung anaerober Prozesse eignet.

Ein Vorteil des Stromsignals ist auch, daß es Konzentrationen wiedergibt und nicht nur Konzentrationsverhältnisse, wie das beim Redoxpotential der Fall ist. Dadurch werden Veränderungen in der Stoffwechselaktivität eindeutiger beschrieben (s. Kap. 4.5.1).

In der Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Kulturfluoreszenz und dem Stromsignal der Biobrennstoffzelle festgestellt werden.

Glucose und Ethanol sind potentielle Substrate der Mikroorganismen. Deren Verbrauch ist ein Zeichen für mikrobielle Aktivität und führt zu einer Erhöhung des Stromsignals.

In noch unveröffentlichten Ergebnissen (Holtmann, 1998) wird gezeigt, daß es einen direkten Einfluß von pH-Wert und Temperatur auf das Stromsignal der Biobrennstoffzelle gibt. Sowohl steigender pH-Wert als auch steigende Temperatur bewirken eine Erhöhung des Stromsignals. Daß diese Größen nicht maßgeblich das Stromsignal beeinflussen, zeigt sich in Kapitel 4.5.1 einer *E. coli*-Kultivierung, bei der das Stromsignal zunimmt und der pH-Wert fällt. Eine weitere Variante ist in Kapitel 4.4.2 zu sehen. Hier steigen sowohl das Stromsignal als auch der pH-Wert. Außerdem wurde in allen Versuchen die Temperatur konstant gehalten.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Stromsignal mit verschiedenen Prozeßgrößen korreliert und unmittelbar mit den Veränderungen im Prozeßgeschehen verknüpft ist.

Theorien zur Ursache des Stromsignals der Biobrennstoffzelle in den Versuchen mit Mediator

In früheren Arbeiten wurden *Anacystis nidulans*, *Vibrio natriegens*, *Bacillus alcalophilus*, *Wolinella succinogenes* und eine Mischkultur, bestehend aus 15-20 verschiedenen Spezies, getestet (Sell, 1991). In der vorliegenden Arbeit erfolgten Versuche mit *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Penicillium chrysogenum*. In allen Versuchen zeigten sich verwertbare Stromsignale.

Die Frage nach dem Elektronendonator im Stoffwechsel der Mikroorganismen beim Einsatz von Redoxmediatoren ist noch ungelöst. Der Mediator entzieht dem mikrobiellen Stoffwechsel die Elektronen und transportiert diese vom Mikroorganismus zur Elektrode. Bei dem Mediator, der in Arbeit verwendet wurde, handelt es sich um 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon (HNQ). Die Verbindung hat bei einem pH-Wert von 7 ein Standardpotential von -152 mV gegen Ag/AgCl.

Bekannt ist:

1. HNQ ähnelt in seiner Struktur dem Menachinon, das in der Atmungskette der verschiedensten Mikroorganismen enthalten ist (Sell, 1991).
2. HNQ wirkt hemmend auf den mikrobiellen Stoffwechsel (Foerst, 1960), wobei nicht geklärt ist, ob die Hemmung durch den Entzug der Elektronen oder durch einen parallel wirkenden Effekt zustande kommt.

3. Es ist kein direkter Elektronenübergang in zellfreien Systemen zwischen NADH und HNQ möglich. Daraus könnte man schließen, daß die Elektronen nicht direkt vom $\text{NADH} + \text{H}^+$ stammen (Bennetto, 1987).
4. HNQ wird durch $\text{NADH} + \text{H}^+$ in Anwesenheit von Zellmembran-Fractionen reduziert (Box et al., 1987).

Für die Mediatorreduktion bieten sich dem Betrachter also zwei mögliche Erklärungen an. Zum einem könnte die Mediatorreduktion unspezifisch mit einer Vielzahl mikrobieller Redoxreaktionen gekoppelt sein, zum anderen besteht die Wahrscheinlichkeit, daß ein in einer Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen vertretenes Reaktionssystem die Ursache ist. Bennetto (1984) gibt als potentiellen Elektronendonator die Enzymkomplexe der Atmungskette des jeweiligen Organismus an. Klärend könnten hierfür z. B. Versuche mit anaeroben Bakterien, die auch keinerlei Atmungskettenanaloge enthalten, durchgeführt werden.

Theorien zur Ursache des Stromsignals der Biobrennstoffzelle in den Versuchen ohne Mediator

Matsunaga et al. (1979) verwendete *Saccharomyces cerevisiae* und *Lactobacillus fermentum*. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stromsignal in der Biobrennstoffzelle ohne Mediator beim Wachstum von *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, Mischkulturen in Klärschlamm und tierischen Zellen registriert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß es sich um einen nicht nur bei einem Mikroorganismus auftretenden Elektronendonator handelt.

Darüber, welcher Elektronendonator die Ursache für das Stromsignal der Biobrennstoffzelle sein könnte, gibt es in der Literatur verschiedene Vermutungen. Zum einen wird angenommen, daß der direkte Kontakt der Mikroorganismen mit der Elektrode für die Entstehung des Stromsignals notwendig ist (Matsunaga et al., 1979). Zum anderen wird vermutet, daß infolge des mikrobiellen Stoffwechsels entstehende elektrochemisch aktive Substanzen die Ursache sind (Zhang und Halme, 1994). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß das Stromsignal die Summe aus dem Elektronentransfer durch den direkten Kontakt der Mikroorganismen mit der Anode und der Oxidation elektroaktiver Substanzen ist.

Es ist bekannt, daß einige Mikroorganismen elektroaktive Substanzen wie Wasserstoff, Formiat und Ammoniak bilden (Matsunaga, et al. 1979; Aston und Turner, 1984), die dann die Ursache für das Stromsignal der Biobrennstoffzelle sind. Zhang und Halme (1995) geben als mögliche elektroaktive Substanz Ethanol an, da sie bei der Zugabe von Ethanol zu einer *S. cerevisiae*-Kultur eine Erhöhung des Stromsignals der Biobrennstoffzelle beobachteten. Das scheint aufgrund der Versuchsergebnisse in dieser Arbeit jedoch unwahrscheinlich. Die Ergebnisse der

kontinuierlichen Überwachung des oszillierenden Wachstums einer *S. cerevisiae*-Kultivierung (s. Kap. 4.5.2) sprechen gegen diese Annahme, da der Verlauf der Ethanolkonzentration nicht mit dem Verlauf des Stromsignals der Biobrennstoffzelle korreliert. Wahrscheinlich ist, daß es durch den Verbrauch des Ethanols durch die Mikroorganismen zu einer Signalverstärkung kommt. Auch Zudosierungen von Ethanol während der Fermentation hatten keinen sichtbaren Einfluß auf das Stromsignal (Ergebnisse nicht gezeigt).

In den Versuchen mit den oszillierend wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen (s. Kap. 4.5.3) gibt es einen Strompeak, zu dem bei den anderen gemessenen Prozeßgrößen kein analoges Signal gefunden werden konnte. Dieser Peak des Stromsignals könnte durch Gluthation verursacht sein oder mit dem NAD(P)/NAD(P)H-Gleichgewicht zusammenhängen. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch keine Zunahme des NAD(P)H-Niveaus im Fluoreszenzsignal zu erkennen. Nur weitere Untersuchungen können diese Frage klären.

Die Biobrennstoffzelle und andere sensorisch eingesetzte Biobrennstoffzellen

Die bereits durch Sell (1991) aufgehobene Zweiteilung des Innenraums der Biobrennstoffzelle durch Einsatz der Sauerstoffdiffusionskathode unterscheidet die Biobrennstoffzelle von allen zuvor als Biomassesensor getesteten (Hobson et al., 1996). Matsunaga et al. (1979) verwendete zwei klassische Biobrennstoffzellen, bei denen jeweils die Anoden in eine zellhaltige Probe getaucht werden. Eine der Anoden war von einem Dialyseschlauch umhüllt, um den Kontakt der Mikroorganismen mit der Elektrode zu unterbinden und den nur durch die elektroaktiven Substanzen bedingten Strom registrieren zu können. Interessant ist dabei ein Versuch, bei dem durch kontinuierliche Probenahme eine *S. cerevisiae*-Kultivierung überwacht wurde. Im Gegensatz zu den in der Arbeit gezeigten Verläufen sinkt das Stromsignal bei stagnierendem Wachstum in der stationären Phase nicht ab. Die Differenz der Stromsignale gibt also nicht die mikrobielle Aktivität wieder. Die Autoren geben an, daß die Differenz der Ströme der beiden Brennstoffzellen der Biomassekonzentration proportional ist. Sie stellen die Theorie auf, daß möglicherweise nur der direkte Transfer der Elektronen von den Mikroorganismen zur Elektrode die Stromdifferenz zwischen den beiden Elektroden hervorruft. Dem widersprechen die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.2 der Arbeit, in denen ebenfalls die Anode durch einen Dialyseschlauch vom Fermentationsmedium getrennt wurde. Das Stromsignal im Versuch ohne Dialyseschlauch ist mit 4,5 μA höher als im Versuch mit Dialyseschlauch (3,3 μA). Eine Ursache für die Verringerung des Stromsignals könnte sein, daß das Einfügen des Dialyseschlauchs die Strömungsverhältnisse vor der Platinanode verändert. Dadurch vergrößert sich die Diffusionsgrenzschicht, was ein Grund für

die Verkleinerung des Stromsignals wäre. Außerdem wirkt sich vermutlich die Zunahme der Konzentration der Biomasse im Medium auch auf die Durchlässigkeit der Dialysemembran aus, da die meisten Mikroorganismen dazu neigen, sich auf Oberflächen anzuhafte und Biofilme auszubilden. Der in der Arbeit verwendete Dialyseschlauch hat eine nominelle Ausschlußgrenze für Moleküle größer 10 kDa. Dadurch ist kein direkter Kontakt zwischen den Mikroorganismen und der Elektrodenoberfläche der Anode und damit auch kein direkter Elektronentransfer möglich. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die Mikroorganismen allein, sondern vor allem elektroaktive Substanzen, die den Dialyseschlauch passieren können, die Ursache für das Stromsignal sein müssen.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Biobrennstoffzelle

Die Biobrennstoffzelle hat ihre Funktionsfähigkeit bei allen getesteten Anwendungen gezeigt. Das gilt sowohl für aerobe als auch für anaerobe Prozesse, für rein synthetische Medien, wie einem Mineralmedium, für komplexe Medien, wie Apfelsaft, und sogar für Klärschlämme.

Es konnten keine Einschränkungen für den Einsatz der Biobrennstoffzelle gefunden werden. Lediglich bei Versuchen mit starker Gasentwicklung hat sich die Notwendigkeit herausgestellt, der Biobrennstoffzelle eine Blasenfalle vorzuschalten, da es sonst zu Schwankungen des Stromsignals kommt.

Für die meisten Einsatzmöglichkeiten sollte die Biobrennstoffzelle speziell optimiert werden. Wie z. B. für die Überwachung der biologischen Aktivität von Klärschlamm für die der Innendurchmesser der Biobrennstoffzelle erhöht werden sollte, um ein Verstopfen zu vermeiden. Für die Versuche mit tierischen Zellen ist es aufgrund der Empfindlichkeit der Zellen notwendig, die Versorgung der Biobrennstoffzelle mit dem biologischen Material weiter zu optimieren. Aber auch eine Immobilisierung der Mikroorganismen in der Biobrennstoffzelle ist denkbar. Dies wäre günstig, wenn nicht online überwacht werden soll, z. B. in einem Schnelltest zu Angäreigenschaften von Säften und Weinen, Qualität von Medien oder in Einwegsensoren für Toxizitätstests.

Interessant sollten für zukünftige Anwender besonders auch die Ergebnisse mit *Penicillium* sein. Da bei *Penicillium* erst nach erfolgtem Wachstum die Penicillinproduktion einsetzt und die mycelartigen Strukturen des Penicilliumpilzes die klassischen Meßmethoden, wie z. B. die Messung der optischen Dichte erschweren oder verhindern, ermöglicht nur eine echte Aktivitätsmessung, Auskunft über den Stand der Produktion des Penicillins zu erhalten. Bis jetzt erfolgten Aussagen über die Aktivität im Penicilliummycel meist über zeitaufwendige offline-Probenahmen.

Ein konzeptioneller Ansatz wäre, Fermentationslösung ohne Mycel durch die Biobrennstoffzelle zu pumpen. Da gezeigt wurde, daß kein Kontakt zwischen Mikroorganismus und Elektrode notwendig ist, sollte es ausreichen, kontinuierlich Fermentationslösung ohne die Organismen durch die Biobrennstoffzelle zu pumpen.

Der Einsatz der Biobrennstoffzelle ist zur Überwachung der mikrobiellen Stoffwechselaktivität bei einer großen Zahl von verschiedenen Mikroorganismen und daraus folgend verschiedenen Anwendungen denkbar. Damit kann dieser auf einer Biobrennstoffzelle basierende bioelektrochemische Sensor eine zukünftige Alternative zu den bekannten Aktivitätssensoren darstellen.

6 Symbol-/Abkürzungsverzeichnis

Symbolverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| A | Fläche der Arbeitselektrode |
| C_L | Konzentration der Ausgangsionen im Inneren der Lösung |
| C_D | Konzentration der Ausgangsionen an der Elektrodenoberfläche ($x = 0$) |
| CO_2 | Kohlendioxid |
| CPR | Kohlendioxidproduktionsrate [$mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$] |
| D | Diffusionskoeffizient |
| D | Verdünnungsrate |
| D_C | kritische Verdünnungsrate |
| D_{opt} | optimale Verdünnungsrate mit maximalem Bakterienenertrag |
| d | Dicke der Diffusionsgrenzschicht |
| F | Faradaysche Konstante |
| F | Zuflußrate [$l \cdot h^{-1}$] |
| f_E | Volumenstrom des eintretenden Gases [$l \cdot h^{-1}$] |
| I_{grenz} | Diffusionsgrenzstrom |
| pO_2 | Gelöstsauerstoffgehalt |
| q_{Gl} | spezifische Glucoseaufnahme rate [$mmol \cdot g_{BTM}^{-1} \cdot h^{-1}$] |
| q_s | spezifische Substrataufnahme rate [$mmol \cdot g_{BTM}^{-1} \cdot h^{-1}$] |
| Q_{CO_2} | auf das Flüssigphasenvolumen bezogene Transferrate des Kohlendioxids [$mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$] |
| Q_{O_2} | auf das Flüssigphasenvolumen bezogene Transferrate des Sauerstoffs [$mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$] |
| U_{soll} | Sollspannung |
| V | Arbeitsvolumen des Fermenters |
| V_M | Molvolumen der Gase 22,41 l·mol |
| V_R | Arbeitsvolumen |
| X | Biomasse |
| $x_{O_2}^E$ | Molenbruch des Sauerstoffs im Gaseintritt |
| $x_{O_2}^A$ | Molenbruch des Sauerstoffs im Gasaustritt |
| $x_{CO_2}^E$ | Molenbruch des Kohlendioxids im Gaseintritt |
| $x_{CO_2}^A$ | Molenbruch des Kohlendioxids im Gasaustritt |
| $Y_{P/S}$ | Produktionskoeffizient |

| | |
|-------------|---|
| $Y_{X/S}$ | Substratertragskoeffizient |
| z | Anzahl der an der Elektrodenreaktion beteiligten Elektronen |
| μ | spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |
| μ_{max} | maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}] |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| AE | Arbeitselektrode |
| Ag/AgCl | Silber/Silberchlorid |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BHK | Baby Hamster Kidney |
| bidest. | bidestilliert |
| BTM | Biotrockenmasse |
| CHO | Chinese Hamster Ovary |
| DMEM | Dulbeccos Modified Eagles Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNP | 2,4-Dinitrophenol |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| GE | Gegenelektrode |
| g | Gramm |
| h | Stunden |
| HNQ | 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| ln | natürlicher Logarithmus |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| MV | Magnetventil |
| Mol | Mol |
| nA | Nanoampere |
| NADH | Nicotinamid-adenin-dinucleotid |
| NAD(P)H | Nicotinamid-adenin-phospho-dinucleotid |
| O ₂ | Sauerstoff, molekular |
| OD | optische Dichte |
| ox | oxidiert |
| P | Pumpe |
| P | Produktmenge |
| PTFE | Polytetrafluoroethylen |
| PPV | pneumatisches Probenahmeventil |
| PVC | Polyvinylchlorid |

| | |
|---------------|---|
| RE | Referenzelektrode |
| red | reduziert |
| S | Substratmenge |
| t | Zeit |
| TEF | Trübungseinheiten bezogen auf Formazin-Standardsuspension |
| U | Units |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| μA | Mikroampere |

7 Anhang

7.1 Verwendete Meßmethoden

7.1.1 Messung der Glucosekonzentration

Die Bestimmung der Konzentration der D-Glucose erfolgt mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select der Firma Yellow Springs Instruments (Kassel). Der Analyt wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Dieses wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelluloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert.

Die Kalibrierung des Analysators erfolgt mit Hilfe einer Standardlösung der Glucosekonzentration 2 g/l.

7.1.2 Messung der Gesamtzuckerkonzentration

Mit dieser Methode werden nur reduzierende Zucker erfaßt. Das heißt, Glucose und Fructose können bestimmt werden (s. Kap. 4.3.3), während z. B. Saccharose nicht erfaßt wird.

Reagenz 1: 4 g p-Hydroxybenzoesäurehydrazid
20 ml konzentrierte HCl, mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

Reagenz 2: 40 g NaOH
9,3 g Na_2 EDTA, mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

Die Probe ist zu verdünnen, so daß die Konzentration an reduzierenden Zuckern unter 1 g/l liegt. Leerwert und Probe werden zunächst in einem Reagenzglas angesetzt.

Leerwert

3 ml Reagenz 1
3 ml Reagenz 2
0,5 ml bidest. Wasser

Probe

3 ml Reagenz 1
3 ml Reagenz 2
0,5 ml Probelösung

Probe und Leerwert werden 10 s gemischt, 5 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt, 10 min in Eiswasser abgekühlt. Anschließend werden Probe und Leerwert in Küvetten (Schichtdicke 10 mm) umgefüllt. Im Zweistrahlphotometer wird die Extinktionsdifferenz bei 410 nm bestimmt.

Die Kalibrierung erfolgte mit Glucosestandardlösungen.

| Glucosekonzentration C [g/l] | ΔE (410 nm) gegen Leerwert |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 0 |
| 0,20 | 0,49 |
| 0,40 | 1,00 |
| 0,60 | 1,47 |
| 0,80 | 1,85 |
| 1,00 | > 2 |

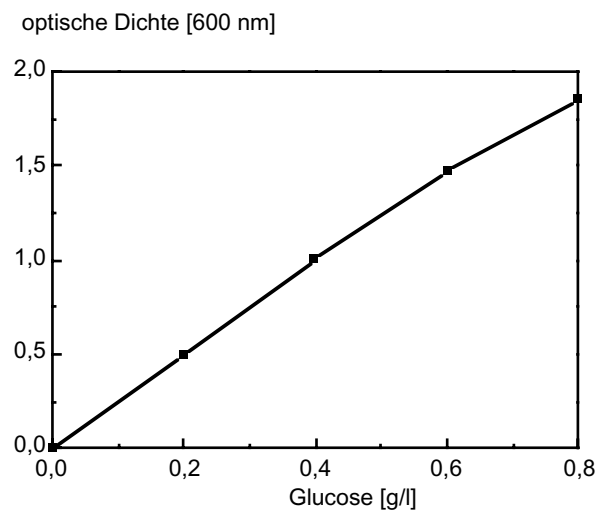


Abb. 48: Kalibrierkurve der Testmethode zur Konzentrationsbestimmung von reduzierenden Zuckern in Lösungen

Bis zu einer Konzentration von 0,6 g/l Glucose, läßt sich die Abhängigkeit von ΔE von der Glucosekonzentration C durch folgende Funktion ausdrücken:

$$C = \frac{\Delta E \cdot 0,6}{1,47} \cdot V \quad (15)$$

C - Konzentration reduzierender Zucker [g/l]

V - Verdünnungsfaktor der Probelösung

Bei höheren Konzentrationen an reduzierenden Zuckern als 0,6 g/l in der Probelösung, läßt die Genauigkeit der Näherungsgleichung stark nach.

7.1.3 Messung der Ethanolkonzentration

Die Konzentration an Ethanol wurde gaschromatographisch bestimmt. Die Durchführung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Technische Chemie (Universität Hannover) und ist bei Marose (1999) ausführlich beschrieben.

7.1.4 Messung der optischen Dichte

Offline

Die optische Dichte (OD_{590}) der Kulturlösung, ein Maß für die Zelldichte, wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 590 nm in einem Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Kulturprobe wird vor der Messung mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung so verdünnt, daß die gemessene Absorption den Wert von 0,8 nicht übersteigt. In einer 1,5 ml Quarzküvette (oder Einweg) mit 1 cm Schichtdicke wird dann bei 25°C gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung die Extinktion gemessen. Die NaCl-Lösung kann hier als Referenz verwendet werden (Nullabgleich), da entsprechend verdünntes, zellfreies Kulturmedium bei der eingestellten Wellenlänge eine zu vernachlässigende Absorption besitzt. Es werden jeweils zwei Parallelbestimmungen durchgeführt, um Verdünnungsfehler zu minimieren.

Online

Die optische Dichte (OD_{590}) der Kulturlösung wird während der Kultivierung als Extinktion online bei einer Wellenlänge von 590 nm im Photometer mit Hilfe einer Durchflußküvette der Schichtdicke 0,2 mm gemessen (Photometer Fa. Pharmacia, Freiburg). Diese Küvette befindet sich im Bypass. Die Werte können auch nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnung und Schichtdicke nicht mit den Offline-Daten gleichgesetzt werden, da vor dem Animpfen das Photometer auf eine OD_{590} von Null gesetzt wird.

7.1.5 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgt gravimetrisch. Dazu werden je Probe 10 ml Kulturlösung in Falcon-Gefäße (50ml, Fa. Greiner, München) mit bekanntem Leergewicht gefüllt, mit 10 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt, um

möglichst alle löslichen Bestandteile in den Überstand zu überführen und in einer Zentrifuge (Fa. Beckmann, Modell J2-21, Rotor JA-14) 20 min bei 6000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Nach Trocknung des Zellpellets im Trockenschrank bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz (24 h) wird das Falcon-Gefäß erneut ausgewogen. Die Biotrockenmasse ergibt sich aus der Massendifferenz zwischen dem gefüllten und dem leeren Falcon-Gefäß.

7.1.6 Darstellung der Biomasse durch die optische Dichte

Um den Zusammenhang zwischen optischer Dichte bei 600 nm und Biomasse zu erfassen, wurde ein Versuch mit *E. coli* durchgeführt.

Im Mineralmedium mit einer Mediatorkonzentration von 0,2 mM und einer Glucosekonzentration von 5 g/l wurden der Fermentation in regelmäßigen Abständen 10 ml Proben entnommen, filtriert, gewaschen und die Biotrockenmasse bestimmt.

Zeitgleich wurde die Absorption bei 600 nm in einer Durchflußküvette gemessen. Der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung entsprach Kapitel 3.2.3.2.

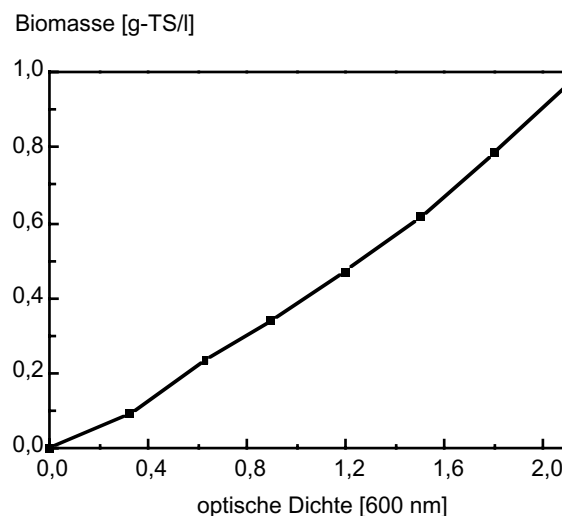


Abb. 49: Darstellung der Biomasse durch die optische Dichte bei 600 nm in Mineralmedium

Mit Hilfe einer Näherungsgleichung ist es möglich, die Abhängigkeit der Biomasse von der optischen Dichte zu beschreiben.

$$\text{Biomasse[g-TS/l]} = 0,07 \cdot (\text{OD}[600\text{nm}])^2 + 0,31 \cdot (\text{OD}[600\text{nm}]) \quad (16)$$

Diese Gleichung wurde in allen Versuchen mit *E. coli* in Mineralmedium zur Umrechnung der optischen Dichte in die Biomasse verwendet.

7.1.7 Messung der Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl

Die Zellzahl pro Milliliter wird durch Zählen der Zellen unter einem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Helber-Kammer für Bakterien und einer Neubauer-Kammer für Hefen ermittelt. Die Proben werden mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung so verdünnt, daß sich in einem Großquadrat etwa 50-100 Zellen befinden. Die Zellzahlbestimmung der tierischen Zellen erfolgte in einer Thoma-Kammer. Die Unterscheidung von lebenden und bereits abgestorbenen Zellen erfolgte durch Trypan-Blau Färbung. Die bei den toten Zellen bereits permeabilisierte Zellmembran läßt den Farbstoff in die Zelle eindringen, wodurch die toten Zellen blau erscheinen.

Die noch lebenden Zellen werden nicht gefärbt und erscheinen unter dem Mikroskop gelblich.

Die Gesamtzellzahl wurde mit der Zellkernmethode bestimmt, bei der die Zellen durch eine Lösung aus Citronensäure, Triton X-100 und Kristallviolett aufgelöst und die Zellkerne blau gefärbt werden. Diese werden dann ebenfalls in einer Thoma-Kammer unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung gezählt.

7.1.8 Messung der Sauerstoff- und der Kohlendioxidkonzentration im Abgas

Die Abgasanalyse wurde mit dem EGAS 1 der Firma Hartmann & Braun (Frankfurt a. M.) durchgeführt. Das Gesamtsystem zur Meßgasaufbereitung besteht aus dem Meßgaskühler mit Kondensatauffanggefäß zum Trocknen des Meßgases, der Meßgasfördereinheit mit Überwachung von Fluß und Feuchtigkeit und den Analysegeräten zur Messung von Kohlendioxid und Sauerstoff.

Der Sauerstoffgehalt wird elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Der Sauerstoffsensoren nach dem Stromsondenprinzip besteht aus einer elektrochemischen Zelle mit röhrenförmigem Festelektrolyten aus sauerstoffionenleitender Zirkondioxidkeramik, auf dessen Innen- und Außenfläche poröse elektronenleitende Schichten als Elektroden (Hauptbestandteil Platin) aufgebracht sind. Der mit Yttriumoxid oder anderen Seltenerde-Oxiden dotierte Zirkondioxid-Festelektrolyt enthält in seinem Kristallgitter Sauerstoff-Leerstellen, die eine mit der Temperatur exponentiell zunehmende Sauerstoffionenleitfähigkeit ermöglichen. Oberhalb der Mindesttemperatur der Sonde (ca. 650°C) ist die Messung temperaturunabhängig. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 0,4-1,0 V wird in der rohrförmigen Zirkondioxid-Festelektrolytzelle ein Gleichstromsignal erzeugt, das der Sauerstoffionenkonzentration des zu messenden Gases direkt proportional ist.

Ein auf Kohlendioxid sensibilisiertes, einstrahliges IR-Photometer nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung

der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Die Bestimmung erfolgt nichtdispersiv bei spezifischen Wellenlängen (NDIR-Bestimmung). Strahlungsquelle ist ein unterkühlter Glühfaden (700°C). Die vom Strahler ausgehende IR-Strahlung wird durch eine von einem Synchronmotor angetriebenen Blende in intensitätsgleiche Anteile zerlegt, die abwechselnd die Analysenhälfte und die Vergleichshälfte (gefüllt mit kohlendioxidfreiem Gas) der zweigeteilten Küvetten durchstrahlen. Beide Strahlungsanteile treten in eine Doppelschicht-Absorptionskammer ein, die mit Kohlendioxid gefüllt ist. Die beiden Schichten stehen mit einem Membrankondensator in Verbindung. Kohlendioxid in der Analysenhälfte absorbiert die spezifische Strahlung, was zu einer proportionalen Auswölbung der Membran und damit eine entsprechende Kapazitätsänderung des Membrankondensators verursacht.

Die Kalibrierung der Analysegeräte erfolgt automatisch mit einer Kalibrationsküvette und Umgebungsluft, die mit Hilfe einer Absorptionsmittelpatrone von Wasser (mittels Blaugel) und Kohlendioxid (mittels Natriumhydroxid auf Träger) befreit ist oder manuell mit Eichgas der Zusammensetzung 1,94 % CO₂, 18,6 % O₂, Rest N₂.

7.1.9 Messung der Sauerstoffkonzentration im Medium

Die Messung erfolgte mit einer autoklavierbaren amperometrischen Sauerstoffelektrode (Mettler-Toledo, Gießen). Die Kalibrierung erfolgte direkt im Fermenter, einmal während der automatischen Kesselsterilisation (0%-Wert) und dann bei Luftsättigung (100%-Wert) unter den gewählten Kultivierungsbedingungen.

7.1.10 Messung der Trübung

Die Trübungssonde gibt ihr Signal in TEF (Trübungseinheiten bezogen auf Formazin-Standardsuspension) an. Die Kalibrierung erfolgte gemäß ISO 7027 für Streulichtmeßgeräte. Bei der Einheit TEF handelt es sich um eine gerätespezifische Größe.

7.1.11 Messung des Redoxpotentials

In den Versuchen zur Charakterisierung der Biobrennstoffzelle (s. Kap. 4.5) wurden die Arbeits- und die Referenzelektrode im stromfreien Zustand eingesetzt, um das sich an der Arbeitselektrode einstellende Redoxpotential der Lösung zu messen. Dieses gibt Auskunft über das Verhältnis von oxidierten zu reduzierten Substanzen und über den pH-Wert. Für das Redoxpotential gilt die Nernstsche Gleichung:

$$\varphi_0 = \varphi_{00} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \frac{\alpha_{\text{ox}}}{\alpha_{\text{red}}} \quad (17)$$

| | | | |
|----------------|-----------------------|-----------------------|--|
| φ_0 | Ruhepotential | z | Anzahl der an der Elektroden- reaktion beteiligten Elektronen |
| φ_{00} | Standardruhepotential | α_{ox} | Lösungsaktivität der oxidierten Substanz |
| F | Faradaysche Konstante | α_{red} | Lösungsaktivität der reduzierten Substanz |
| T | Absolute Temperatur | | |
| R | Gaskonstante | | |

Die Werte des Ruhepotentials ermöglichen, eine Aussage über das Verhältnis von oxidierten zu reduzierten Substanzen zu machen, nicht jedoch über ihre Konzentration.

7.1.12 Messung des pH-Wertes

Zur Messung des pH-Wertes wird eine sterilisierbare Einstabmeßkette (Fa. Mettler-Toledo, Gießen) verwendet, die mit der Steuereinheit eines Biostat B-Fermenters (B. Braun AG, Melsungen) verbunden ist. In dieser befinden sich eine Glas- und eine Vergleichselektrode, die zusammen eine galvanische Kette bilden. Die eigentliche Meßgröße ist die Spannung (Summe der Grenzflächenpotentiale in der Lösung), die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Der Zusammenhang zwischen der Spannung und dem pH-Wert ist über die Nernstsche Gleichung gegeben.

Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgt mit zwei Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0).

7.1.13 Fluoreszenzmessung

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht die Messung der Fluoreszenzintensität von Fluorophoren über das gesamte Fluoreszenzspektrum bei gleichzeitiger Variation von Anregungs- und Emissionswellenlängen (Stärk, 1997). In der Arbeit erfolgten Versuche mit einem Fluoreszenzsensor, BioView. Einer Neuentwicklung der DELTA Light & Optics, Dänemark und der Technischen Universität Hannover (Marose et al., 1998). Er gestattet die online Messung der Kulturfluoreszenz. Zu vergleichenden Betrachtungen wurde die tryptophanabhängige und NAD(P)H-abhängige Kulturfluoreszenz herangezogen.

7.2 Kulturmedien

7.2.1 *Escherichia coli*

7.2.1.1 Vollmedium

Die Wachstumsversuche mit *E. coli* in Vollmedium erfolgten bei 37°C.

Das Vollmedium bestand aus:

| | |
|-----------------|-----------|
| Glucose | 5,0 g/l |
| Pepton | 10,0 g/l |
| Hefeextrakt | 5,0 g/l |
| NaCl | 5,0 g/l |
| Tris/HCl-Puffer | |
| 1 M, pH 7,4 | 10,0 ml/l |

Die Medienbestandteile sind in destilliertem Wasser gelöst und anschließend 20 min bei 121°C autoklaviert. Danach ist die Glucose dem autoklavierten Medium sterilfiltriert zugegeben.

Das Vollmedium ist mit einem Puffer 1 M, nach Sørensen (Klein, 1979), bestehend aus 121 g/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, hergestellt.

Der pH-Wert wurde mit 10 M Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Das Autoklavieren der Pufferlösung erfolgte für 20 min bei 121°C.

7.2.1.2 Mineralmedium

Das Mineralmedium (M9-Medium) bestand aus:

Lösung 1:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ | 6,0 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 3,0 g/l |
| NaCl | 0,5 g/l |
| NH ₄ Cl | 1,0 g/l |

Lösung 2:

| | |
|-----------------------------|----------|
| MgSO ₄ , 1 mol/l | 2,0 ml/l |
|-----------------------------|----------|

Lösung 3:

| | |
|-------------------------------|----------|
| CaCl ₂ , 0,1 mol/l | 1,0 ml/l |
|-------------------------------|----------|

Die Lösungen wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Glucose wurde dem Medium in der für den Versuch notwendigen Konzentration sterilfiltriert zugegeben.

7.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

7.2.2.1 Universalmedium

Für Wachstumskontrollen der Hefe *S. cerevisiae* wurde das von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH vorgeschlagene Medium 186 DSM verwendet.

Es bestand aus:

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Glucose | 5,0 g/l |
| Hefeextrakt | 3,0 g/l |
| Malzextrakt | 3,0 g/l |
| Pepton | 5,0 g/l |
| Citratpuffer 0,1 M, pH 5 | 10,0 ml/l |

Der Citratpuffer 0,1 M mit einem pH-Wert von 5,0 wurde nach Sørensen (Klein, 1979) hergestellt. Die Glucose wurde dem autoklavierten Medium sterilfiltriert zugegeben.

Er besteht aus:

Lösung 1:

| | |
|---------------|-----------|
| Citronensäure | 0,1 mol/l |
| NaOH | 0,2 mol/l |

Lösung 2:

| | |
|------|-----------|
| NaOH | 0,1 mol/l |
|------|-----------|

960 ml von Lösung 1 wurden mit 40 ml von Lösung 2 vermischt und dann 20 min bei 121°C autoklaviert.

7.2.2.2 Vollmedium

Die Stammhaltung von *S. cerevisiae* H 620 erfolgte in Schrägagarröhrchen. Als Medium wurde

| | | |
|-------------|----------|------------|
| Glucose | 4,0 g/l | |
| Hefeextrakt | 4,0 g/l | |
| Malzextrakt | 10,0 g/l | |
| Agar-Agar | 15,0 g/l | verwendet. |

7.2.2.3 Mineralmedium

Als Medium wurde BACTO Hefe-Stickstoff (Basis) mit 67 g/l verwendet.

Die abgewogene Menge wurde mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.

Die Glucose wurde dem Medium in der für den Versuch notwendigen Konzentration sterilfiltriert zugegeben.

7.2.2.4 Saft als Medium

Der Traubensaft wurde von der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie, zur Verfügung gestellt. Der pH-Wert des Saftes betrug 3,4. Er war geklärt und enthielt 110 g/l Gesamtzucker und davon annähernd im gleichen Verhältnis Glucose und Fructose. In Traubensaft ist keine Saccharose enthalten.

Ebenfalls wurde ein nur teilweise geklärter Apfelsaft (Bauer naturtrüber Bioapfelsaft) verwendet. Er wurde käuflich in einem Getränkemarkt erworben. Dieser Apfelsaft aus kontrolliertem biologischen Anbau hatte einen pH-Wert von 3,6. Er hatte einen Gesamtzuckergehalt von 100 g/l und davon 15 g/l Saccharose.

Desweiteren wurde ein klarer Apfelsaft aus Konzentrat der Handelskette 'Plus' verwendet. Er hat einen pH-Wert von 3,5 und einen Gesamtzuckergehalt ca. 100 g/l bestehend aus Glucose, Fructose und Saccharose.

7.2.2.5 Schatzmann-Medium

| | Substanz | Konzentration [g/l] |
|----------------|--|------------------------|
| Komponenten | Glucose | 30 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 4,5 |
| | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 1,9 |
| | KCl | 0,9 |
| Mineralsalzlg. | MgSO ₄ *7H ₂ O | 0,34 |
| | CaCl ₂ *2H ₂ O | 0,42 |
| | FeCl ₃ *6H ₂ O | 1,5_10 ⁻² |
| | ZnSO ₄ *7H ₂ O | 0,9_10 ⁻² |
| | MnSO ₄ *2H ₂ O | 1,05_10 ⁻² |
| | CuSO ₄ *5H ₂ O | 0,24_10 ⁻² |

| | | |
|-------------|----------------|----------------------|
| Vitaminlsg. | m-Inosit | $6,0 \cdot 10^{-2}$ |
| | Ca-Pantothenat | $3,0 \cdot 10^{-2}$ |
| | Thiamin*HCl | $0,6 \cdot 10^{-2}$ |
| | Pyridoxol*HCl | $0,15 \cdot 10^{-2}$ |
| | Biotin | $0,3 \cdot 10^{-4}$ |

Es wurde eine Mineralsalzlösung und eine Vitaminlösung mit der jeweils 1000-fachen Konzentration angesetzt, die für alle Hefekultivierungen verwendet wurden. Die Mineralsalz- und Vitaminlösung wurden in destilliertem Wasser angesetzt. Für die Vorkultur wurden die Komponenten und 5,8 g/l Na-Citrat (bis auf Glucose) in 450 ml H₂O gelöst und der pH-Wert der Lösung mit konzentrierter H₂SO₄ auf pH 2 eingestellt. Nach der Zugabe von 0,5 ml der Mineralsalzlösung und dem Einstellen der Lösung auf pH 4 wird diese 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Glucose wird in 48 ml H₂O gelöst und 0,5 ml der Vitaminlösung hinzugegeben und vor dem Animpfen steril injiziert. Das Herstellen der Hauptkultur ist analog zum Ansetzen der Vorkultur mit dem Unterschied, daß in der Hauptkultur Na-Citrat nicht verwendet wird.

7.2.3 *Penicillium chrysogenum*

7.2.3.1 Malzextraktmedium

Für Wachstumskontrollen von *P. chrysogenum* wurde Malzextraktmedium aus 30 g/l Malzextrakt verwendet.

Die abgewogenen Medienbestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend 20 min bei 121°C autoklaviert.

7.2.4 Tierische Zellen

7.2.4.1 DMEM/Ham`s F12-Nut-Mix

Zur Kultivierung der BHK-Zellen (Baby Hamster Kidney) wurde das Medium DMEM/Ham`s F12-Nut-Mix verwendet. Die Zusammensetzung ist im Katalog von Life Technologies 1996-97; Produktkatalog für die Zellkultur beschreiben. Es wurde mit D-Galaktose, Na-bicarbonat, Hy-Soy, Pluronic (Antischaummittel), Dextran, Vitamin K1 und Fe-Citrat supplementiert.

7.2.4.2 BioPro 1-Medium

Zur Kultivierung der CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) wurde das niedersupplementierte und proteinarme BioPro 1-Medium der Firma BioWittaker (Zusammensetzung unbekannt) verwendet. Dieses glucose- und glutaminfreie Medium wurde zusätzlich mit 3,6 g Glucose und 0,3 g Glutamin supplementiert.

7.3 Mediatorlösung

Der Mediator ist thermisch instabil und adsorbiert am Filtermaterial von Nitrocellulose-Sterilfiltern. Zur Vereinfachung wurde die Menge des Mediators in den meisten Versuchen auf der Analysenwaage eingewogen und direkt unsteril in das Fermentationsgefäß überführt.

Einzig bei den Messungen der tierischen Zellen mit dem Dreielektrodensystem und den diskontinuierlichen Messungen mit der Biobrennstoffzelle, wurde der Fermentationslösung eine Mediatorlösung zugesetzt. Dafür wurde eine 0,4 mM und 1 mM Mediatorlösung in destilliertem Wasser hergestellt. Die Mediatorlösung für die Versuche mit den tierischen Zellen wurde sterilfiltriert. Die 1 mM Lösung enthält die maximal in Wasser lösliche Konzentration an Mediator.

Bedingt durch die oben genannten Eigenschaften des Mediators kommt es durch das Filtrieren zu geringfügigen Konzentrationsabweichungen.

7.4 Phosphatpuffer für das Dreielektrodensystem

Der für die Versuche mit dem Dreielektrodensystem erforderliche 1 M Phosphatpuffer pH 7,5 wurde nach Sörensen (Klein, 1979), bestehend aus

Dinatriumhydrogenphosphat 311,6 g/l und

Kaliumdihydrogenphosphat 17,7 g/l angesetzt.

Die Pufferlösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert und anschließend in den Versuchen 0,1 M eingesetzt.

Die Sauerstofffreiheit wurde erreicht, indem über die Dauer von 1 h der Phosphatpuffer gleichzeitig gerührt und mit Stickstoff begast wurde.

7.5 Medienbestandteile

- BACTO Hefe-Stickstoff (Basis), Lot 85 622, JD DIFCO Laboratories, USA-Detroit
- Hefeextrakt, Art. 2363.2, Roth, Karlsruhe
- Malzextrakt, Art. 5391 und Lot 46H 1266, Merck und Sigma, Darmstadt und USA-St. Louis
- Pepton aus Casein, Art. 8952.2, Roth, Karlsruhe

- R2A Agar, Lot 78 169, JC DIFCO Laboratories, USA-Detroit
- D(+)-Glucose (Monohydrat), Art. 8346 Merck, Darmstadt
- D(-)-Fructose, 47745, Fluka, Buchs
- Lactose (Monohydrat), Art. 7657 Merck, Darmstadt
- D-Sorbit, Art. 6213.1, Roth, Karlsruhe

7.6 Chemikalien

- Antischaummittel CONTRASPUM 300, Chemische Fabriken, Lahnstein
- Antischaummittel Wacker-Silikon, Wacker Chemie GmbH, München
- 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon, No. H-0508, Sigma, USA-St. Louis
- CaCl_2 (Dihydrat), Art. 2382, Merck, Darmstadt
- Citronensäure (Monohydrat), Art. 5110.2, Roth, Karlsruhe
- CuSO_4 (Pentahydrat), Art. 2790, Merck, Darmstadt
- Dinitrophenol, Art. 42160, Fluka, Buchs
- HCl (konz.), Art. 4625.2, Roth, Karlsruhe
- KH_2PO_4 , 60218, Fluka, Buchs
- MgSO_4 (Heptahydrat), Art. 5882, Merck, Darmstadt
- Natriumazid, Art. 71290, Fluka, Buchs
- Na_2HPO_4 (Dodecanhydrat), Art. 6579, Merck, Darmstadt
- NaCl, 71381, Fluka, Buchs
- Natriumhydroxid (Plätzchen), Art. 6498, Merck, Darmstadt
- NH_4Cl , 09711, Fluka, Buchs
- Ortho-Phosphorsäure (konz.), Art. 573, Merck, Darmstadt
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Art. 4855, Roth, Karlsruhe

7.7 Elektrodenmaterialien und Biobrennstoffzellenzubehör

- Platin, Goodfellow, Bad Nauheim
- platinisiertes Titan, Permascand, Schweden
- Graphit, Deutsche Carbone AG, Frankfurt am Main
- Glaskohlenstoff, Sigradur G, HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH, Thierhaupten
- Edelstähle 1.4529, 1.4571, Nicrofer
- Sauerstoffdiffusionskathode, Sonderanfertigung der Universität Gesamthochschule Kassel, Kassel
- 2-Komponentenkleber, Praktikus, Grevenbroich

- Dialyseschlauch Thomapur „Standard“, Typ: RCT 88-09, Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg
- digitales Multifunktions-Zeitrelais, RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf
- Digitalmultimeter und Meßwerterfassungssoftware, Typ Keithley 2000, Keithley, Germering
- Computer Pentium® 100 MHz / 32 MB Arbeitsspeicher, Meßwerterfassungssoftware für Digitalmultimeter Keithley 2000 bzw. Test-Point , M. Bliefernicht EDV-Systeme, Mainz

7.8 Geräte

250-ml-Fermentationsgefäß,

Spezialanfertigung der Firma Fischer, Frankfurt am Main, bestehend aus

Zylindrisches Glasgefäß Innendurchmesser 65 mm

Außendurchmesser 75 mm

Wand-/Bodenstärke 5 mm

Höhe 73 mm

Konischer Aufsatz: Innendurchmesser 65 mm

Außendurchmesser von 75 mm auf 100 mm steigend

Höhe 22 mm

zentrisch Dichtfuge 4,5 mm

Glasdeckel Durchmesser 100 mm

Höhe 6 mm

5 x Normschliff NS 14

Schnellverschluß DN 60

O-Ring Silikon DN 60

5 Tauchrohre mit integriertem Zulauf NS 14

Tygon für Nahrungsmittel Schläuche, Cole-Parmer Instrument Co., USA-Illinois

6,6-l-Tierzellfermenter

5 l Arbeitsvolumen, Biostat B, B. Braun AG, Melsungen

2-l-Fermenter

1,5 l Arbeitsvolumen, Biostat M, B. Braun AG, Melsungen

40-l-Fermenter

25 l Arbeitsvolumen, LP 351, Fa. Bioengineering, CH-Wald

Weitere verwendete Geräte

-
- Cleanbench, Gelaire BSB 4 Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
 - Spektralphotometer mit Steuer- und Auswerteprogramm Q-Quant, Spectronic 1201, Milton Roy Instruments, Obertshausen
 - Durchflußküvette, 178.010-QS, Helma GmbH & Co., Müllheim
 - Schläuche Tygon, Cole-Parmer International, USA-Illinois
 - Sauerstoffmeßgerät OXI 530, WTW, Weilheim
 - pH-Meter pH522, WTW, Weilheim
 - Elektronicrührer Mono, Variomag, Roth, Karlsruhe
 - Thermostat U3, Julabo, Seelbach
 - temperierbarer Rundschüttler, Certomat H+R, B. Braun AG, Melsungen
 - Wasserbad 7A, Julabo, Seelbach
 - Schwebekörperdurchflußmesser 0,8-8 l/h, Krohne, Duisburg
 - Pumpe mit Pumpenkopf L/S-Standard, Masterflex 7523-35, Cole-Parmer, USA - Illinois
 - Potentiostat/Galvanostat PS 6 mit Steuer- und Auswerteprogramm PS-Remote Version 2.2, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg
 - Schreiber 5-Kanal Servogor 460, BBC, Nürnberg
 - Sauerstoffelektrode, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt
 - pH-Elektrode, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt
 - Einstabmeßkette (Ag/AgCl/Platin), Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg
 - Platinblechelektrode, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt
 - Zentrifuge, Centrikon H401, Kontron Instruments, Gosheim

7.9 Technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle

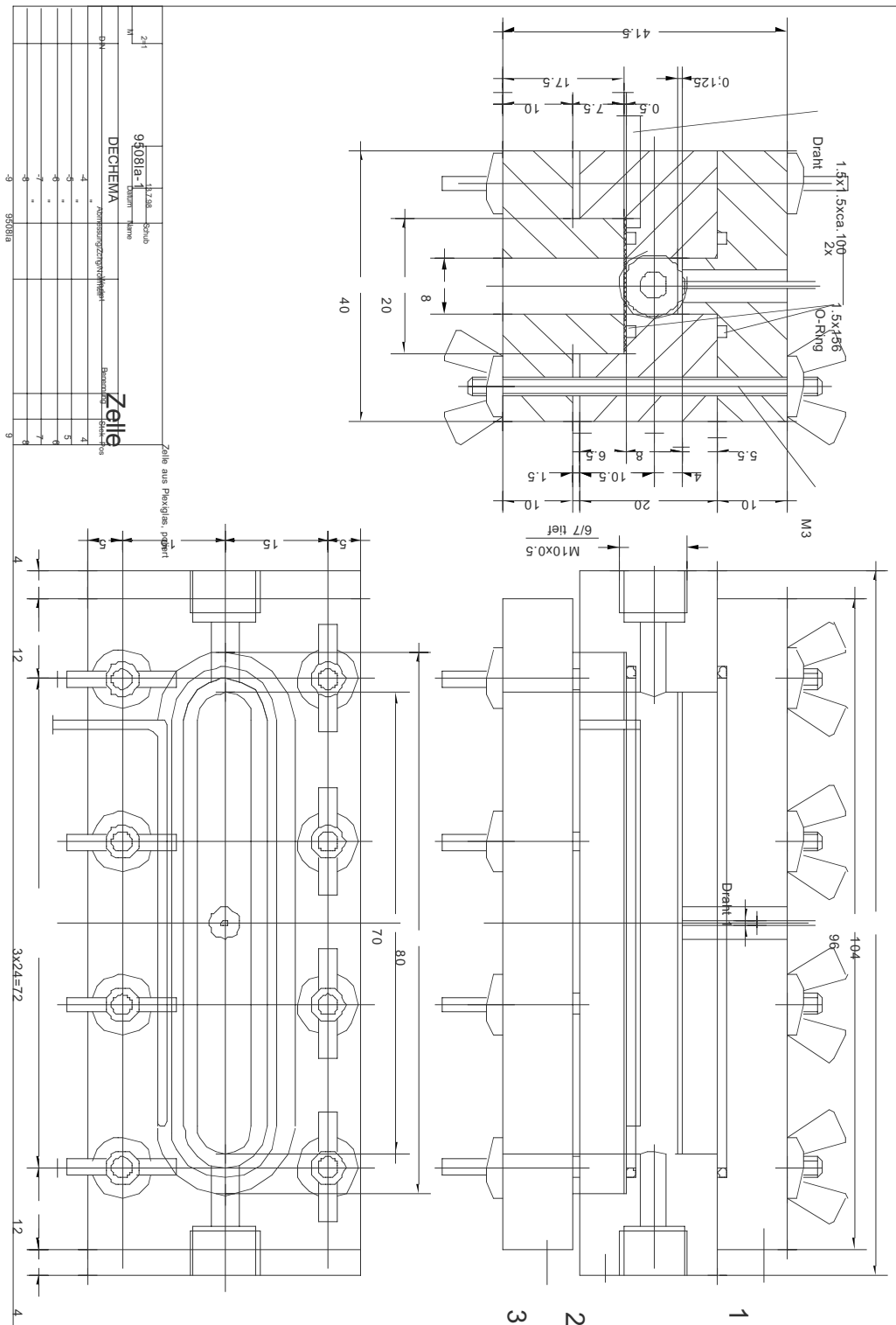


Abb. 50: Technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle (Gesamtansicht)
 1 - Außenteil A, 2 - Mittelstück, 3 - Außenteil B

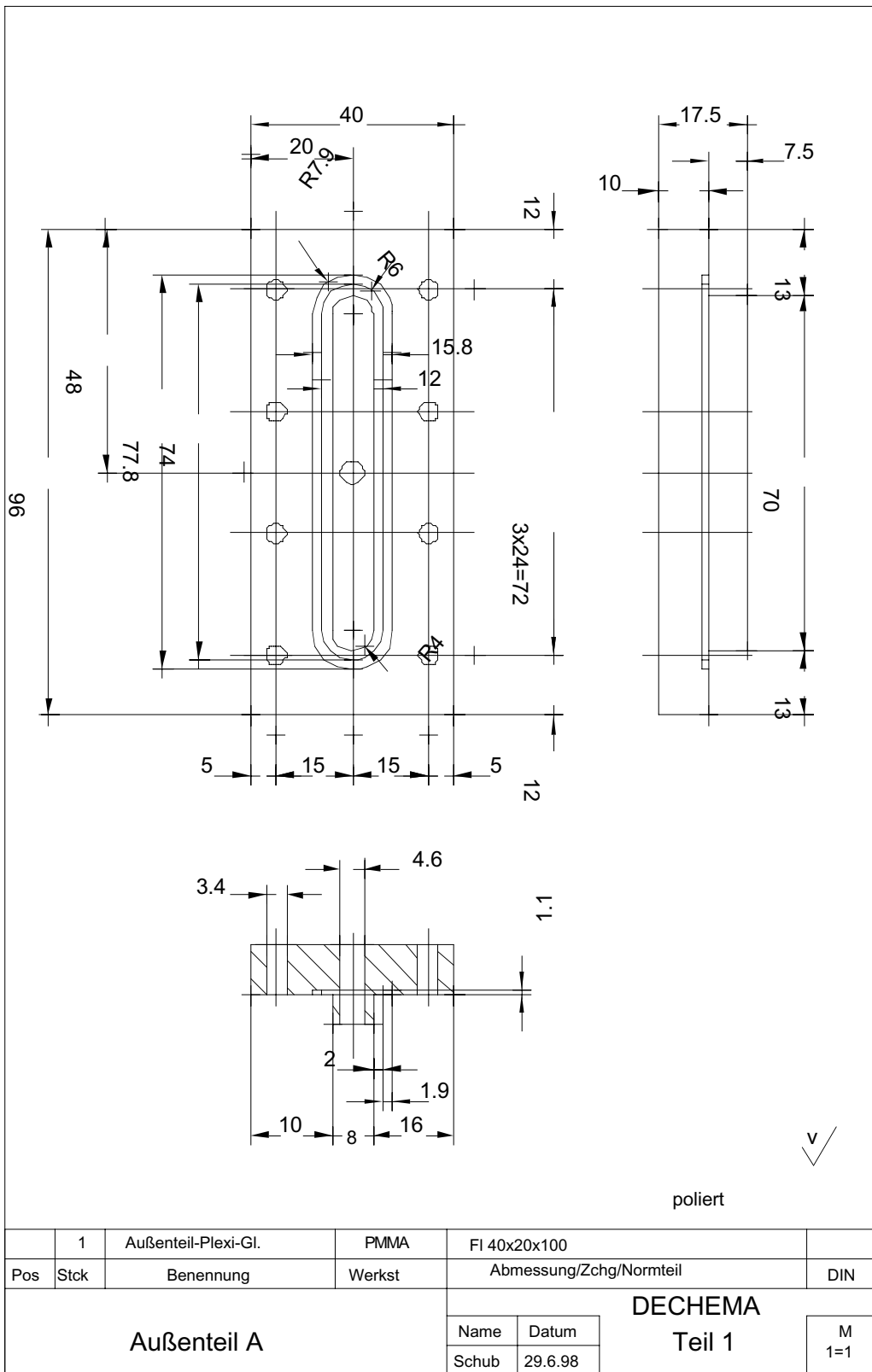


Abb. 51: Technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle (Außenteil A)

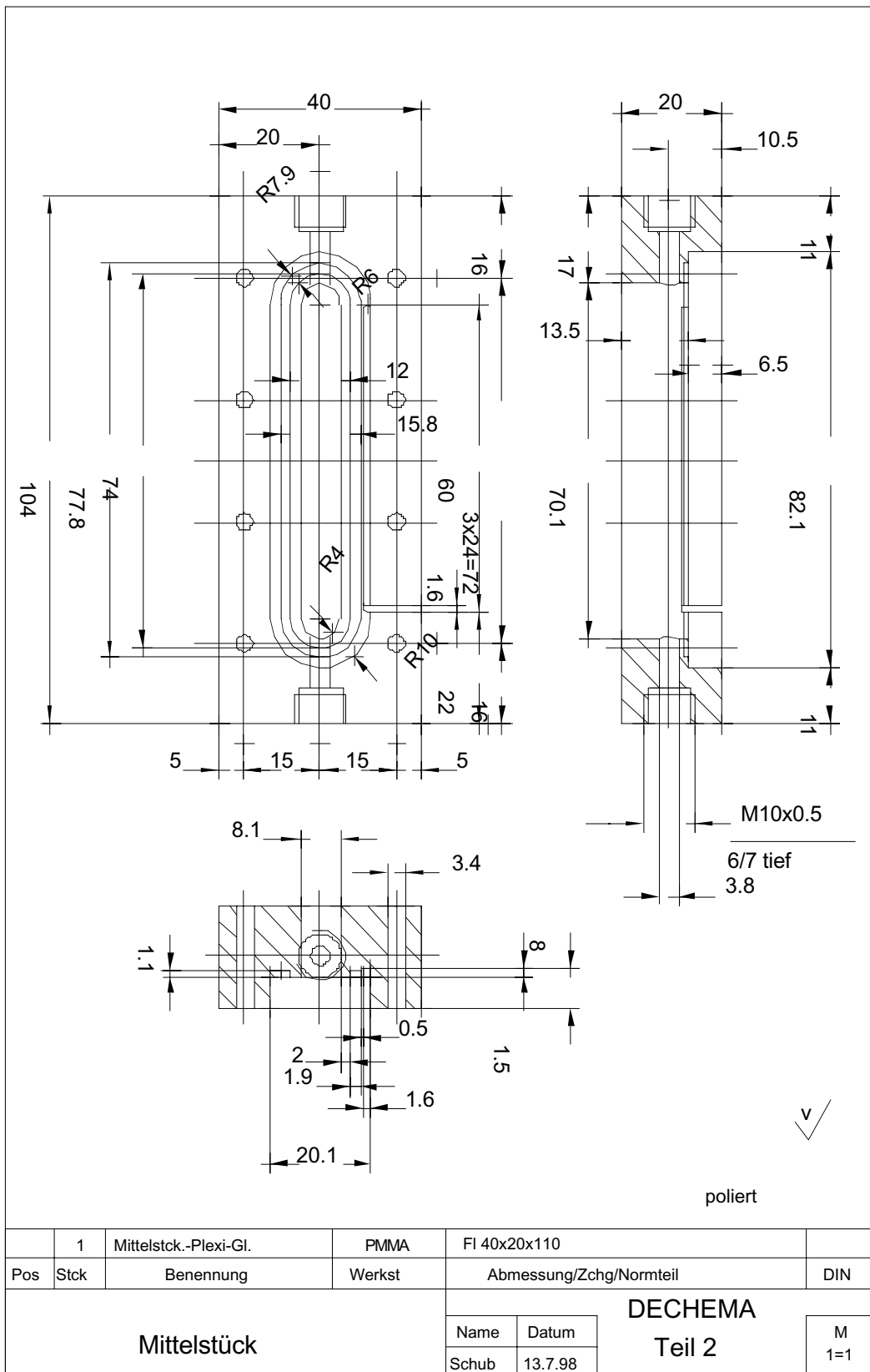


Abb. 52: Technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle (Mittelstück)

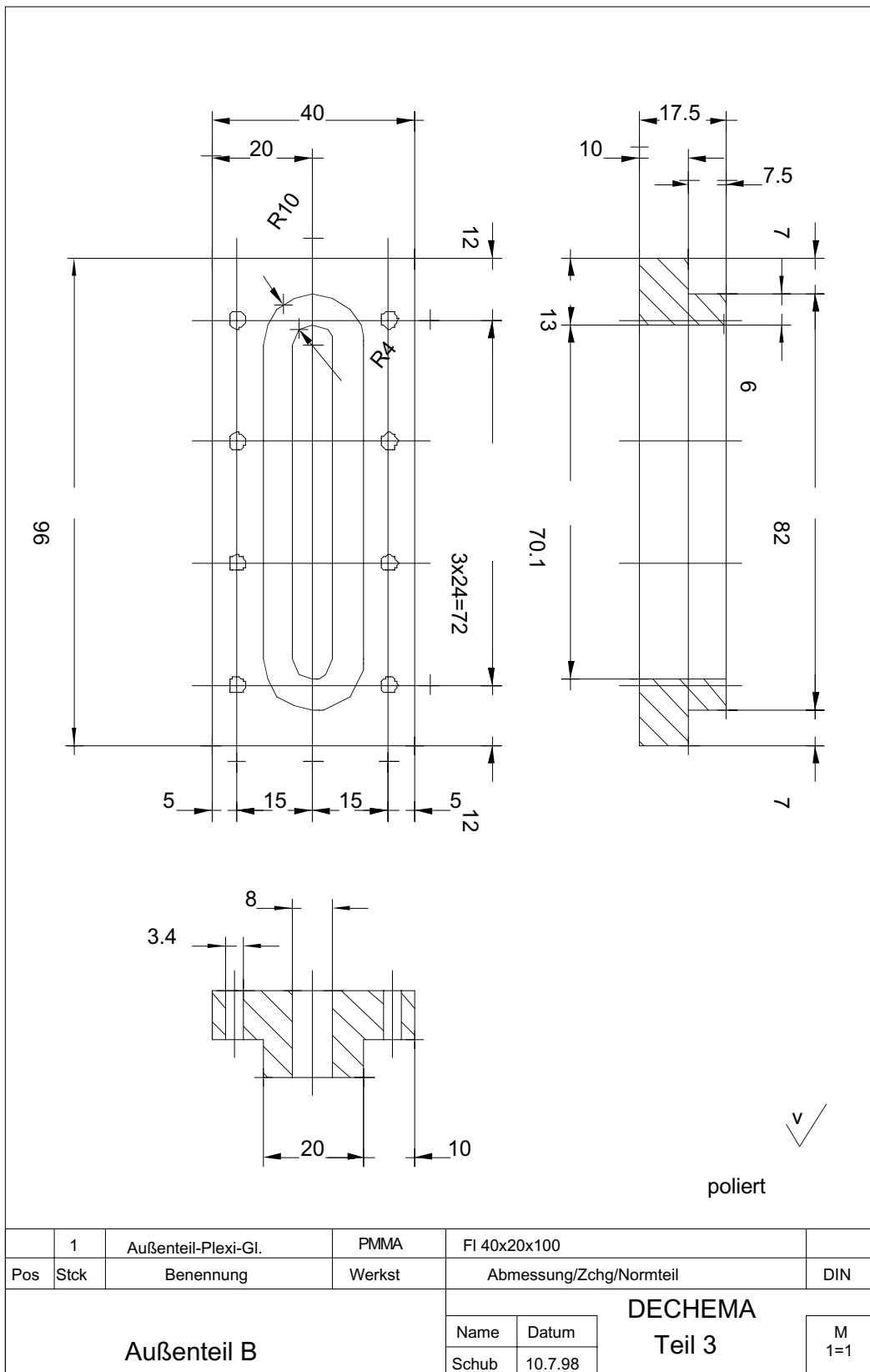


Abb. 53: Technische Zeichnung der Biobrennstoffzelle (Außenteil B)

8 Literaturverzeichnis

- ASTEC (Agentur für Sensor-Technologie GmbH): Handbuch zum Kurs „Chemo- und Biosensorik, Münster-Roxet, 3. Auflage, 1992, S. 117-131
- Aston, W. J., Turner, A. P. F.:
Biosensors and Biofuel cells, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1, 1984, S. 89-120
- Becker, C.: Versuche zu biosensorischen Anwendungen einer bioelektrochemischen Brennstoffzelle, Diplomarbeit, Fachhochschule Darmstadt, 1994
- Bennetto, P.: Microbial Fuel Cell, *Life Chemistry Reports* 2, 1984, S. 363-453
- Bennetto, P.: Microbes come to power, *New Scientist* 114, 1987, S. 36-39
- Beuse, M.: Populationsverteilung und Wachstumsmodi bei *Saccharomyces cerevisiae* in synchronen Chemostatkulturen, Dissertation, Universität Hannover, 1998, S. 109
- Birk, S.: Untersuchungen zum Einfluß von Redox-Farbstoffen auf den mikrobiellen Stoffwechsel, Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1991
- Blick durch die Wirtschaft, 18.11.1988, S. 12
- Box, J; Mason, J. R.:
Unveröffentlichte Forschungsergebnisse, 1986/1987
- Cohen, B.: The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell, *Journal of Bacteriology* 21, 18, 1931
- Cohn E. M.: NASA's fuel cell Programm, In: *Fuel Cell Systems, Advances in Chemistry Series 47*, American Chemical Society 1965, S. 1-9

- Crueger, W., Crueger, A.:
Biotechnologie. Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, R. Oldenbourg Verlag GmbH, München, 1989, S. 60-105
- Davis, G., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., Turner, A. P. F.:
Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on a quinoprotein, alcohol dehydrogenase, *Enzym. Microb. Technol.*, 5, 1983, S. 383-388
- Daußmann, T.: Neue Enzymaktivitäten in dem methanogenen Archaeobakterium *Methanosarcina barkeri* DSM 804, Dissertation, Universität Kaiserslautern, 1997
- Delaney, G. M., Bennetto, H. P., Mason, J. R., Sibel, D. R., Stirling, J. L., Thurston, C. F.: Electron-transfer in microbial fuel cell. 2. Performance of fuel cells containing selected mikroorganism-mediator-substrate combinations, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B, 1984, S. 13-27
- Dellweg, H.: Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987, S. 70
- Duboc, P., Marison, I., Stockar, U.:
Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations, *Journal of Biotechnology* 51, 1996, S. 57-72
- Einsele, A., Finn, R. K., Samhaber, W.:
Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985, S. 55-56
- Falbe, J., Regnitz, M.:
Römpp Chemie Lexikon, Band H-L, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1990, S. 1907
- Financial Times, Friday September 13, 1963, S. 11
- Foerst, W.:
Ullmanns Encyclopädie der Technischen Chemie, Bd. 12, Verlag Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 1960, S. 600-603

-
- Gottschalk, G.: Bacterial Metabolism, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988, S. 13-14; 185-186
- Grumann, E.: Die bioelektrochemische Brennstoffzelle als Biosensor zur Erfassung des Mikroorganismenwachstums, Diplomarbeit, Fachhochschule Darmstadt, 1995
- Holtmann, D.: Diplomarbeit, Einreichung an der Fachhochschule Emden, vorgesehen 1998
- Higgins, I. J., Hill, H. A. O.:
Microbial Technology: Current state, future prospects, Microbial Generation and Interconversion of Energy Sources, Bull, A. T., Ellwood, D. C, Ratledge, C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 1979, S.359-377
- Hobson, N. S., Tothill, I., Turner, A. P. F.:
Microbial detection, Biosensors & Bioelectronics 11, No. 5, 1996, S. 455-477
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J.:
Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994, S. 379
- Katalog von Life Technologies 1996-97; Produktkatalog für die Zellkultur, S. 70
- Klein, K.:
Praktische Biochemie, Verlag Quelle und Meyer Heidelberg, 1979, S. 142-144
- Kreysa, G., Krämer, P.:
Macrokinetics and Mathematical Modelling of Quinone Reductin by Cyanobacteria, J. Chem. Tech. Biotechnol. 44, 1989, S. 205-217
- Lämmel, A.:
Untersuchungen zur Entwicklung eines Meßsystems zur Erfassung des aktuellen Aktivitätszustandes bzw. Wachstums von Mikroorganismen, Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 1995
- Lewis, K.:
Biochemical fuel cells, Bacteriol. Rev. 30, 1966, S. 101-103

- Lübber, H: Einsatz unterschiedlicher Prozeßführungsmodi zur Charakterisierung und Beurteilung des Stoffwechsels rekombinanter CHO-Zellen, Dissertation, Universität Hannover, 1997
- Matsunaga, T., Karube, I., Suzuki, S.:
Electrode system for the determination of microbial populations, *Appl. Env. Microbiol.* 37 (1), 1979, S. 117-121
- Matsunaga, T., Karube, I., Suzuki, S.:
Electrochemical Determination of cell population, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 10, 1980, S. 125-132
- Marose, S.: Dissertation, Einreichung an der Universität Hannover, vorgesehen 1999
- Marose, S., Lindemann, C., Scheper, T.:
Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring, *Biotechnol. Prog.* 14(1), 1998, S. 63 –74
- Meyenburg, H. K. v.:
Stable synchrony oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae* under glucose limitation, *Biol. Biochem. Oscillators, Pap. Contrib. Conf.*, Academic Press, New York (1973), S.411-417
- Naumer, H., Heller, W.:
Untersuchungsmethoden in der Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1997, S. 117
- Nishikawa, S., Sakai, S., Karube, I., Matsunaga, T., Suzuki, S.:
Dye-coupled electrode system for rapid enumeration of cell populations in polluted water, *Appl. Environ. Micro.* 43, 1982, S. 814-818
- Patchett, R. A., Kelly, A. F., Kroll, R. G.:
Use of a microbial fuel cell for the rapid enumeration of bacteria, *Appl. Microbiol Biotechnol* 28, 1988, S. 26-31

- Parulekar, S. J., Semones, G. B., Rolf, M. J., Lievense, J. C., Lim, H. C.:
Induction and Elimination of Oscillations in Continuous Cultures of
Saccharomyces Cerevisiae, *Biotechnology and Bioengineering*,
Vol. XXVIII, 1986, S. 700-710
- Pons, M.-N.: *Bioprocess Monitoring and Control*, Hanser Verlag München, Wien,
New York, Barcelona, 1992, S. 86-106
- Potter, M. C.: The Rate of Fermentation as Mesured by Difference of Potential,
Proceedings Durham University, Philosophical Society 4, 1911,
S.230-231
- Präve, P., Faust, U., Sittich, W., Sukatsch, D. A.:
Handbuch der Biotechnologie, R. Oldenbourg Verlag GmbH,
München, 1994, S. 811-829
- Ramsay, G., Turner, A. P. F., Franklin, A., Higgins, I. J.:
Rapid bioelectrochemical methods for the detection of living
microorganisms, *Proceedings of the 1st IFAC conference on the
modelling and control biotechnological processes*, Nordwijkhout,
1985, S. 95-101
- Randow, G. von:
Kraftwerke der Zukunft, *Die Zeit*, Nr. 30, 20. Juli 1990, S. 58
- Rauen, H. M.: *Biochemisches Taschenbuch*, Band 2, Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York, 1964, S. 147
- Roller, S. D., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Stirling, J. L., Thurston, C.
F.:
Electron-transfer Coupling in Mikrobial Fuel Cells: 1. Comparison of
Redox-mediator Reduction Rates and Respiratory Rates of
Bacteria, *J. Chem. Techn. Biotechnol.*, 34B, 1984, S. 3-12
- Scheper, T.: *Bioanalytik*, Vieweg Verlag, Braunschweig, 1991, S. 6-8

Schlegel, H. G.:

Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1992, S. 220-221

Sell, D.:

Untersuchungen zur Elektrochemie und Biochemie einer bioelektrochemischen Brennstoffzelle, Dissertation, Universität Dortmund, 1991

Stärk, E.:

Allgemeine Untersuchungen zur 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die On-line-Bioprozeßbeobachtung und deren Ergänzung durch Fluorophorzusatz, Diplomarbeit, Universität Hannover, 1997

Stirling, J. L., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Roller, S. D., Tanaka, K., Thurston, C. F.: Microbial fuel cells, Biochemical Society Transactions 11, 1983, S. 451-453

Stryer, L.:

Biochemie, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, S. 572

Sturm F. von: Implantable Electrodes, Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics 3, 1980, S. 191-242

Tanaka, K., Vega, C. A., Tamamushi, R.:

Thionine and Ferric Chelate Compounds as Coupled Mediators in Microbial Fuel cells, Bioelectrochemistry and Bioenergetic, 11, 1983, S. 289-297

Thurston, C. F., Bennetto, H. P., Delaney, G. M., Mason, J. R., Roller, S. D., Stirling, J. L.:

Glucose metabolism in a microbial fuel cell. Stoichiometry of product formation in a thionine-mediated *Proteus vulgaris* fuel cell and its relation to coulombic yields, Journal of General Microbiology 131, 1985, S. 1393-1401

Troost, G.:

Technologie des Weines. Handbuch der Lebensmitteltechnologie, Ulmer Verlag, Stuttgart, 1988, S.146

-
- Turner, A. P. F., Aston, W. F., Higgins, I. J. H, Davis, G., Hill, H. A. O.:
Applied aspects of bioelectrochemistry; fuel cells, sensors and
bioorganic synthesis, Biotech. Bioeng. Symp. 12, 1982, S. 401-412
- Turner, A. P. F., Ramsay, G., Higgins, I. J. H.: Applications of electron transfer
between biological systems and electrodes, Biochem. Soc. Trans.
11, 1983, S. 445-448
- Walker, G. M.:
Yeast; Physiology and Biotechnology, John Wiley & Sons,
Chichester, New York, Weinheim, 1998, S.137-140
- Weide, H., Paca, J., Knorre, W. A.:
Biotechnologie, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1987, S. 208-210
- Zhang, X., Halme, A.:
A summary of the study of bioelectrochemical fuel cell by using
Saccharomyces cerevisiae, Research reports of Automation
Technol. Lab. in Helsinki U. of Technol. 12, 1994
- Zhang, X., Halme, A.:
Modelling of a microbial fuel cell process, Biotechnology Letters 17,
No. 8, 1995, S. 809-814

Lebenslauf

Name: Anne L ä m m e l

Anschrift: Kurze Steig 6
61440 Oberursel
Tel.: 06171/3912

Geburtstag: 27. Juni 1968

Geburtsort: Frankenberg

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975-1985 Oberschule Mittweida
(Abschluß: Mittlere Reife)

1985-1987 Martin-Luther-Universität Halle
(Abschluß: Abitur)

1987-1991 Studium der Biotechnologie
an der Universität Sofia/Bulgarien

1991-1995 Fortsetzung des Studiums an der
Universität Stuttgart,
Fachrichtung Technische Biologie

1994-1995 Diplomarbeit am Karl-Winnacker-Institut
der DECHEMA e.V. Frankfurt am Main zum Thema:
„Untersuchungen zur Entwicklung eines Meßsystems
zur Erfassung des aktuellen Aktivitätszustandes bzw.
Wachstums von Mikroorganismen“

1995-1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Karl-Winnacker-
Institut der DECHEMA e. V. in Frankfurt am Main

30. April 1999 Promotionsprüfung

Frankfurt am Main, im Mai 1999