

**Entwicklung einer Online-Analytik
zur Bioprozessbeobachtung
auf Basis der 2D-Fluoreszenzspektroskopie**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

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

genehmigte
Dissertation

von

Dipl.-Chem. Daniela Boehl
geboren am 11.05.1971
in Hannover

Hannover, im August 2003

Referent:	Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent:	PD Dr. Bernd Hitzmann
Tag der Promotion:	3. Juli 2003

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

Hannover, im Juni 2003

(Daniela Boehl)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1999 bis 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover durchgeführt. Für die Leitung und die Betreuung sowie die guten Arbeitsmöglichkeiten möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken.

Herrn PD Dr. Bernd Hitzmann danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Bei den Mitarbeitern und Angestellten des Institutes für Technische Chemie möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bedanken.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Dörte Solle für die gute Zusammenarbeit und die abwechslungsreichen Besprechungen im KK,

Christian Harbeck und Carsten Lindemann für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft,

Oliver Schweder und Sara Ziesman für ihre Zusammenarbeit bei der Durchführung von Kultivierungen,

der Gilde Brauerei AG, Hannover, insbesondere Herrn Dr. Toussaint für die Zusammenarbeit im Rahmen des OPUS-Projekts,

allen Mitarbeitern und Partnern des OPUS-Projekts,

den Mitarbeitern der Werkstatt für die Hilfe bei jeder Art von Problemen mit den Reaktoren,

allen Mitarbeitern in der Bibliothek für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Georg Renemann, meinen Eltern und allen Freunden, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Zusammenfassung

Die moderne Bioprozesskontrolle erfordert die schnelle Datenerfassung und Evaluierung von Bioprozessgrößen. Diese Anforderungen werden bei Anwendung der Online-Fluoreszenzspektroskopie zur Datenerfassung und der Auswertung mittels chemometrischer Methoden erfüllt.

Die Vorteile der Online-Fluoreszenzspektroskopie basieren auf der Möglichkeit von nicht-invasiven „sterilen Messungen“. Die Messungen im Bioreaktor können durch Glasfenster erfolgen, ohne dass der Reaktor geöffnet oder eine Messsonde eingesetzt werden muss. Desweiteren werden über die 2D-Fluoreszenzspektroskopie durch die Messung in einem weiten Exzitations- und Emissionswellenlängenbereich eine Vielzahl an Informationen über den aktuellen Stand des Bioprozesses geliefert.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigen die Anwendung der chemometrischen Datenanalyse von Fluoreszenzdaten, die bei der Durchführung von Bioprozessen erhalten wurden. Die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgt durch Anwendung der PLS-Regression (partial least square-regression).

Bei Untersuchungen von Bierbrauprozessen konnten gesicherte Vorhersagen des Hefezellwachstums, des pH-Wertes und des Extraktgehaltes erzielt werden. Die Bestimmung der vicinalen Diketone war aufgrund der geringen Varianz der Fluoreszenzdaten im letzten Abschnitt der Gärung nicht möglich.

Die Möglichkeit der Prozesskontrolle wurde für die Hefereinzucht in der Brauerei und für die Kultivierung von CHO-Zellen (Chinese Hamsters Ovary) gezeigt. Der Schwerpunkt bei den Untersuchungen der Kultivierungen der CHO-Zellen lag bei der Bestimmung des produzierten Proteins t-PA (tissue plasminogen activator), der Glukosekonzentration und der Zellmasse.

Bei den Kultivierungen des Pilzes *Claviceps purpurea* wird die Vorhersage der produzierten Alkaloide gezeigt. Weiterhin ist die Beobachtung des Zellwachstums des Pilzes durch die Kombination von Fluoreszenzspektroskopie und chemometrischer Auswertung möglich.

Stichworte: 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Online-Bioprozessmonitoring,
multivariate Auswertung

Abstract

Modern bioprocess control requires fast data acquisition and in-time evaluation of bioprocess variables. On-line fluorescence spectroscopy for data acquisition and the use of chemometric methods accomplish these requirements.

The advantages of on-line fluorescence spectroscopy are based on the possibility of non-invasive “sterile sensing”. Bioreactors may be sensed through the glass window without the need of opening it or inserting a probe. More over 2D-fluorescence spectroscopy provides many information about the state of the bioprocess by detecting a wide range of excitation and emission wavelengths.

The presented investigations show the application of chemometric modeling of fluorescence data obtained from bioprocesses with regard to on-line bioprocess monitoring. The evaluation of the fluorescence data was performed by using partial least squares regression (PLS).

Investigations on brewing processes resulted in reliable predictions of the yeast growth, the pH-value and the extract concentration. The monitoring of vicinal diketones by fluorescence measurement was not possible due to the lack of fluorescence information in the last period of the process.

The ability of process control using fluorescence spectroscopy was shown for the growth of yeast in brewing processes and for cultivations of CHO-cells (Chinese Hamsters Ovary). The focus of the investigations during cultivations of CHO-cells was the determination of the produced protein t-PA (tissue plasminogen activator), the glucose concentration and cell mass.

For the cultivation of the fungus *Claviceps purpurea* the prediction of the produced alkaloids is demonstrated. Furthermore the monitoring of the growth of the fungus was possible by using fluorescence spectroscopy combined with chemometric evaluation.

Keywords: 2D-fluorescence spectroscopy, on-line bioprocess monitoring,
multivariate analysis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
3	Material und Methoden	5
3.1	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	5
3.1.1	BioView-Sensor	5
3.1.2	Fluoreszenzspektrometer F-4500	7
3.2	Bioprozesse	7
3.2.1	Fermentersysteme	7
3.2.2	Bierbrauprozesse	10
3.2.2.1	Kultivierungsbedingungen	10
3.2.2.2	Analytik der Kultivierungsproben	11
3.2.3	Hefereinzucht	11
3.2.4	Kultivierung von CHO-Zellen	12
3.2.4.1	Stamm und Kultivierungsbedingungen	12
3.2.4.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	13
3.2.4.3	Bestimmung der Glukosekonzentration	13
3.2.4.4	Bestimmung des t-PA-Gehaltes	14
3.2.5	Kultivierung von <i>Claviceps purpurea</i>	14
3.2.5.1	Stamm und Kultivierungsbedingungen	15
3.2.5.2	Bestimmung der Biotrockenmasse	16
3.2.5.3	Bestimmung des Proteingehaltes	16
3.2.5.4	Bestimmung der Gesamtgotalkaloidkonzentration	17
3.3	Chemometrische Datenanalyse und Modellbildung	18
3.3.1	Datenvorverarbeitung	18
3.3.2	Hauptkomponentenanalyse und Modellbildung	18
3.3.3	Validierung	19
3.3.4	Sensitivitätsanalyse	20
4	Ergebnisse und Diskussion	21
4.1	Fluoreszenzspektren von Kultivierungsproben	21
4.2	Untersuchungen bei Bierbrauprozessen	23
4.2.1	Prozessverlauf	24
4.2.2	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	25

4.2.3	Hauptkomponentenanalyse	29
4.2.4	Modellbildung und Validierung	31
4.3	Messungen bei Hefereinzuchten in der Brauerei	37
4.3.1	Prozessverlauf	37
4.3.2	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	38
4.4	Untersuchungen bei Kultivierungen von CHO-Zellen	41
4.4.1	Prozessverlauf	41
4.4.2	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	42
4.4.3	Modellbildung und Kalibrierung	44
4.5	Untersuchungen bei Kultivierungen von <i>Claviceps purpurea</i>	46
4.5.1	Prozessverlauf	46
4.5.2	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	47
4.5.3	Fluoreszenzmessungen bei verdünnten Kultivierungsproben	49
4.5.4	Modellbildung und Validierung	51
5	Zusammenfassung und Ausblick	58
6	Literaturverzeichnis	63
7	Anhang	66
7.1	Geräteeinstellungen	66
7.2	Medienzusammensetzungen	67
7.3	Reagenzien	68
7.3.1	Reagenzien für den t-PA-ELISA (Fa. Biopool international)	68
7.3.2	Reagenzien für den BIORAD DC Protein Assay	68
7.3.3	Reagenzien für den Photometertest nach van Urk	68
7.4	Temperatureinfluss bei Gärungen	69
7.5	Abkürzungen	69

1 Einleitung

Wie viele andere Disziplinen kommt auch die moderne Bioprozessanalytik nicht mehr ohne die Unterstützung der Informatik aus. Die im Rahmen von Untersuchungen und Experimenten anfallenden Datenmengen nehmen an Umfang und Komplexität zu und erfordern die Entwicklung von neuen Techniken, die es ermöglichen, schnell und umfassend Informationen aus den ermittelten Daten zu erhalten.

Insbesondere spektroskopische Methoden liefern vielfältige Informationen und durch die Entwicklungen auf dem Gebiet der Faseroptik steigt die Anzahl der Möglichkeiten zu spektroskopischen Online-Messungen auch bei Bioprocessen. Die Vorteile bei einer solchen Anwendung sind die kurze Messzeit und die Möglichkeit der nicht-invasiven Messung. Probenahmen sind nicht erforderlich, da die Messungen durch Glas-oder Plastikfenster erfolgen können, so dass das Risiko von Kontaminationen gesenkt wird [WOLFBEIS, 2002].

Eine chemometrische Datenanalyse ist häufig unerlässlich, wenn Prozessgrößen nicht direkt gemessen werden können und eine Reihe von Faktoren, die einen Einfluss bei den Messungen haben, zu berücksichtigen sind. Die Chemometrik liefert hier eine Vielzahl von Methoden, um ein Maximum an Informationen aus den experimentellen Messdaten zu gewinnen [DANZER, 2001].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Fluoreszenzspektroskopie als Methode zur Bioprocessbeobachtung anzuwenden und mit Hilfe von chemometrischen Methoden eine Online-Analytik zu entwickeln.

Bei folgenden Bioprocessen werden fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt und die angegebenen Prozessgrößen durch Offline-Analysemethoden bestimmt.

- Bierbrauprozesse (Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert, Konzentration von vicinalen Diketonen)
- Hefereinzucht in der Brauerei (Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert)
- Kultivierung von CHO-Zellen (Zellzahl, Glukosekonzentration, t-PA-Konzentration)
- Kultivierung des Pilzes *Claviceps purpurea* (Biomasse, Proteingehalt, Gesamtalkaloidkonzentration)

Nach der Durchführung der Bioprocessen sollen die ermittelten Daten unter Einsatz von chemometrischen Verfahren analysiert werden und PLS-Modelle zur Vorhersage der Prozessgrößen erstellt und überprüft werden.

2 Theoretische Grundlagen

Mit dem Einzug des Computers in die Analytik begann eine schnelle Entwicklung von modernen Mess- und Gerätetechniken sowie der Laborautomation. Heute werden die Analysengeräte computergesteuert betrieben, die gemessenen Daten im Computer vorverarbeitet und gespeichert. Diese Entwicklung und die gleichzeitige Zunahme der Anzahl der Analysengeräte führt zu einem starken Anstieg der anfallenden Datenmengen. Die daraus resultierende Notwendigkeit die anfallenden Daten effizient auszuwerten, haben auch die Entwicklung der Chemometrik gefördert [DANZER, 2001].

Die Chemometrik umfasst eine Vielzahl von Methoden aus den Bereichen der Mustererkennung, Neuronalen Netze, multivariaten Statistik und Datenanalyse, Signal- und Systemtheorie, Molekularen Designs oder Syntheseplanung. Entsprechend dieser Breite an Verfahren wird die Chemometrik je nach Einsatz unterschiedlich definiert, so dass eine Vielzahl an Definitionen in der Literatur beschrieben werden. Die von LAVINE AND WORKMAN [2002] nach Prüfung dieser Definitionen aufgestellte Definition beschreibt die Chemometrik als einen dynamischen Prozess. So werden Routineprobleme mittlerweile auf eine neue Art und Weise gelöst: Messung eines Phänomens oder Prozesses, Analyse der multivariaten Daten, Aufbau und Test eines Modells und schliesslich die Entwicklung eines umfassenden Verständnisses des Prozesses. Häufig werden Daten und Messwerte dabei mit Hilfe von kostengünstigen Verfahren generiert, um schnellere und ökonomischere Methoden zu entwickeln.

Die Vorgehensweise bei der chemometrischen Datenanalyse wird ausführlich von DANZER [2001] beschrieben. Der in Abbildung 2-1 dargestellte Ablauf beschreibt die Teilschritte dieser Datenanalyse in Anlehnung an DANZER [2001] und bezieht sich auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Am Anfang stehen die Zielsetzung und Versuchsplanung, auf deren Grundlage dann die Datengewinnung während der Bioprozesse durchgeführt wird. Die durch Offline-Analytik ermittelten Daten der Prozessgrößen werden grafisch aufgetragen und visuell auf mögliche Messfehler geprüft. Die Fluoreszenzdaten werden mittels Hauptkomponentenanalyse auf ihre Struktur und Komplexität untersucht. Auf Basis dieser Resultate werden anschließend Modelle für die verschiedenen Prozessgrößen erstellt. Die Überprüfung und Interpretation der Modelle erfolgt anhand von Sensitivitätsspektren und durch Validierung, d.h. durch Anwendung der Modelle auf weitere Bioprozesse durch Vorhersage der Prozessgrößen.

Versuchsplanung

- Datengewinnung** - Durchführung von Bioprozessen mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen und Offline-Analytik der Prozessgrößen
- Datenanalyse** - grafische Auftragung der Verläufe der Prozessgrößen und der Fluoreszenzdaten sowie der Fluoreszenzspektren
- Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Messdaten
- Modellbildung** - PLS1-Regression
- Überprüfung, Validierung** - Sensitivitätsspektren, Fehler der Kalibrierung (RMSEC)
- Vorhersage, Fehler der Vorhersage (RMSEP)
- Interpretation, Bewertung** - Anwendbarkeit der Methode
-

Abbildung 2-1

Vorgehensweise bei der chemometrischen Datenanalyse

Die Entwicklung der Chemometrik wird durch die vielfältigen Anwendungen vorangetrieben. Aufgrund des Fortschritts in der Glasfaseroptik wachsen die Möglichkeiten in Industrie und Forschung spektroskopische Methoden als Messsysteme zu etablieren und optimieren. Der Haupteinsatz der Chemometrik liegt in der Infrarotspektroskopie [LAVINE AND WORKMAN, 2002], es erfolgen aber auch zahlreiche Anwendungen bei anderen spektroskopischen Methoden, wie z.B. der Fluoreszenzspektroskopie.

WOLF ET AL. [2000] nutzten Neuronale Netze zur Auswertung von zweidimensionalen fluorimetrischen Daten zum Online-Monitoring von biologischen Prozessen. So beobachteten sie den Abbau von flüchtigen organischen Komponenten aus wässrigen Medien mittels eines Membran-Biofilm-Reaktors.

CHRISTENSEN UND NORGAARD [1999] beschreiben die Anwendung der Online-Fluoreszenzspektroskopie und PLS-Regression in der Zuckerindustrie. Sie nutzen die beiden Methoden zur Bewertung der Qualität der untersuchten festen Zuckerproben in Bezug auf Verunreinigungen, die nach dem Raffinierprozess noch im Zucker enthalten sein können.

Ebenfalls eine Anwendung von zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit chemometrischen Methoden wird von HARBECK [2001] bei der

chromatographischen Melasseentzuckerung dargestellt. Er beschreibt den Nachweis von Tyrosin, Serin, Threonin und Asparagin mittels Fluoreszenz in Melasseproben, ausserdem geht er auf den Betainnachweis aus Melasse mittels Naher Infrarotspektroskopie ein.

Eine weitere industrielle Anwendung wird von SOLLE [2003] durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wird das Monitoring und die gezielte Regelung des enzymatischen Prozesses der Tryptophanherstellung aus L-Serin und Indol entwickelt. So wurden die Prozessvariablen Indol und Serin durch multivariate Auswertung der Fluoreszenzdaten bestimmt.

STÄRK [2002] führte die chemometrische Auswertung der Fluoreszenzdaten bei Kultiverungen von *Saccharomyces cerevisiae* durch. Bei Hochzelldichte-Kultivierungen mit *E. coli* wurden mittels In-situ-Fluoreszenzmessungen zusätzliche Informationen über den Prozessverlauf und den aktuellen Zellstoffwechsel gewonnen.

3 Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln werden die Durchführungen der Bioprozesse (Bierbrauprozesse, Hefereinzucht, Kultivierungen von CHO-Zellen und des Pilzes *Claviceps purpurea*) und die Offline-Analytikmethoden beschrieben. Eine kurze Übersicht zur chemometrischen Auswertung folgt im Anschluss. Als erstes werden die verwendeten Fluoreszenzspektrometer vorgestellt.

3.1 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Zur Durchführung von kontinuierlichen fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei den verschiedenen Bioprozessen werden die Fluoreszenzspektrometer BioView-Sensor (Fa. DELTA Light & Optics) und F-4500 (Fa. Hitachi) eingesetzt. Einzelne Messungen von Proben in Küvetten werden ebenfalls mit dem Hitachi F-4500 durchgeführt.

Im Folgenden werden die Messprinzipien der Fluoreszenzspektrometer und die während der Bioprozesse verwendeten Geräteeinstellungen kurz dargestellt. Ausführliche Beschreibungen zu den Spektrometern finden sich bei LINDEMANN [1998] und MAROSE [1999].

3.1.1 BioView-Sensor

Der experimentelle Aufbau für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei den verschiedenen Bioprozessen ist in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt. Die Messungen der relativen Kulturfluoreszenz durch die Fluoreszenzspektrometer erfolgen in situ über einen Lichtleiter und einen Adapter im Bioreaktor, der das Medium und den Lichtleiter durch eine Quarzglasscheibe trennt.

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

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

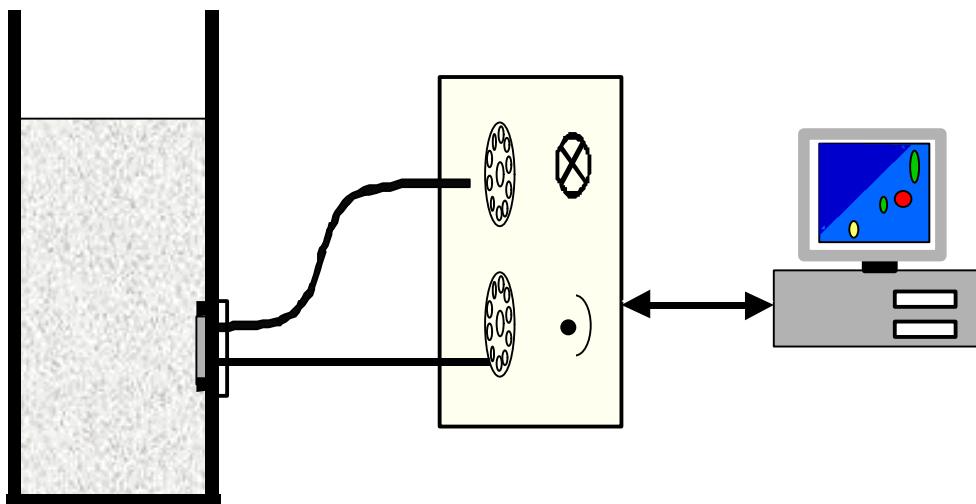


Abbildung 3-1

Schematischer Aufbau für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen mit dem BioView-Fluoreszenzsensor

Die Einstellungen, die für die verschiedenen Bioprozesse (Gärungen, Hefereinzuchtprozesse und Kultivierungen von *Claviceps purpurea*) ausgewählt werden, sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Tabelle 3-1

Einstellungen des BioView-Fluoreszenzensors während der Gärungen, Hefereinzuchten und Kultivierungen von *Claviceps purpurea*

Parameter	Einstellungen
Exzitationswellenlänge	290 – 550 nm, zusätzlich Neutraldichtefilter
Emissionswellenlänge	310 – 590 nm, zusätzlich Neutraldichtefilter
Schrittweite der Ex-/ Em-Wellenlänge	20 nm
Bandbreite der Ex-/ Em-Wellenlänge	20 nm
Photomultiplier (Gain)	s. Anhang
Messungen pro Wellenlängenkombination	3, bei der Hefereinzucht 5

3.1.2 Fluoreszenzspektrometer F-4500

Das Fluoreszenzspektrometer F-4500 besitzt zwei Gittermonochromatoren mit wählbarer Spaltbreite, so dass die Wellenlängen von Exzitation und Emission unabhängig voneinander eingestellt werden können. Die Bandbreite der Wellenlängen ist ebenfalls frei wählbar, als Lichtquelle dient eine Xenonlampe. Die Detektion des Emissionslichtes erfolgt über einen Gittermonochromator und Photomultiplier. Die experimentelle Anordnung entspricht dem in Abbildung 3-1 dargestellten Aufbau. Der Flüssiglichtleiter (Fa. Lumatec) wird über einen von der institutseigenen Feinmechanikwerkstatt angefertigten Einsatz in das Fluoreszenzspektrometer F-4500 eingebaut.

Bei Offline-Messungen von Kultivierungsproben werden Küvetten aus Quarzglas (10·5 mm, Fa. Hellma) verwendet, die quer zum Anregungslicht in das Fluoreszenzspektrometer eingesetzt werden.

Für die Online-Messungen (Kultivierungen von CHO-Zellen) und Offline-Messungen werden die in Tabelle 3-2 angegebenen Einstellungen gewählt.

Tabelle 3-2

Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers Hitachi F-4500 während der Kultivierung von CHO-Zellen und bei Küvettenmessungen

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

3.2 Bioprozesse

3.2.1 Fermentersysteme

Die Kultivierungen werden mit den Fermentationseinheiten Biostat B und Biostat UD der Fa. B. Braun im 3 L-Bioreaktor bzw. im 30 L-Bioreaktor durchgeführt. Als 3 L-Bioreaktor wird dabei ein Edelstahlreaktor eingesetzt, der von der institutseigenen Feinmechanikwerkstatt angefertigt wurde. Als Deckel wird der Originaldeckel des

Glasgefäßes der Fermentereinheit Biostat B verwendet. In die Seitenwand dieses Reaktors ist eine Quarzglasscheibe eingesetzt, die es ermöglicht, die fluoreszenzspektroskopischen Messungen während der Kultivierungen in situ durchzuführen.

Im 30 L-Bioreaktor wird für Fluoreszenzmessungen in einen der seitlichen Ports ein Adapter mit einem Quarzglasfenster eingebaut, in den der Lichtleiter des Fluoreszenzspektrometers eingesetzt werden kann. Alle seitlichen Ports, über die die Probenahmen, Fluoreszenzmessungen, pH- und pO₂-Messungen erfolgen, sind nebeneinander in der gleichen Höhe des Fermenters angebracht. Somit ist gewährleistet, dass auch bei einer nicht gleichmäßigen Durchmischung des Reaktorinhaltes bei den Gärungen die ermittelten Prozessdaten miteinander vergleichbar sind.

Abbildung 3-2 zeigt den schematischen Aufbau des Fermentationssystems mit der Fermentereinheit Biostat B, die bei den Kultivierungen von *Claviceps purpurea* eingesetzt wird. Bei der Kultivierung von CHO-Zellen, die ebenfalls im 3 L-Edelstahlreaktor durchgeführt werden, und der Gärungen mit dem Fermentationssystem Biostat UD ist der Aufbau entsprechend, wobei einige Komponenten wie z.B. Antischaummittel, Befeuchtung der Begasungsluft (s.u.) nicht erforderlich sind.

Die Regelung der Prozessgrößen Temperatur und pH-Wert erfolgt über die Mess- und Steuereinheit (DCU). Die Datenaufnahme erfolgt mit dem RISP-System (Real Time Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) über eine Workstation (Vax-Station), die über den Hostanschluss an die DCU angeschlossen ist. Alle 10 Sekunden werden Messwerte aufgenommen, über einen Zeitraum von einer Minute gemittelt und gespeichert. Die Verläufe der Prozessgrößen werden während der Kultivierungen grafisch dargestellt.

Die Reaktoren werden mit einem Temperaturfühler (Pt-100), einer pH-Elektrode (Fa. Broadley-James) und einer Sauerstoffelektrode (Fa. Mettler-Toledo) zur Prozessüberwachung ausgestattet. Die pH-Elektrode wird jeweils vor dem Autoklavieren mit entsprechenden Pufferlösungen kalibriert. Die pO₂-Elektrode wird nach der Sterilisation des Fermenters zunächst an die Steuereinheit angeschlossen. Nach der 6-stündigen Polarisationszeit wird die Kalibrierung der pO₂-Elektrode durchgeführt. Für die Kultivierungen von *Claviceps purpurea* wird die Elektrode extern in einem Gefäß mit Leitungswasser autoklaviert und anschließend unter sterilen Bedingungen in den Reaktor eingesetzt [MENGE, 2000].

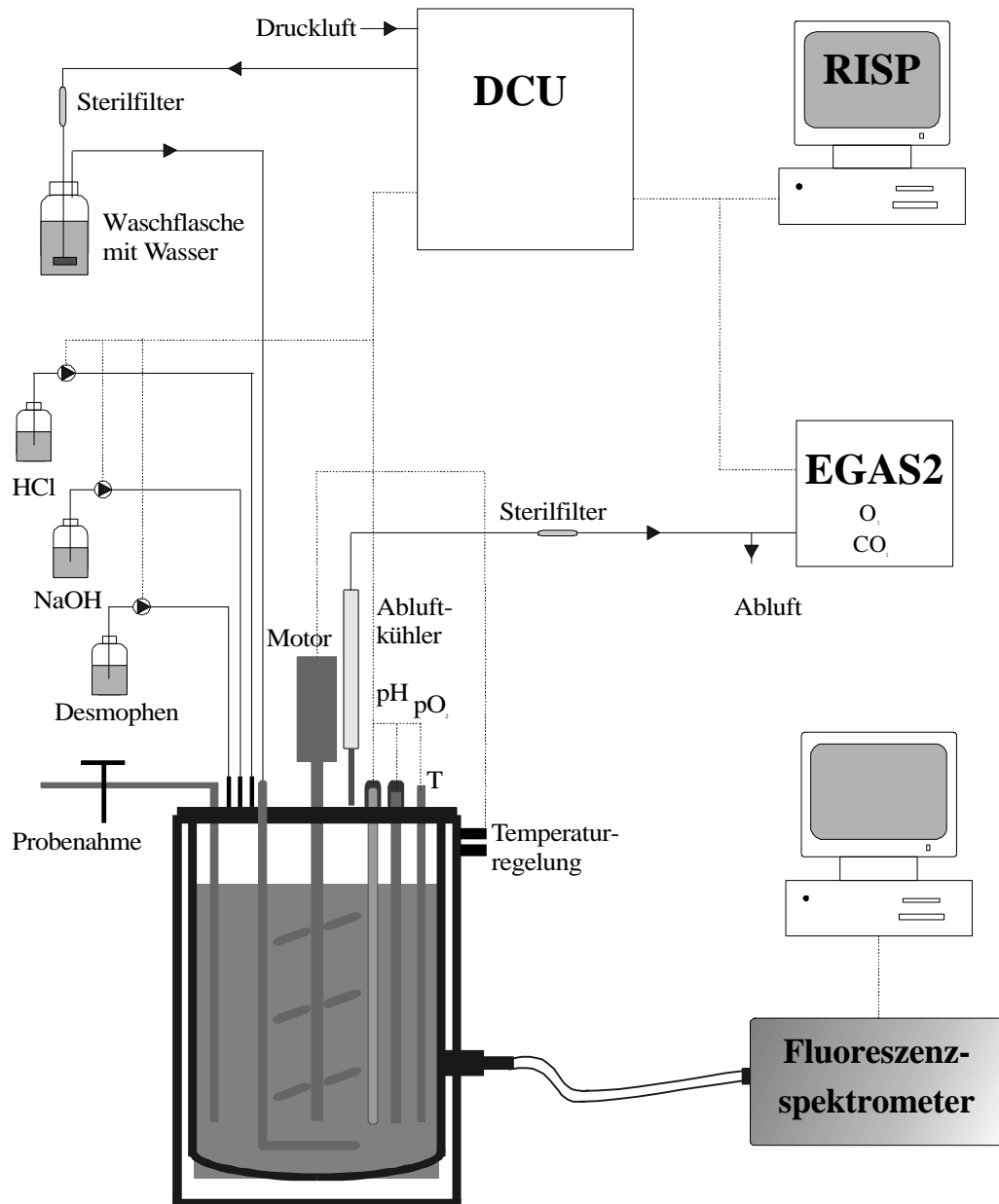


Abbildung 3-2
Schematischer Aufbau des Fermentationssystems Biostat B

Die Begasung wird über ein Mass-Flow-Meter, das in der Steuereinheit DCU integriert ist, eingestellt und erfolgt über einen Begasungsring im Reaktor. Bei den Kultivierungen von *Claviceps purpurea* wird die Luft, die in den Reaktor geleitet wird, zuvor über eine Fritte durch eine mit sterilem Wasser gefüllte Waschflasche geführt. Dieses dient der Luftbefeuchtung, um mögliche Flüssigkeitsverluste im Laufe der dreiwöchigen Kultivierung zu minimieren [MENGE, 2000]. Bei den Kultivierungen der scherstressempfindlichen CHO-Zellen erfolgt die Begasung über eine indirekte Silikonschlauchbegasung [RENEMANN, 2001]. Der Abgasstrom wird über das Verteilersystem Mux-Control 100 (Fa. Hartmann &

Braun) zum Abgasanalysegerät EGAS 2 mit kombiniertem CO₂/O₂-Analysator (URAS 14 + O₂) geführt. Die detektierten Daten werden ebenfalls vom RISP-System aufgezeichnet und zur Prozesskontrolle verwendet.

3.2.2 Bierbrauprozesse

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen während der Bierbrauprozesse (Gärungen) werden im 30 L-Edelstahlreaktor mit dem BioView-Sensor alle 20 Minuten durchgeführt. Zur Prozessbeobachtung werden alle 12 Stunden Proben entnommen. Die Planung und Durchführung dieser Untersuchungen erfolgen in Zusammenarbeit mit der Gilde Brauerei AG, Hannover.

3.2.2.1 Kultivierungsbedingungen

Als Kulturmedium wird Bierwürze von der Gilde Brauerei AG, Hannover, zur Verfügung gestellt. Die frisch abgefüllte Bierwürze wird unter sterilen Bedingungen in den sterilen 30 L-Fermenter gefüllt und auf 11 °C temperiert. Anschliessend wird die Würze 20 Minuten belüftet (Begasung mit Pressluft, dabei Vermeidung starker Schaumbildung). Beim Animpfen mit Bierhefen, die ebenfalls von der Gilde Brauerei geliefert werden, wird eine Animpfdichte von 15-20 Mio. Zellen/mL eingestellt. Zur guten Durchmischung wird zwei Minuten bei 100 rpm gerührt und anschliessend die Rührerdrehzahl auf 20 rpm verringert. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3-3 angegeben. Der pH-Wert wird kontinuierlich über die in den Fermenter eingebaute pH-Elektrode gemessen.

Tabelle 3-3

Kultivierungsbedingungen während der Gärungen im Biostat UD

Kultivierungsparameter	Einstellungen
Temperatur	11 ± 1°C
Rührergeschwindigkeit	20 rpm
pH-Wert	keine Regelung
Begasung	Belüftung vor dem Animpfen (20 Minuten), während der Gärung keine Begasung

3.2.2.2 Analytik der Kultivierungsproben

Probenahmen werden während der Gärungsphase alle 12 Stunden durchgeführt. Die Proben werden zentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 5 Minuten, Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Fa. B. Braun) und der Überstand zur Analytik eingefroren (-20 °C). Alle 24 Stunden werden zusätzlich Proben für die Bestimmung des Gehaltes an vicinalen Diketonen genommen und diese sofort bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung der vicinalen Diketone und des Extraktgehaltes wird von der Gilde Brauerei durchgeführt. Die Zellzahl wird durch mikroskopische Auszählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer sofort nach der Probenahme ermittelt.

3.2.3 Hefereinzucht

Zur Durchführung der fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei der Hefereinzucht bei der Hasseröder Brauerei, Wernigerode, wurde zuvor am Institut für Technische Chemie von der Feinmechanikwerkstatt ein Adapter mit Quarzglasscheibe gefertigt, der in ein Inlinegehäuse (Fa. Tuchenhagen) des Verrohrungssystems eingesetzt werden kann. Die Messungen erfolgen während der Hefereinzucht im Rohrsystem, durch das der Tankinhalt zur Belüftung (11 Nm³/h) und Durchmischung gepumpt wird (s. Abbildung 3-3).

Die Durchführung der Hefereinzuchten werden bei der Hasseröder Brauerei nach der gültigen Verfahrensanweisung durchgeführt. Die Probenahmen zur Bestimmung der Zellzahl, des Extraktgehaltes und des pH-Wertes werden von der Hasseröder Brauerei alle 8 Stunden durchgeführt. Da an Wochenenden routinemässig keine Proben gezogen werden, liegen nicht über den gesamten Zeitraum der Hefereinzuchten Offline-Daten vor.

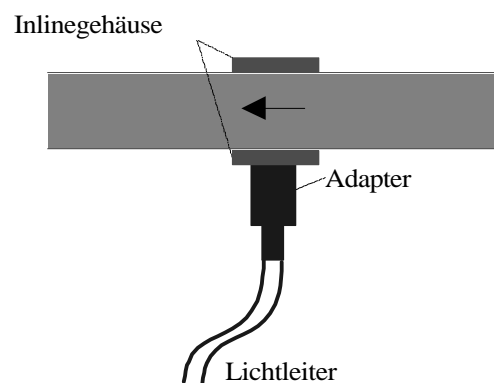


Abbildung 3-3

Schematischer Aufbau für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei der Hefereinzucht

Die erste durchgeführte Messserie bei der Hefereinzucht (H1) dient der Bestimmung der erforderlichen Messeinstellungen (Zeitintervall und Gain, s. Anhang). Bei insgesamt drei Hefereinzuchten (H1, H2 und H3) erfolgen die Fluoreszenzmessungen mit dem BioView-Sensor unter gleichen Bedingungen im Abstand von 5 Minuten.

3.2.4 Kultivierungen von CHO-Zellen

Die Kultivierungen der CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) erfolgen im 3 L-Edelstahlreaktor mit angeschlossenem Fluoreszenzspektrometer F-4500. Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen werden im Abstand von 20 Minuten durchgeführt. Neben der Bestimmung der Zellzahl werden die Prozessgrößen Glukosegehalt und die t-PA-Konzentration (tissue Plasminogen Activator) ermittelt. Diese Kultivierungen werden in Zusammenarbeit mit G. Renemann durchgeführt.

3.2.4.1 Stamm und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierungen werden mit der rekombinanten Zelllinie CHO TF 70 R (Fa. Pharmacia & Upjohn) durchgeführt. Diese ist gentechnisch so verändert, dass sie humanes t-PA (tissue plasminogen activator) exprimiert. Die Zellen sind an serumfreie Bedingungen adaptiert.

Die CHO-Zellen werden für die Versuchsreihen in BioPro1-PF-Medium (Fa. Biowhittaker) kultiviert. Dieses Nährmedium ist serum- und proteinfrei.

Die Stammhaltung erfolgt in Monolayerflaschen (75 cm², Fa. Greiner) und Spinnerflaschen (250 und 500 mL, Fa. Techne Corporation) auf speziellen Spinnerflaschenrührern bei einer Rührergeschwindigkeit von 25 rpm (Fa. Techne Corporation) in temperierbaren Brutschränken (Fa. Heraeus) unter 5 %iger Kohlendioxidbegasung und gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Die langfristige Haltung erfolgt in Kulturmedien mit einem Zusatz von Dimethylsulfoxid (5 %) bei -196 °C.

Das Füllvolumen des 3 L-Edelstahlreaktors beträgt 2 L. Um eine ausreichende Zellzahl zum Animpfen zu erhalten (Animpfdichte: $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL), werden die Vorkulturen zunächst in Monolayer-Flaschen (75 cm²) und dann in Spinnerflaschen mit 250 und 500 mL Volumen angezogen.

Der mit Wasser gefüllte Reaktor wird mit den eingebauten Elektroden bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Anschliessend wird unter sterilen Bedingungen das Wasser aus dem Reaktor gelassen und das Medium unter sterilen Bedingungen in ein mitautoklaviertes Vorratsgefäß gefüllt. Über eine Schlauchverbindung wird das Medium in den Reaktor

überführt. In gleicher Weise erfolgt auch das Animpfen mit der Vorkultur (Animpfdichte 0,2-0,4 Mio Zellen/mL) [RENEMANN, 2001].

In Tabelle 3-4 sind die Kultivierungsbedingungen angegeben.

Tabelle 3-4

Kultivierungsbedingungen von CHO-Zellen im Biostat B

Kultivierungsparameter	Einstellungen
Temperatur	37 °C
Rührergeschwindigkeit	100 rpm
pH-Wert	7,15 (1 M NaOH, 1 M HCl)
Begasung	mit Pressluft, 50% Sauerstoffsättigung

Bei der Probenahme (alle 12 Stunden) werden jeweils 8 mL Kulturmedium entnommen. Ein Teil des Probevolumens wird zur Bestimmung der Zellzahl verwendet, das restliche Probevolumen wird zentrifugiert und der Kulturüberstand bis zur Durchführung der Analytik bei -20°C eingefroren.

3.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgt durch Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Die Kultivierungsproben werden zur Bestimmung der Vitalität mit einer Trypan-Blau-Lösung im Verhältnis 1:2 gemischt und zur Auszählung auf die Zählkammer aufgetragen. Trypan-Blau färbt die Organellen toter Zellen blau, da beschädigte Cytoplasmamembranen für den Farbstoff durchlässig sind. Lebende Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop gelb.

3.2.4.3 Bestimmung der Glukosekonzentration

Die Messungen der Glukosekonzentrationen erfolgen mit dem Biochemistry Analyzer (YSI 2700 Select, Fa. Yellow Springs Instruments). Das Messprinzip dieses Gerätes beruht auf der enzymatischen Oxidation von β -D-Glukose. Die Glukoseoxidase setzt die enthaltene β -D-Glukose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid um. Über einen Stromfluss (Messung des Potentials des Wasserstoffperoxids an einer Platinelektrode) kann die Glukosekonzentration indirekt bestimmt werden.

Die Messungen erfolgen im Bereich von 0 bis 4 g/L Glukose. Die Proben werden gegebenenfalls mit entmineralisiertem Wasser verdünnt.

3.2.4.4 Bestimmung des t-PA-Gehaltes

Zur quantitativen Bestimmung des Produktes wird ein t-PA-spezifischer ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay, Testkit ImulyseTM tPA, Fa. Biopool) verwendet. Der ELISA-Test beruht auf einer hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Antikörper verwendet werden, an die einfach quantitativ zu bestimmende Enzyme gekoppelt sind.

Im ersten Inkubationsschritt werden monoklonale Antikörper an der Kunststoffoberfläche der Kavernen der Mikrotiterplatten immobilisiert. Anschließend wird mit PET-Puffer (PBS-EDTA-Tween-Puffer) gewaschen. Im zweiten Schritt wird das Antigen t-PA aus Kultivierungslösungen bzw. aus Standardlösungen an die Antikörper gebunden. Nach der Inkubation und nochmaligem Waschen mit Puffer wird ein zweiter Antikörper hinzugefügt, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist und der spezifisch an t-PA bindet. Nach mehreren Waschschritten wird das Farbreagenz (o-Phenylendiamin) und das Substrat Wasserstoffperoxid zugegeben. Das zugegebene Peroxid wird durch das Enzym Peroxidase reduziert. Dabei fungiert das Farbreagenz als Wasserstoffdonator und die Farbe des o-Phenylendiamins wechselt von farblos zu gelb. Die Extinktion wird mit einem Photometer Immunoreader NJ-2000 (Fa. Nunc GmbH) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Da die Extinktion nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz proportional zu der Konzentration des Farbstoffes ist, kann die Menge des Antikörpers bzw. des t-PA über eine Kalibrationsgerade berechnet werden.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden nach der im Testkit beigelegten Anleitung durchgeführt.

Weil die Testmethode sehr empfindlich ist, sollte die maximale t-PA-Konzentration in den Probelösungen nicht größer als 100 ng/ml sein. Deshalb ist eine 400fache Verdünnung der Kultivierungsproben erforderlich.

3.2.5 Kultivierungen von *Claviceps purpurea*

Die Kultivierungen des Pilzes *Claviceps purpurea* werden im 3 L-Edelstahlreaktor durchgeführt. Im Abstand von 30 Minuten werden Fluoreszenzspektren mit dem BioView-Sensor aufgenommen. Zur Prozessbeschreibung wird die Offline-Analytik der Prozessgrößen Biomasse, Proteingehalt und Gesamtgotalkaloidkonzentration durchgeführt.

3.2.5.1 Stamm und Kultivierungsbedingungen

Der kultivierte Stamm ist *Claviceps purpurea* 1029 N5, eine Mutante des Stammes 1029, der durch chemische Mutagenese erhalten wurde. Diese Mutante bildet hauptsächlich Ergotamin und α -Ergokryptin als Sekundärmetabolite, die zum größten Teil ins Medium ausgeschieden werden [MENGE, 2000].

Die Stammhaltung erfolgt auf Agarplatten mit T2-Medium (s. Anhang) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zum Animpfen der Vorkultur wird eine Platte schrittweise auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und auf Raumtemperatur aufgetaut. Unter sterilen Bedingungen wird ein ca. 1 cm^2 großes Mycelstück mit einer Impföse von der Platte gelöst, von Agarresten befreit und in einem sterilen Mörser vorsichtig gemörsert. Die Mycelstücke werden in ca. 1 mL sterilem InOc-Medium (s. Anhang) suspendiert und dann vollständig in einen sterilen 500 mL -Erlenmeyerkolben mit 80 mL InOc-Medium überführt. Diese Vorkultur wird bei $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem abgedunkelten Rotationsschüttler (Certomat S mit Inkubationshaube HK, Fa. B. Braun) bei 200 rpm für 5 Tage inkubiert. Aus dieser Vorkultur werden 8 mL Zellsuspension zum Animpfen der zweiten Vorkultur entnommen. Die Vorkultur wird unter denselben Bedingungen für 2-3 Tage inkubiert.

Zum Beimpfen der Hauptkultur im Bioreaktor wird der gesamte Kolbeninhalt der zweiten Vorkultur in gewogene, sterile 30 mL -Zentrifugenbecher gefüllt und die Zellmasse bei 6000 rpm , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Fa. B. Braun). Der Überstand wird abdekantiert und die Zellmasse in sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend wird nochmals abzentrifugiert. Nach dem Abdekantieren wird das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt und in einem Animpfkolben 100 mL einer 10%igen (g Feuchtgewicht/L Medium) Zellsuspension in sterilem Wasser angesetzt. Diese Suspension wird beim Animpfen vollständig in den sterilisierten Bioreaktor überführt.

Zur Vorbereitung des 3 L -Reaktors werden zunächst die Elektroden eingebaut und das Produktionsmedium angesetzt. Dazu werden die Medienbestandteile (T25-Medium, s. Anhang) für 2 L eingewogen, jedoch nur in $1,8\text{ L}$ Leitungswasser gelöst. Das Medium sowie 200 mL Hostinert 216 (Fa. Hoechst) werden in den Reaktor gegeben, der dann bei $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten autoklaviert wird [MENGE, 2000].

Zu Beginn der Kultivierung werden ca. 2 mL des Antischaummittels Desmophen 3900 (Fa. Bayer) in den Reaktor gegeben. Die Rührergeschwindigkeit wird auf 100 rpm und die Begasung auf $1\text{ L}/\text{min}$ eingestellt. Im Verlauf der Kultivierungen werden diese beiden Parameter erhöht, so dass mindestens eine 20%ige Sauerstoffsättigung des

Kultivierungsmediums gewährleistet ist. Die weiteren Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3-5 aufgeführt.

Während der Kultivierungen werden ca. alle 8 Stunden 4-5 mL Kulturbrühe entnommen, filtriert und der Kulturüberstand zur Durchführung der Analytik bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Tabelle 3-5

Kultivierungsbedingungen für *Claviceps purpurea*.

Kultivierungsparameter	Einstellungen
Temperatur	37°C
Rührergeschwindigkeit	100-400 rpm (Paddelrührer)
pH-Wert	7,15 (1 M NaOH, 1 M HCl)
Begasung	1-2 L/min

3.2.5.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Abtrennung der Biomasse vom Kulturüberstand wird das gesamte Probevolumen mit einer Absaugeinrichtung unter Wasserstrahlpumpenvakuum filtriert. Als Filter werden zuvor gewogene Cellulose-Acetat-Filter mit einem Porendurchmesser von $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (\varnothing 47 mm, Fa. Sartorius) verwendet. Der Filterkuchen wird mit dem gleichen Volumen der Probe mit entmineralisiertem Wasser gewaschen, so dass das Filtrat 1:2 verdünnt wird. Die Filter werden bis zur Gewichtskonstanz bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und anschließend gewogen. Die Biotrockenmasse wird aus der Gewichts Differenz bestimmt.

3.2.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Der extrazelluläre Proteingehalt wird mit Hilfe des kommerziellen Proteintests *DC Protein Assay*® (Fa. Biorad) ermittelt. Diese Variante des LOWRY-Tests basiert auf einer zweistufigen Farbreaktion zwischen Proteinen, einer alkalischen Kupfertartratlösung und dem Folinreagenz. Das zweiwertige Kupfer wird im ersten Schritt durch die Aminosäuren der Proteine in die einwertige Oxidationsstufe reduziert. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche Farbreaktion, in der das Folinreagenz durch das einwertige Kupfer reduziert wird und somit die Verbindung mit charakteristischer blauer Farbe entsteht. Die Auswertung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm.

Aufgrund des hohen Proteingehaltes der Kultivierungsüberstände werden diese vor der Durchführung im Verhältnis 1:10 mit entmineralisiertem Wasser verdünnt.

Die Bestimmung wird auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Zunächst werden 20 μL Probevolumen vorgelegt und dann mit 25 μL Reagenz A (s. Anhang) versetzt. Nach der Zugabe von 200 μL Reagenz B (s. Anhang) werden die Lösungen gut vermischt und 20 Minuten inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgt mit dem Immunoreader NJ-2000 (Fa. Intermed).

Eine Kalibrationsgerade zur quantitativen Auswertung wird mit Standardlösungen von Rinderserumalbumin (BSA, Fa. Pierce) erstellt. Insgesamt werden 5 Standardlösungen im Bereich von 0,2 bis 1,0 mg/L BSA angesetzt. Zum Blindabgleich wird entmineralisiertes Wasser verwendet.

Für alle Proben und Lösungen werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.5.4 Bestimmung der Gesamtergotalkaloidkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes erfolgt nach der Methode von van Urk, die von MICHELON UND KELLEHER [1963] modifiziert wurde. Dabei reagieren die Indolderivate mit dem Reagenz para-Dimethylaminobenzaldehyd und werden im zweiten Schritt durch Natriumnitrit oxidiert, wobei ein blauer Farbkomplex entsteht.

Zur Durchführung werden 700 μL der Kultivierungsprobe mit 700 μL des Reagenz I (s. Anhang) vermischt und 60 Minuten in der Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wird die Extinktion (E_1) dieser Lösung in einer Quarzglasküvette (Schichtdicke 10 mm) mit einem Spektralphotometer (UVIKON 922, Fa. Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Zu 1 μL dieser Lösung werden 25 μL Reagenz II (s. Anhang) gegeben, durchmischt und die Extinktion (E_2) bestimmt.

Von jeder Probe werden drei verschiedene Verdünnungen hergestellt und jede Verdünnung wie oben beschrieben analysiert. Die Differenz der jeweiligen Extinktionswerte ($E_2 - E_1$) ergibt für jede Verdünnung den Extinktionswert E_p . Aus den drei E_p -Werten einer Probe wird mittels linearer Regression die Steigung ΔE_p ermittelt. Die Gesamtalkaloidkonzentration der Probe ergibt sich aus der Division von ΔE_p und der Steigung der Kalibrationsgeraden ΔE_K . Die Kalibrationsgerade wird durch Extinktionsmessung von insgesamt 7 Ergotaminstandardlösungen (s. Anhang) im Konzentrationsbereich von 5-100 $\mu\text{g/mL}$ ermittelt [MENGE, 2000].

3.3 Chemometrische Datenanalyse und Modellbildung

Die chemometrische Datenanalyse wird in Zusammenarbeit mit D. Solle, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, ausgeführt. In den folgenden Abschnitten wird eine kurze Übersicht über die angewendeten Methoden gegeben. Ausführliche Beschreibungen dieser Methoden sind bei SOLLE [2003] dargestellt. Allgemeine Informationen zur Chemometrik finden sich bei DANZER [2001].

3.3.1 Datenvorverarbeitung

Eine Berechnung von Differenzspektren im Rahmen der Datenvorverarbeitung kann erforderlich sein, wenn die Ausgangsbedingungen (z.B. Medienzusammensetzung, Animpfdichte) von Bioprozess zu Bioprozess variieren und zu deutlichen Unterschieden in den Fluoreszenzspektren führen.

Ein Differenzspektrum wird aus der Differenz eines Fluoreszenzspektrums, das während des Prozesses, und einem Spektrum, das zu Beginn des Prozesses (nach dem Animpfen) aufgenommen wurde, berechnet. Im Differenzspektrum sind dann ausschließlich die absoluten Änderungen der Fluoreszenzintensität, die während des Prozesses auftreten, enthalten. Die Auswertung der Fluoreszenzdaten kann dann weitestgehend unabhängig von der Medienzusammensetzung oder anderen Ausgangsbedingungen erfolgen.

3.3.2 Hauptkomponentenanalyse und Modellbildung

Die chemometrische Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe der Software UNSCRAMBLER (Fa. Camo), die eine schnelle Berechnung sowie vielfältige Möglichkeiten zur Auswertung bietet.

Ziel der Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis) ist es, die Variablen der Datenmatrix durch eine geringe Zahl von untereinander unkorrelierten Hauptkomponenten so darzustellen, dass die ursprüngliche Information erhalten bleibt. Die Hauptkomponentenanalyse ermöglicht es, Aussagen über die Struktur und Komplexität der Prozessdaten sowie von Variationen innerhalb und zwischen verschiedenen Bioprozessen zu machen. Eine entsprechende Interpretation ist bei der Auftragung von zwei Hauptkomponenten gegeneinander (Scoreplot) möglich.

Bei der Modellbildung werden für jede Prozessgröße je ein PLS1-Modell erstellt. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten aller Wellenlängenkombinationen als unabhängige

Variablen (X-Variablen) verwendet. Als abhängige Variablen (Y-Variablen) werden die Offline-Messwerte der Prozessgrößen eingesetzt.



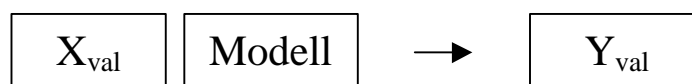
Der Fehler der Kalibrierung wird als RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration, Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Kalibrierung) angegeben (Gleichung 3-1, [ESBENSEN, 2000]).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^M - y_{i,cal})^2}{n}} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

M: Messung, cal: Kalibrierung, n: Anzahl der Messungen

3.3.3 Validierung

Die Validierung der chemometrischen Modelle erfolgt durch Anwendung der Modelle auf einen neuen Datensatz, d.h. mit Fluoreszenzdaten und Offline-Messwerten eines neuen Bioprozesses. Die Prozessgrößen dieses Bioprozesses werden dabei aus den Fluoreszenzspektren vorhergesagt.



Für alle Vorhersagen wird der RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction, Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Vorhersage) berechnet (Gleichung 3-2, [ESBENSEN, 2000]).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^M - y_{i,pre})^2}{n}} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

M: Messung, pre: Vorhersage, n: Anzahl der Messungen

3.3.4 Sensitivitätsanalyse

Die Sensitivitätsanalyse identifiziert die Bereiche in den Fluoreszenzspektren, die für die Vorhersage einer Prozessgröße eine hohe Relevanz besitzen. Dabei werden für eine Probe die X-Variablen nacheinander entweder um einen absoluten oder einen relativen Betrag variiert. Die Differenz der variierten Vorhersage und der unveränderten Vorhersage ergibt das Maß der Relevanz der einzelnen Wellenlängen für die Vorhersage. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Abstände in Relation zum maximalen Abstand gesetzt. Bei PLS-Modellen werden die Regressionskoeffizienten der einzelnen Wellenlängen-kombinationen, die direkt aus dem Modell zugänglich sind, für die Beurteilung der Sensitivität herangezogen. Die Ergebnisse können grafisch im Sensitivitätsspektrum mit Werten zwischen 0 und 1 (keine und maximale Sensitivität) dargestellt werden. Die Sensitivitätsspektren ermöglichen eine unmittelbare Beurteilung der Anwendbarkeit der Modelle und ermöglichen Rückschlüsse auf prozessrelevante Fluorophore.

4 Ergebnisse und Diskussion

Bei einer Vielzahl von Verfahren und Bioprozessen wurden bereits fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt und analysiert, teilweise mit Hilfe chemometrischer Methoden, um die Fluoreszenzdaten zur Bestimmung von Prozessgrößen und zur Prozessbeobachtung zu nutzen (s. Kapitel 2).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Anwendbarkeit der chemometrischen Auswertung von Fluoreszenzdaten zur Prozessbeobachtung bei verschiedenen Bioprozessen untersucht. In Zusammenarbeit mit der Gilde Brauerei AG in Hannover werden fluoreszenzspektroskopische Messungen bei Bierbrauprozessen und Hefereinzuchtverfahren durchgeführt. Weitere Untersuchungen erfolgen bei Tierzellkultivierungen und Kultivierungen des Pilzes *Claviceps purpurea*. Die Auswertung der Prozess- und Fluoreszenzdaten sowie die Erstellung von chemometrischen Modellen wird in Zusammenarbeit mit D. Solle (Institut für Technische Chemie, Hannover) durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden in den folgenden Kapiteln für jeden der genannten Bioprozesse vorgestellt, dabei wird jeweils zuerst eine kurze Beschreibung des Bioprozesses gegeben. Beispiele der online gemessenen Fluoreszenzspektren und Änderungen der Fluoreszenzintensitäten während der Prozesse werden ebenfalls dargestellt. Eine erste Bewertung der Fluoreszenzdaten in Bezug auf den Informationsgehalt und Eignung der Daten zur Bioprozessbeschreibung wird vorgenommen. Im Anschluss werden die entwickelten Modelle zur Vorhersage der einzelnen Prozessgrößen angewendet, die Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und eine allgemeine Diskussion zur chemometrischen Auswertung von fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei Bioprozessen folgt in Kapitel 5.

Zunächst soll ein kurzer Überblick zu fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei Bioprozessen und den wichtigsten biogenen Fluorophore gegeben werden.

4.1 Fluoreszenzspektren von Kultivierungsproben

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgt durch die Einstrahlung von Licht verschiedener Exzitationswellenlängen in das Medium und der Detektion der jeweils emittierten Wellenlängen. Bei Auftragung der detektierten Fluoreszenzintensität in

Abhängigkeit von Exzitations- und Emissionswellenlänge ergibt sich ein zweidimensionales Fluoreszenzspektrum (Abbildung 4-1).

In dem dargestellten Spektrum einer Lösung von verschiedenen biogenen Fluorophoren sind die typischen Bereiche erhöhter Fluoreszenzintensität zu erkennen, die im Allgemeinen auch bei Kultivierungen von Mikroorganismen zu finden sind. Die charakteristischen Exzitations- und Emissionswellenlängen dieser biogenen Fluorophore sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Die Fluoreszenzpeaks der Coenzyme NADH und FMN sind in Spektren von Kultivierungsproben meist eindeutig zu identifizieren. Gleiches gilt für die Aminosäure Tryptophan, die im Vergleich zu den Coenzymen eine geringere Fluoreszenzintensität zeigt. Weitere biogene Fluorophore wie die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin sowie andere Coenzyme (z.B. Pyridoxin) spielen aufgrund ihrer geringen Quantenausbeute im Vergleich zu den obengenannten Fluorophoren eine untergeordnete Rolle, da ihre Fluoreszenz entweder eine zu geringe Intensität aufweist, um eindeutig zugeordnet werden zu können, oder weil eine Überlagerung des emittierten Lichtes durch die stärkeren Fluorophore auftritt.

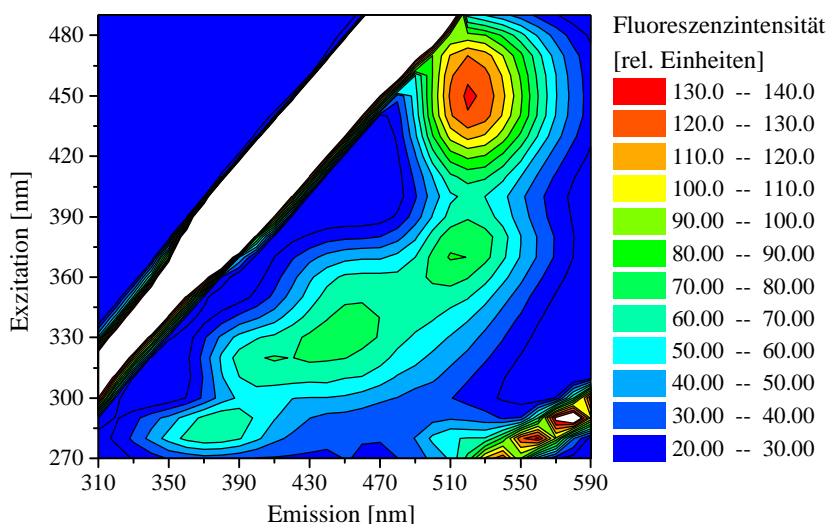


Abbildung 4-1

Fluoreszenzspektrum (Hitachi F-4500) einer Lösung von verschiedenen biogenen Fluorophoren (FMN, NADH, Pyridoxin, Tryptophan)

Die Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Ionenkonzentration, der Viskosität, der optischen Dichte, der Temperatur, der Zusammensetzung des Mediums sowie vom Volumen und der Anzahl von Gasblasen [LI UND HUMPHREY, 1991]. Insbesondere bei Bioprocessen haben diese Faktoren aufgrund der komplexen Medienzusammensetzung oder wechselnder

Kultivierungsbedingungen (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Begasung) einen großen Einfluss. Eine direkte Korrelation der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors zu seiner Konzentration ist unter solchen Bedingungen nur in seltenen Fällen möglich. Auf der anderen Seite fließen auf diese Weise eine Vielzahl von Informationen in das Fluoreszenzspektrum ein, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Kultivierungsablauf stehen. Unter Einsatz von chemometrischen Verfahren können diese Informationen der Fluoreszenzspektren genutzt werden, um Bioprozessgrößen zu berechnen. Inwieweit exakte Vorhersagen von Prozessgrößen möglich sind und welche Einflüsse bei den Berechnungen beachtet werden müssen, wird nachfolgend an mehreren Beispielen gezeigt.

Tabelle 4-1

Exzitations- und Emissionswellenlängen biogener Fluorophore [SCHULMAN, 1985; WOLFBEIS, 1985]

Fluorophor	Exzitations- / Emissions- wellenlänge [nm _{Ex} /nm _{Em}]
FMN, FAD	365 / 520 , 450 / 530
NADH	340 -363 / 435 - 470
NADPH	340 / 460
Pyridoxin	324 / 390
Tryptophan	287 / 348
Tyrosin	275 / 303
Phenylalanin	260 / 282

4.2 Untersuchungen bei Bierbrauprozessen

Der Bierbrauprozess als eines der ältesten biotechnischen Verfahren dient heute zu einer weltweiten Bierproduktion von 1,2 Mrd. hL Bier, davon werden mehr als 10 % in Deutschland produziert. Die deutsche Brauwirtschaft zählt aufgrund der abgesetzten Menge Bier zu den größten deutschen Wirtschaftsfaktoren [WWW.BIER.DE]. Aus ökonomischen Gründen wird auch bei der Bierbrauerei fortlaufend an der Entwicklung von neuen und optimierten Prozesskontrollsystemen gearbeitet, um eine wirtschaftliche Produktion zu gewährleisten. Mit diesem Ziel wird die Online-Fluoreszenzspektroskopie auf die Einsatzmöglichkeit zur Prozessbeobachtung in der Bierbrauerei untersucht. Im Rahmen des EU-Projektes OPUS (Projekt IN 309051 25064/0) werden in Zusammenarbeit mit der Gilde Brauerei AG, Hannover, Fluoreszenzmessungen während mehrerer Brauprozesse im

Technikumsmaßstab und während der Hefereinzucht in der Brauerei durchgeführt. Ausführliche Beschreibungen zur Bierbrauerei finden sich bei NARZIß [1995] oder im Internet unter WWW.BIER.DE.

4.2.1 Prozessverlauf

Für die Durchführung von mehreren Gärungen im Technikumsmaßstab werden von der Gilde Brauerei AG die erforderlichen Rohstoffe Würze und Hefe zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung des Extraktgehaltes und der Konzentration der vicinalen Diketone (Butadion-2,3 und Pentadion-2,3) der im Verlauf der Gärungen gesammelten Proben wird ebenfalls von der Gilde Brauerei übernommen. Des Weiteren werden während der Brauprozesse durch Online-Messung der pH-Wert und durch mikroskopische Auszählung die Zellzahl bestimmt. Während der Prozesse erfolgen die Probenahmen in dem Bereich des Fermenters, in dem auch die fluoreszenzspektroskopischen Messungen durchgeführt werden (s. Kapitel 3.2.1). Da während der Gärung das Absinken der Hefen erfolgt, ist die Zellzahl nicht in allen Bereichen des Fermenters gleich. Die Angaben, die hier zu Zellzahl und zu den anderen Prozessgrößen gemacht werden, beziehen sich deshalb nur auf den Ausschnitt, in dem Probenahmen und Messungen erfolgen.

Der Verlauf der analysierten Prozessgrößen während der Gärung B3 ist in Abbildung 4-2 grafisch dargestellt.

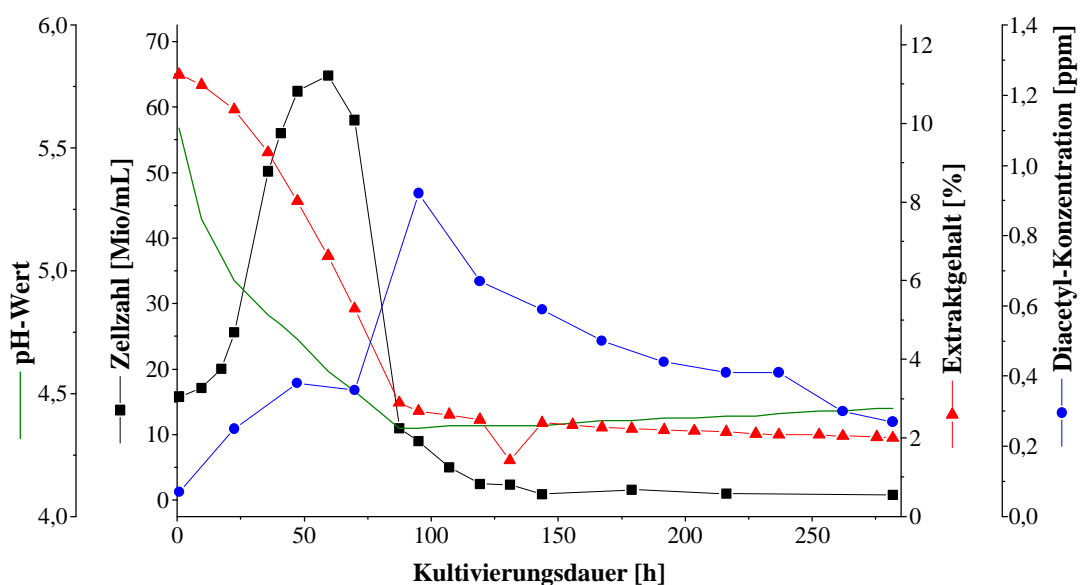


Abbildung 4-2

Darstellung des pH-Wertes, der Zellzahl, des Extraktgehaltes und der Diacetyl-Konzentration während der Gärung B3

Es ist zu erkennen, dass der Extraktgehalt von anfangs 11,2 % kontinuierlich abgebaut wird. Am Ende des Prozesses ist der Extraktgehalt auf 2,0 % abgesunken. Die Zellzahl steigt zunächst durch starke Zellteilung von 15,8 Mio. Zellen/mL auf 66,0 Mio. Zellen/mL an und fällt anschliessend durch das Absinken der Hefezellen auf 0,8 Mio. Zellen/mL. Bedingt durch die Stoffwechselaktivität sinkt der pH-Wert von 5,6 bis zur 200. Stunde auf 4,3 ab. Im weiteren Verlauf steigt der pH-Wert wieder schwach an, der Extraktgehalt und die Zellzahl nehmen weiterhin leicht ab. Die vicinalen Diketone werden zuerst durch extrazelluläre Bildung angereichert und im Verlauf des Prozesses wieder enzymatisch abgebaut [NARZIß, 1995]. Die in der Abbildung dargestellte Konzentration des Diketons Butadion-2,3 (Diacetyl) steigt bis zur 95. Stunde von 0,07 ppm auf 0,92 ppm an. Anschließend ist eine Abnahme der Konzentration zu beobachten. In der 280. Stunde wird eine Konzentration von 0,27 ppm gemessen.

Der zur 130. Stunde bestimmte Wert des Extraktgehaltes ist im Vergleich zum vorhergehenden und nachfolgenden Wert sehr niedrig. Dieser Wert kann auf einen Analysenfehler zurückgeführt werden und wird deshalb nicht mit in die weiteren Auswertungen einbezogen.

4.2.2 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Während der Gärungen werden im Abstand von 15 Minuten Fluoreszenzspektren mit dem BioView-Sensor aufgenommen. Um eine erste Aussage über den Informationsgehalt der Spektren zu erhalten, werden die Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten der Gärung miteinander verglichen. In Abbildung 4-3a) ist ein Spektrum der reinen Würze (Bierwürze mit Hopfen) vor der Zugabe der Hefezellen und in Abbildung 4-3b) bis d) sind Spektren des Prozesses B1 im Verlauf der Gärung dargestellt.

In den Spektren können den Bereichen mit erhöhter Fluoreszenzintensität, die sich ebenfalls im Verlauf der Gärung ändert, verschiedene biogene Fluorophore zugeordnet werden (s. Tabelle 4-1). Im Spektrum der reinen Würze (Abbildung 4-3a)) sind erhöhte Fluoreszenzintensitäten in den Wellenlängenbereichen von 270 nm_{Ex}/370 nm_{Em} (Tryptophan), 390 nm_{Ex}/470 nm_{Em} (NADH) und 430 nm_{Ex}/530 nm_{Em} (FMN) zu finden. Diese Bereiche weisen auch in den Spektren, die während der Gärung aufgenommen werden, Fluoreszenzpeaks auf, dabei sind Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten zu erkennen. So ist beispielsweise nach dem Animpfen mit Hefezellen die Fluoreszenzintensität in den Bereichen von NADH und Flavinen deutlich erhöht. Um 270 nm_{Ex}/370 nm_{Em} im

Bereich der Aminosäure Tryptophan ist nur eine schwache Zunahme sichtbar. Zusätzlich ist eine Änderung der Fluoreszenzintensität im Bereich 530nm_{Ex}/570 nm_{Em} zu erkennen. Auf welche Bestandteile diese Fluoreszenz zurückzuführen ist, konnte anhand der Literaturdaten nicht eindeutig geklärt werden. Im Verlauf der Gärungen treten dann Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten in allen genannten Bereichen auf.

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Würze mit ihren zahlreichen Inhaltsstoffen ist davon auszugehen, dass weitere Fluorophore in der Bierwürze vorhanden sind, die nur eine geringe Fluoreszenzintensität aufweisen und deshalb bei diesen Darstellungen nicht erkennbar sind.

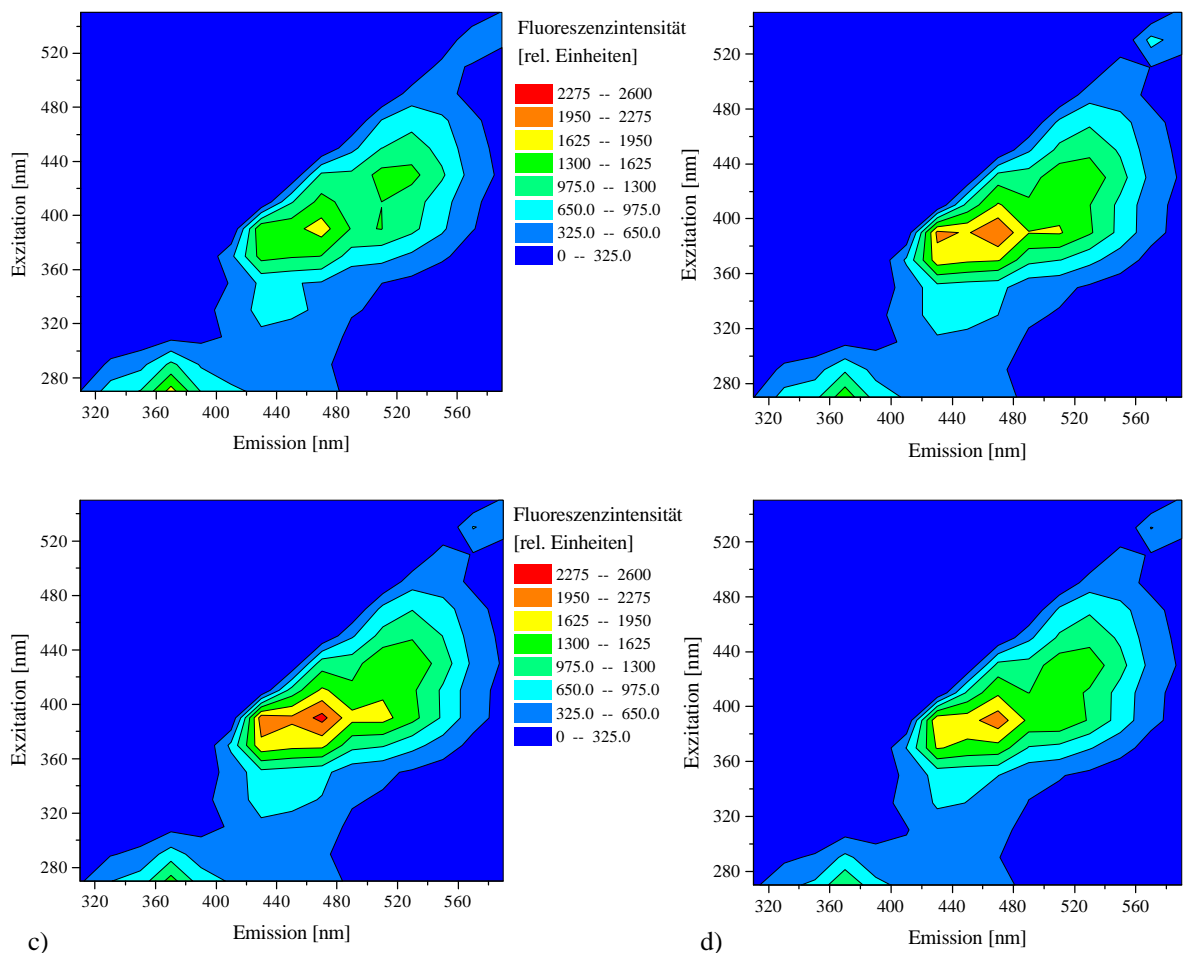


Abbildung 4-3

Fluoreszenzspektren zu verschiedenen Zeitpunkten der Gärung B1

a) vor dem Animpfen, b) nach dem Animpfen mit Hefezellen, c) höchste Konzentration an Diacetyl, d) am Ende der Gärung

Ausschlaggebend für die Verwendung der Fluoreszenzdaten zur chemometrischen Auswertung ist aber vor allem eine hohe Varianz der Fluoreszenzdaten im Verlauf der

Bioprozesse. Deshalb werden als nächstes die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensitäten von den genannten Wellenlängenkombinationen betrachtet (s. Abbildung 4-4).

Bei der Wellenlängenkombination $390\text{ nm}_{\text{Ex}}/470\text{ nm}_{\text{Em}}$ (NADH) ist bis zur 60. Stunde ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Anschließend nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab. Dieser Verlauf geht einher mit dem Verlauf der Hefezellzahl, die zuerst ansteigt und aufgrund des Absinkens der Hefe im zweiten Teil der Gärung abnimmt.

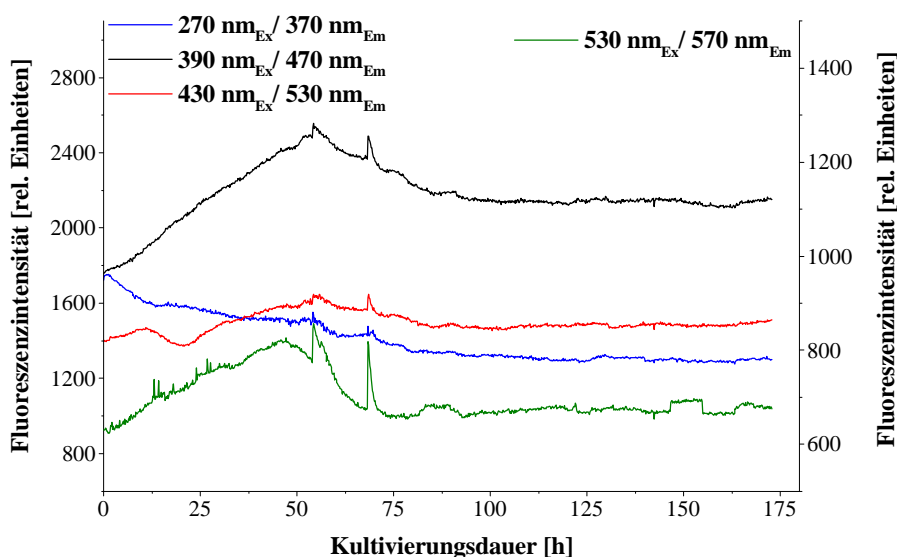


Abbildung 4-4

Darstellung der Fluoreszenzintensität verschiedener Wellenlängenkombinationen während der Gärung B1

Einen vergleichbaren Verlauf, wenn auch mit einem niedrigeren Maximum, zeigt der Wellenlängenbereich um $430\text{ nm}_{\text{Ex}}/530\text{ nm}_{\text{Em}}$ (FMN). Ein Unterschied ist jedoch zu Beginn des Prozesses zu erkennen. Zunächst nimmt die Fluoreszenzintensität zu, nach 12 Stunden fällt sie wieder leicht ab und steigt dann ab der 22. Stunde bis zum Maximum in der 60. Stunde. Diese Entwicklung kann auch bei allen weiteren durchgeführten Bierbrauprozessen beobachtet werden. Der Verlauf könnte durch die Umstellung des Stoffwechsels der Hefen aufgrund von Änderungen des Sauerstoffgehaltes erklärt werden. Die Bierwürze wird vor dem Animpfen durch Belüftung mit Sauerstoff gesättigt. Diese Sauerstoffsättigung ist erforderlich, um eine ausreichende Vermehrung der Hefe und damit einen befriedigenden Gärverlauf sicherzustellen [NARZIß, 1995]. Durch die Messungen des Sauerstoffgehaltes mit einer pO_2 -Elektrode kann beobachtet werden, dass nach etwa 10 Stunden kein Sauerstoff

mehr in der Würze vorhanden ist, so dass eine Umstellung des Stoffwechsels erforderlich wird. Diese Änderungen wirken sich dann auch auf die Fluoreszenzintensitäten bestimmter Wellenlängenbereiche aus. Vergleichbare Beobachtungen zum Einfluss wechselnder Sauerstoffbedingungen auf die Fluoreszenz werden von MAROSE [1999] bei Kultivierungen von *E. coli* beschrieben. Um zu bestätigen, dass die Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination $430 \text{ nm}_{\text{Ex}}/530 \text{ nm}_{\text{Em}}$ durch die sich ändernden Sauerstoffverhältnisse beeinflusst wird, sind weitere umfassendere Untersuchungen erforderlich.

Die Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination $270 \text{ nm}_{\text{Ex}}/370 \text{ nm}_{\text{Em}}$ (Aminosäurebereich) nimmt kontinuierlich während der gesamten Gärung ab. Diese Beobachtung stimmt überein mit der in der Literatur [NARZIB, 1995] beschriebenen Verstoffwechselung von Aminosäuren durch die Hefen während der Gärung.

Bei allen Verläufen sind ab der 100. Stunde nur noch geringe Änderungen zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt nimmt auch der Extraktgehalt schwächer ab und bei der Zellzahl sind keine Änderungen mehr zu beobachten.

Die Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination $530 \text{ nm}_{\text{Ex}}/570 \text{ nm}_{\text{Em}}$ zeigt teilweise einen sprunghaften Verlauf, wobei das Maximum zwischen der 47. und 54. Stunde nicht eindeutig zu erkennen ist. Zur 68. Stunde ist eine Spitze im Verlauf sichtbar, die auch bei allen anderen Wellenlängenkombinationen auftritt. Diese Anstiege sind auf einen Abfall der Temperatur zurückzuführen, der durch eine fehlerhafte Regelung bei der Kühlung des Fermenters verursacht wird (s. Anhang). Weitergehende Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit zeigen, dass im Temperaturbereich von $8\text{-}12 \text{ }^\circ\text{C}$, in dem die Gärungen durchgeführt werden, eine Änderung von $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ bei bestimmten Wellenlängenkombinationen bereits eine deutliche Änderung der Fluoreszenzintensität bewirkt. Bei starken Temperaturschwankungen ist dann eine chemometrische Auswertung der Fluoreszenzdaten nicht mehr sinnvoll. Deshalb ist bei der Durchführung von fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei Bioprocessen mit niedriger Kultivierungstemperatur eine konstante Temperaturführung erforderlich.

Die dargestellten Fluoreszenzintensitätsverläufe weisen während des Brauprozesses sehr individuelle Verläufe auf und sollten deshalb eine gute Basis für die chemometrische Auswertung bieten.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Auswertung der Fluoreszenzdaten berücksichtigt werden muss, ist die Zusammensetzung der Bierwürze. Die Würze als ein biologischer Rohstoff kann im Gegensatz zu genau definierten Medien Schwankungen in der Zusammensetzung aufweisen. Aus diesem Grund sind zum Vergleich neben dem in Abbildung 4-3a) gezeigten Spektrum der reinen Bierwürze in Abbildung 4-5a) und b) zwei weitere Spektren von Bierwürze der Gärungen B2 und B3 abgebildet.

In allen Spektren sind erhöhte Fluoreszenzintensitäten in den oben beschriebenen Bereichen zu erkennen, Unterschiede bestehen jedoch in der jeweiligen Fluoreszenzintensität. So sind beispielsweise im Spektrum 4-5a) die Bereiche um $270 \text{ nm}_{\text{Ex}}/370 \text{ nm}_{\text{Em}}$ und $390 \text{ nm}_{\text{Ex}}/470 \text{ nm}_{\text{Em}}$ höher, der Bereich um $530 \text{ nm}_{\text{Ex}}/570 \text{ nm}_{\text{Em}}$ ist jedoch im Spektrum 4-5b) am höchsten. Die Unterschiede in den Spektren bedeuten nicht unbedingt große Differenzen in der Zusammensetzung oder in der Konzentration der Bierwürzen, denn die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht die Detektion von Fluorophoren bereits in sehr geringen Konzentrationen. Da diese Unterschiede der Spektren aber in die Berechnungen der chemometrischen Modelle und der Vorhersagen eingehen, müssen sie bei der Auswertung berücksichtigt werden. Aus diesem Grund werden im nächsten Kapitel weitere Untersuchungen zu diesem Aspekt beschrieben.

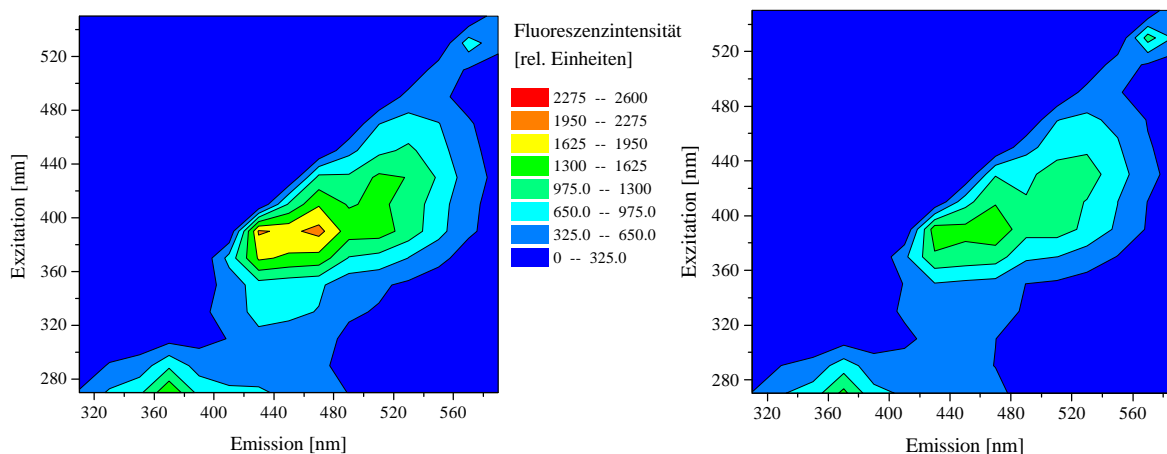


Abbildung 4-5

a) und b) Fluoreszenzspektren von Bierwürze, die bei den Gärungen B2 und B3 verwendet werden

4.2.3 Hauptkomponentenanalyse

Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) sollen die Unterschiede in den Fluoreszenzverläufen zwischen den Gärungen und der Einfluss der

variierenden Zusammensetzung der Bierwürze untersucht werden. Für die Hauptkomponentenanalyse werden dazu die Spektren der Gärungen B2 und B3 verwendet. Im Scoreplot in Abbildung 4-6 sind die ersten beiden Hauptkomponenten, die die größten Varianzen in den Fluoreszenzspektren beschreiben, gegeneinander aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass im Verlauf einer Gärung die Varianz der Fluoreszenzspektren geringer ist als zwischen den beiden Gärungen, da die Scores der beiden Gärungen parallel zueinander verlaufen. Eine große Varianz zwischen den beiden Gärungen zeigt sich durch die Verschiebung der Scores parallel zur 1. Hauptkomponente.

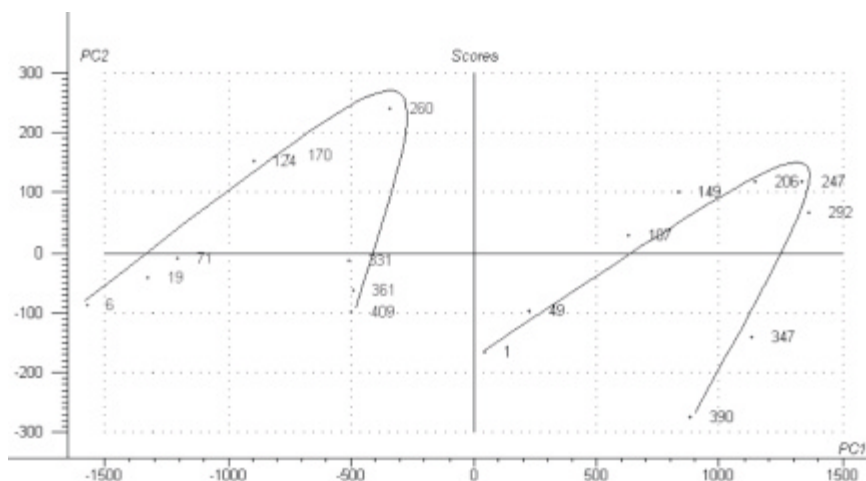


Abbildung 4-6

Darstellung der Gärungen B2 und B3 durch den Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse

Ob dieser Unterschied durch die verschiedenen Bierwürzen oder weitere Unterschiede in den Ausgangsbedingungen (z.B. unterschiedliche Zellzahl) verursacht wird, kann durch die Hauptkomponentenanalyse auf Basis von Differenzspektren (s. Kapitel 3.3.1) analysiert werden. Für die Brauprozesse wird deshalb von jedem Spektrum, das während der Prozesse aufgenommen wurde, das Differenzspektrum berechnet. Als Ausgangsspektrum wird dabei ein durch Mittelwertbildung drei aufeinanderfolgender Spektren, die zu Beginn der Gärung (nach dem Animpfen) gemessen wurden, berechnetes Spektrum eingesetzt.

In Abbildung 4-7 ist der Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse aus Differenzspektren der Gärungen B2 und B3 gezeigt. Die Scores der Gärungen liegen nun nahezu übereinander, das bedeutet, dass die Unterschiede zwischen den Gärungen durch die Bildung der Differenzspektren ausgeglichen werden. Die Varianz der Fluoreszenzspektren im Verlauf der Gärungen bleibt dabei erhalten.

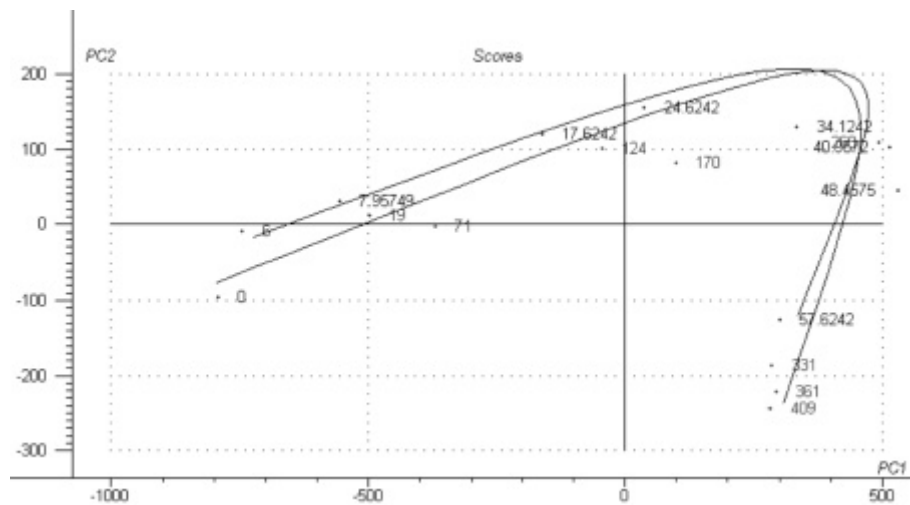


Abbildung 4-7

Darstellung der Gärungen B2 und B3 durch den Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse berechnet auf Basis von Differenzspektren

Im Scoreplot ist auch der Zeitpunkt des Beginns des Absinkens der Hefezellen zu erkennen. Am Anfang erfolgt ein geringer Anstieg der zweiten Hauptkomponente, aber eine starke Änderung der ersten Hauptkomponente. Zum Zeitpunkt des Beginns des Absinkens der Hefezellen wechseln diese Tendenzen deutlich. Die erste Hauptkomponente ändert sich nur noch gering, die zweite Hauptkomponente fällt aber stark ab. Im Scoreplot ist somit der charakteristische Verlauf der Bierbrauprozesse wieder zu erkennen.

Für die folgende Berechnung der chemometrischen Modelle und für die Vorhersagen der Prozessgrößen bei den Gärungen werden deshalb ausschließlich die Differenzspektren verwendet, da auf diese Weise nur die absoluten Änderungen während der Gärungen in die Auswertung eingehen und unterschiedliche Anfangsbedingungen wie verschiedene Würzezusammensetzung oder Zellzahlen aufgehoben werden.

4.2.4 Modellbildung und Validierung

Die Bildung der chemometrischen Modelle erfolgt auf Basis von insgesamt drei im Technikumsmaßstab durchgeführten Gärungen (B1, B2 und B4). Es wird für jede der Prozessgrößen (Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert und Diacetyl-Konzentration) ein PLS-Modell mit jeweils drei Hauptkomponenten berechnet, für das PLS-Modell der Diacetyl-Konzentration werden vier Hauptkomponenten verwendet [BOEHL, 2000].

Im Rahmen der externen Validierung werden die erstellten Modelle eingesetzt, um aus den Prozessdaten der Gärung B3 diese Prozessgrößen vorherzusagen. Im Folgenden sind jeweils

die vorhergesagten Werte und zum Vergleich die bei diesem Brauprozess B3 offline ermittelten Werte aufgetragen. Die berechneten Fehler der Vorhersagen (RMSEP) sind für alle Prozessgrößen in Tabelle 4-2 (Seite 36) zusammengefasst. In Abbildung 4-8 ist die Vorhersage für den Extraktgehalt dargestellt.

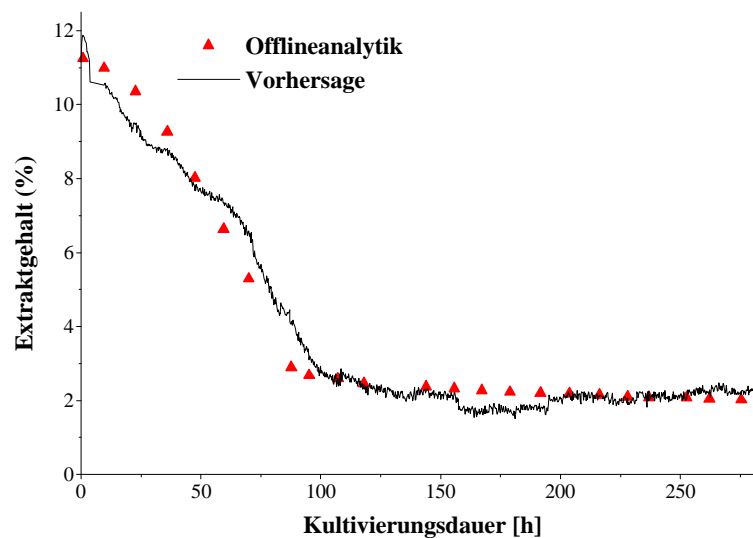


Abbildung 4-8

Darstellung der Vorhersage des Extraktgehaltes während der Gärung B3

Der RMSEP dieser Vorhersage beträgt 4,7 % (rel.), wobei in der Auftragung zu erkennen ist, dass Differenzen zwischen Vorhersage und offline gemessenen Werten vor allem bis zur 100. Stunde zu finden sind, folglich in dem Zeitraum, in dem die stärksten Änderungen im Extraktgehalt während des Brauprozesses auftreten. Insgesamt gesehen wird der Verlauf des Extraktgehaltes während des Brauprozesses sehr gut durch die Vorhersage wiedergegeben, so dass der tendenzielle Verlauf dieser Prozessgröße bereits gut verfolgt werden kann.

Die chemometrische Auswertung der Fluoreszenzdaten wird auch für den pH-Wert durchgeführt, obwohl dieser beim Brauprozess mittels pH-Elektroden direkt gemessen werden kann. Diese Prozessgröße wird in die Untersuchungen mit einbezogen, um eine Aussage über die Eignung der Fluoreszenzspektroskopie zur Prozessbeobachtung für weitere Anwendungsmöglichkeiten machen zu können. In der Brauerei ist der Einsatz dieser Methode auch bei anderen Produktionsschritten (nach der Filtration, während der Lagerung) oder zur Qualitätskontrolle des abgefüllten Endproduktes denkbar.

Der Fehler der Vorhersage des pH-Wertes während des Prozesses B3 ist mit 1,1 % sehr gering. Bei Betrachtung der Auftragung der berechneten Werte in Abbildung 4-9 zeigt sich,

dass im Kurvenverlauf der Vorhersage jedoch sprunghafte Anstiege bzw. Abfälle zu erkennen sind. Diese unbeständigen Verläufe sind auch im Verlauf der Fluoreszenzintensität einiger Wellenlängenkombinationen wiederzufinden, z.T. sind solche auch bei der in Abbildung 4-4 gezeigten Wellenlängenkombination $530\text{nm}_{\text{Ex}}/570\text{nm}_{\text{Em}}$ zu erkennen. Da das chemometrische Modell auf mehreren dieser betroffenen Wellenlängenkombinationen basiert, wie aus berechneten Sensitivitätsspektren (s. Kapitel 3.3.4) hervorgeht, gehen die Sprünge auch in die Vorhersagen ein. Diese Unregelmäßigkeiten im Kurvenverlauf werden durch Temperaturschwankungen während der Gärung hervorgerufen. Wie in Kapitel 4.2.2 bereits beschrieben, ist der Einfluss der Temperatur im Temperaturbereich um $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehr groß. Unter der Voraussetzung, dass auf die exakte Einhaltung der Temperatur geachtet wird, können für den pH-Wert sehr gute Vorhersagen erzielt werden.

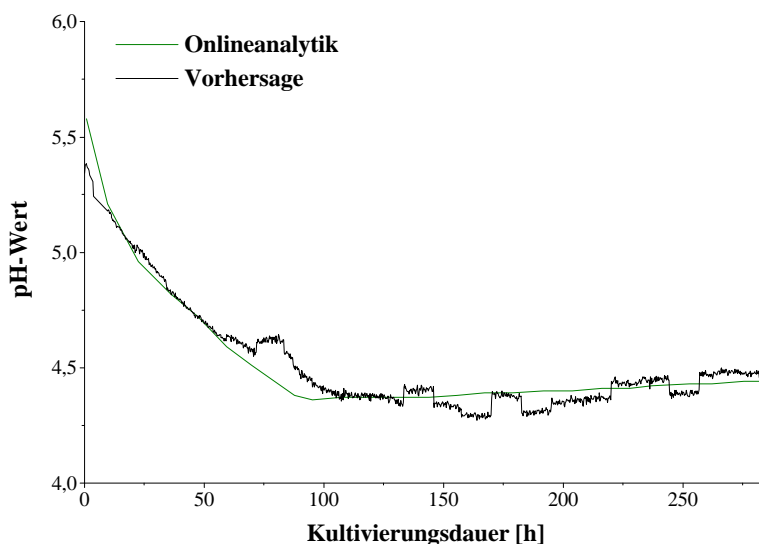
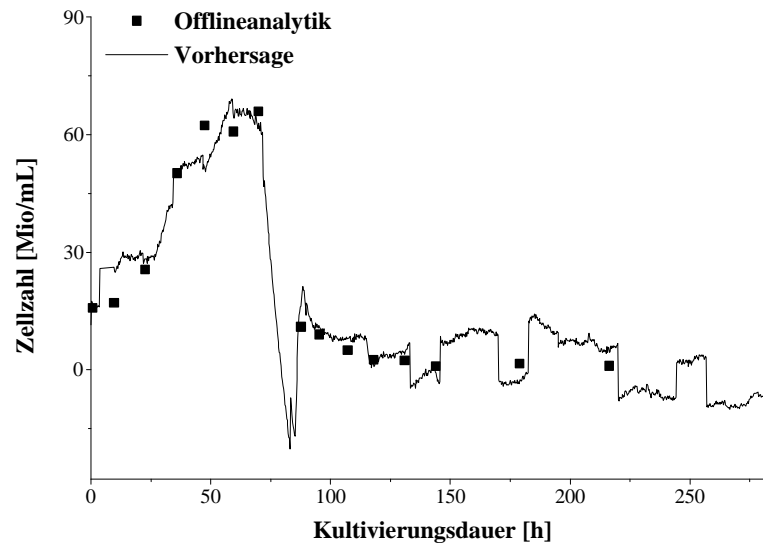


Abbildung 4-9

Darstellung der Vorhersage des pH-Wertes während der Gärung B3

Der beschriebene Einfluss von Temperaturänderungen ist bei der Berechnung der Zellzahl aus den Fluoreszenzdaten noch stärker. Die in Abbildung 4-10 dargestellte Vorhersage der Zellzahl weist im Kurvenverlauf deutliche Sprünge auf. Dadurch ist auch der Fehler der Vorhersage mit 6,9 % relativ hoch. Die Zunahme der Zellzahl sowie der Zeitpunkt des Beginns des Absinkens der Hefezellen wird gut wiedergegeben, so dass grundsätzlich die Zellzahl vorhergesagt werden kann.

**Abbildung 4-10**

Darstellung der Vorhersage der Zellzahl während der Gärung B3

Für die drei Prozessgrößen Extraktgehalt, pH-Wert und Zellzahl können mit den gesammelten Daten Vorhersagen erstellt werden, die die tendenziellen Verläufe dieser Größen sehr gut wiedergeben. Zum Teil konnten Vorhersagen mit nur geringen Abweichungen zu den Messwerten berechnet werden.

Ausschlaggebend für die Güte der Vorhersage ist der Bezug zwischen Prozessgröße und den Wellenlängenkombinationen, die bei der chemometrischen Auswertung verwendet werden.

So werden bei der Berechnung des Extraktgehaltes hauptsächlich Daten von Wellenlängenkombinationen aus dem Aminosäurebereich verwendet. Aminosäuren werden als Bestandteil des Extraktes während der Gärung durch den Hefestoffwechsel ebenfalls abgebaut. Die Aufnahme von Aminosäuren durch die Hefen erfolgt während der Gärung zwar in einer bestimmten Reihenfolge, so werden die fluoreszierenden Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin erst in einer dritten Gruppe aufgenommen [NARZIß, 1995], der in Abbildung 3-4 dargestellte Verlauf der Wellenlängenkombination $270 \text{ nm}_{\text{Ex}}/370 \text{ nm}_{\text{Em}}$ (Tryptophan) zeigt hingegen eine kontinuierliche Abnahme und die Daten aus diesem Bereich können für die Vorhersage für den Extraktgehalt genutzt werden.

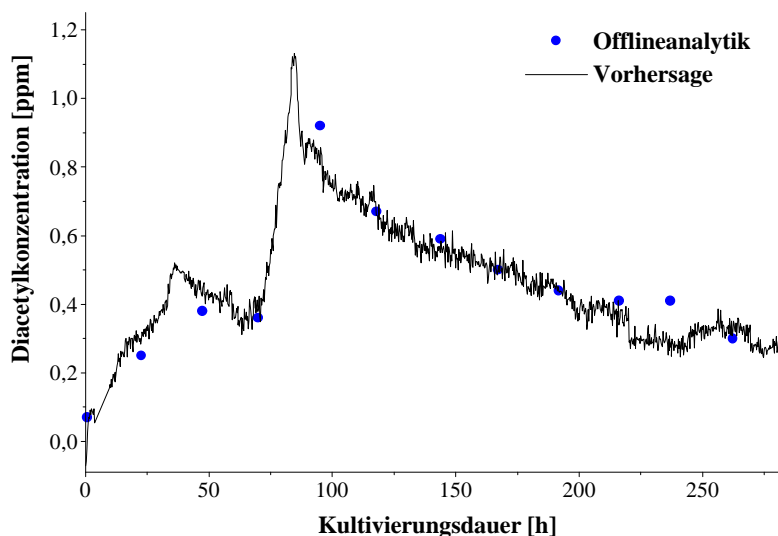
Die in der Literatur häufig beschriebene Übereinstimmung der Verläufe von Zelldichte und NADH-Fluoreszenz (s. Kapitel 2) wird auch hier gefunden. Der Verlauf der Wellenlängenkombination $390 \text{ nm}_{\text{Ex}}/450 \text{ nm}_{\text{Em}}$ (siehe Abbildung 4-4) entspricht dem Verlauf der Zelldichte während der Gärung und geht deshalb in die Berechnung am stärksten

mit ein. Die Gründe für die weniger gute Vorhersage als die des Extraktgehaltes sind zum einen die oben beschriebenen Einflüsse der Temperaturschwankungen und zum anderen der in diesem Fall komplexere Verlauf der Zellzahl (Anstieg während der Wachstumsphase und anschließende Abnahme durch Absinken der Hefezellen).

Allgemein ist die Fluoreszenzintensität eines Fluorophors vom pH-Wert abhängig. Da sich bei Bioprozessen die Konzentration der Fluorophore aufgrund des Stoffwechsels der Mikroorganismen ändert, kann diese Eigenschaft jedoch nicht zur Bestimmung des pH-Wertes ausgenutzt werden. Da die Änderung des pH-Wertes in Abhängigkeit vom Stoffwechsel der Hefen erfolgt, können zur chemometrischen Berechnung des pH-Wertes Wellenlängenkombinationen verwendet werden, die während der Gärung Änderungen aufgrund des Hefestoffwechsels zeigen. In das erstellte Modell gehen wiederum Wellenlängenkombinationen aus dem Aminosäurenbereich ein, aber auch weitere Wellenlängenkombinationen, die jedoch zum Teil stark von den Temperatureinflüssen betroffen sind.

Eine weitere Prozessgröße, die von Interesse für Brauereien ist, ist die Konzentration an vicinalen Diketonen. Vergleichbare Zusammenhänge zwischen Fluoreszenz und Prozessgröße können jedoch nicht für die Konzentrationsänderung der Diketone gefunden werden. Der extrazelluläre enzymatische Abbau ist nicht zu berechnen, da bereits nach dem Absinken der Hefen nur noch sehr geringe Änderungen der Fluoreszenzintensitäten zu beobachten sind (vgl. Abbildung 4-4). Aus diesem Grund konnte für die Diketonkonzentration keine zufriedenstellende Vorhersage gemacht werden. Die in Abbildung 4-11 dargestellte Vorhersage zeigt deutliche Abweichungen zwischen vorhergesagten und offline gemessenen Werten und vor allem starkes Rauschen im Kurvenverlauf. Der RMSEP dieser Vorhersage ist mit 15,8 % sehr hoch.

In diesem Fall wäre die Anwendung von mindestens zwei verschiedenen Modellen sinnvoll. Die Bildung der Diketone aufgrund der Stoffwechselaktivität der Hefen im ersten Teil des Prozesses könnte besser durch ein auf diesen Teil abgestimmtes Modell wiedergegeben werden als in einem gesamten Modell. Von Interesse für Brauereien ist jedoch der Abbau der vicinalen Diketone, da insbesondere das Diacetyl (Butandion-2,3) durch seine niedrige Geschmacksschwelle von 0,10-0,12 mg/L einen eindeutig verschlechternden Einfluss auf den Biergeschmack hat. Für diesen Abschnitt des Brauprozesses sind die Möglichkeiten zur Kontrolle durch die Fluoreszenzspektroskopie aufgrund der geringen Varianz der Fluoreszenzdaten sehr eingeschränkt.

**Abbildung 4-11**

Darstellung der Vorhersage der Diacetylkonzentration während der Gärung B3

Die Ergebnisse der chemometrischen Auswertung der Fluoreszenzmessungen während der Gärungen, die im Technikumsmaßstab durchgeführt wurden, zeigen eine gute Anwendbarkeit zur Prozessbeobachtung für die Prozessgrößen Extraktgehalt, pH-Wert und Zellzahl. Die in den Modellen relevanten Wellenlängenkombinationen sind für jede der Prozessgrößen sinnvoll.

Verbesserungen der Vorhersagegenauigkeit können erzielt werden, wenn bei der Erstellung der chemometrischen Modelle Daten aus weiteren Gärungen einbezogen werden, so dass die gesamte Varianz dieser Prozesse abgedeckt wird. Weiterhin ist bei der Durchführung eine konstante Temperaturführung erforderlich.

Tabelle 4-2

Übersicht der RMSEP der verschiedenen Prozessgrößen der Gärung B3

Prozessgröße	PLS 1-Modell - Differenzspektren	
	RMSEP (abs.)	RMSEP (rel.)
Extraktgehalt	0,53 %	4,7 %
pH-Wert	0,06	1,1 %
Zellzahl	4,59 Mio./mL	6,9 %
Diacetyl	0,14 ppm	15,8 %

4.3 Messungen bei Hefereinzuchten in der Brauerei

Bei der Hefereinzucht in der Brauerei werden die Bierhefen für den eigentlichen Gärprozess angezüchtet. Als Medium wird dabei ebenfalls Bierwürze verwendet, die Hefe wird beim Umpumpen zusätzlich belüftet [NARZIB, 1995]. Vergleichbare Prozesse zur Anzucht von Hefen werden auch in anderen Industriezweigen wie beispielsweise in Großbäckereien durchgeführt. Aufgrund der Anzahl von interessanten Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie zur Prozessbeobachtung wird die Hefereinzucht gewählt, um die ersten fluoreszenzspektroskopischen Messungen im großtechnischen Maßstab in einer Brauerei durchzuführen.

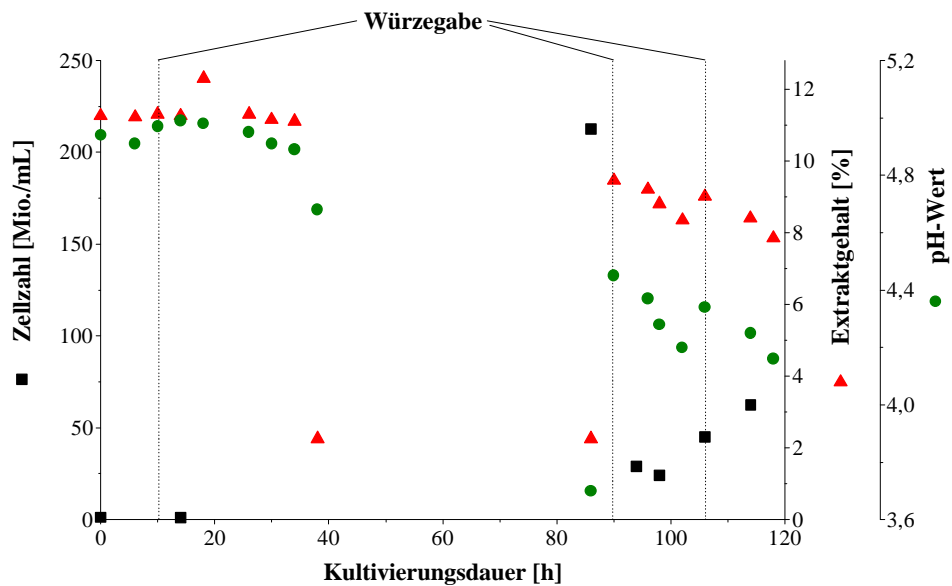
Eine erste Messserie während mehrerer Reinzuchtprozesse bei der Hasseröder Brauerei in Wernigerode soll Auskunft über den Verlauf der Fluoreszenzdaten und deren Informationsgehalt während der Hefereinzucht geben.

4.3.1 Prozessverlauf

Die Hefereinzucht in der Hasseröder Brauerei wird nach der gültigen Verfahrensanweisung durchgeführt. Dazu werden im Reinzuchttank 10 hL Würze mit einer Hefevorkultur von 10 L angeimpft und die Hefe innerhalb von 16 bis 18 Stunden mit periodischer Belüftung vermehrt. Dann werden weitere 50 hL sterile Würze „draufgelassen“ und die Reinzucht weitergeführt. Dieser Vorgang wird wiederholt, dabei werden nach ca. 90-92 Stunden und ein weiteres Mal nach ca. 110 Stunden jedesmal 300 hL Würze in den Reinzuchttank gefüllt. Die Würze wird während der Vermehrung der Hefen periodisch umpumpt und belüftet.

Während der Hefereinzuchten werden täglich im Abstand von 8 Stunden Proben entnommen und die Prozessgrößen Extraktgehalt, pH-Wert und die Zellzahl analysiert. Diese Daten sind in Abbildung 4-12 aufgetragen. Da an den Wochenenden in der Regel keine Probenahme erfolgt und in diesen ersten Versuchen zunächst auf zusätzliche Probenahmen verzichtet wird, sind im Bereich zwischen der 39. und 85. Stunde keine Daten aufgetragen.

Während der einzelnen Abschnitte der Hefereinzucht findet eine Vermehrung der Hefe statt, so dass am Ende eine Zelldichte von 100 Mio. Zellen/mL erreicht wird. Der Extrakt wird dabei abgebaut und der pH-Wert sinkt aufgrund des Hefestoffwechsels.

**Abbildung 4-12**

Darstellung von Zellzahl, Extraktgehalt und pH-Wert während der Hefereinzucht H2

4.3.2 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Nach der ersten Messserie während der Hefereinzucht werden die Geräteeinstellungen des BioView-Sensors angepasst. Bei den folgenden Hefereinzüchten werden Fluoreszenzspektren im Abstand von 5 Minuten aufgenommen. Weiterhin wird die Anzahl der Messungen pro Wellenlängenkombination auf 5 erhöht, weil bereits während der Hefereinzucht zu erkennen ist, dass durch das periodische Umpumpen des Tankinhaltes die Fluoreszenzmessungen entsprechend beeinflusst werden, da das Fluoreszenzspektrometer an die Rohrleitung angekoppelt ist (s. Kapitel 3.2.3), durch welches das Umpumpen und Belüften erfolgt. Diese Anpassung ergab jedoch keine Verbesserung, wie der Ausschnitt des Verlaufs einiger Wellenlängenkombinationen in Abbildung 4-13 zeigt. Die Intervalle des Umpumpens wirken sich auch auf den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten aus. In der Phase des Umpumpens und Belüftens entstehen Gasblasen, die die Fluoreszenzmessungen stark beeinflussen und dadurch deutlich andere Fluoreszenzintensitäten während dieser Phase gemessen werden.

Werden die erhaltenen Fluoreszenzdaten gemittelt, sind für die verschiedenen Wellenlängenkombinationen individuelle Verläufe der Fluoreszenzintensitäten zu erkennen. Die Varianzen der Fluoreszenzintensitäten, die durch das periodische Umpumpen hervorgerufen werden, sind aber größer als die Varianzen der gemittelten

Fluoreszenzintensitäten während des gesamten Verlaufs der Hefereinzucht. Durch eine Filterung der periodischen Schwankungen kann eine Verbesserung durch die Reduzierung der Varianzen erzielt werden, jedoch für die Berechnung von chemometrischen Modellen wird keine ausreichende Verbesserung erreicht. Die Fluoreszenzdaten, die mit dem verwendeten Messprinzip ermittelt werden, können deshalb nicht für die chemometrische Auswertung der Hefereinzucht verwendet werden.

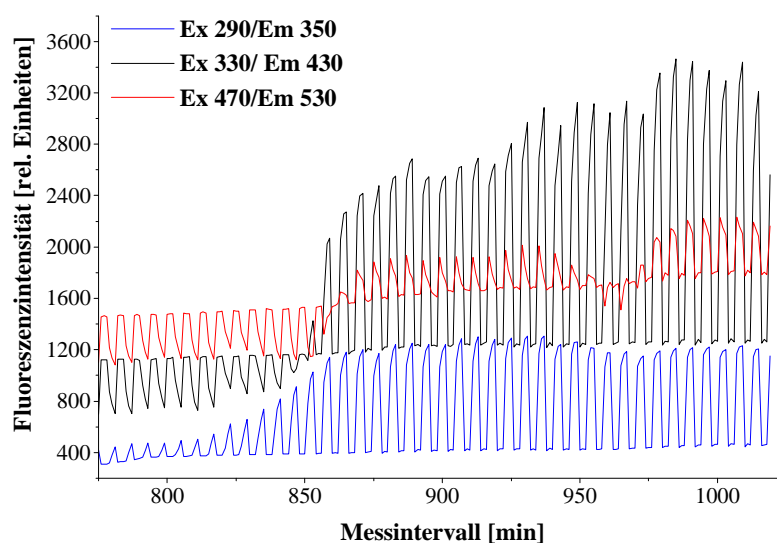


Abbildung 4-13

Darstellung des Verlaufs einiger Wellenlängenkombinationen während der Hefereinzucht H2

Durch einen anderen apparativen Aufbau mit einer geeigneten Messzelle (z.B. einem System wie es von FRERICHS [2000] zur in situ-Mikroskopie eingesetzt wird) sollte es möglich sein, Fluoreszenzdaten zu erhalten, die zur Vorhersage von Prozessgrößen während der Hefereinzucht verwendet werden können.

Um die Veränderungen in den Fluoreszenzspektren zu verdeutlichen, werden im Folgenden die Fluoreszenzspektren von verschiedenen Zeitpunkten der Hefereinzucht miteinander verglichen (Abbildung 4-14).

Die Spektren, die jeweils zu Beginn des ersten und zweiten Abschnittes der Hefereinzucht aufgenommen wurden (Abbildung 4-14a) und b)), zeigen Fluoreszenzpeaks in den gleichen Wellenlängenbereichen, unterscheiden sich aber in den Fluoreszenzintensitäten. Diese Unterschiede werden wahrscheinlich vorwiegend durch die unterschiedlichen Zellzahlen und auch unterschiedliche Würzezusammensetzung hervorgerufen.

Als Beispiel für die Veränderungen während der Hefereinzucht sind ein Anfangs- und ein Endspektrum des zweiten Prozessabschnittes gezeigt. Es sind deutliche Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten erkennbar, die hauptsächlich durch den starken Anstieg der Zellzahl zu erklären sind. Einflüsse durch die gleichzeitige starke Abnahme des Extraktgehaltes und des pH-Wertes können bei dieser Darstellung nicht zugeordnet werden.

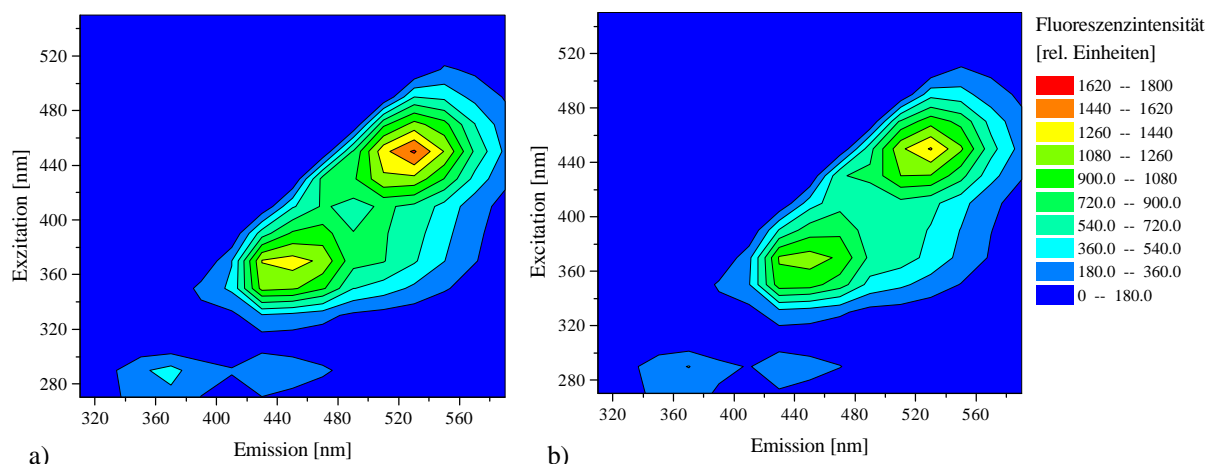
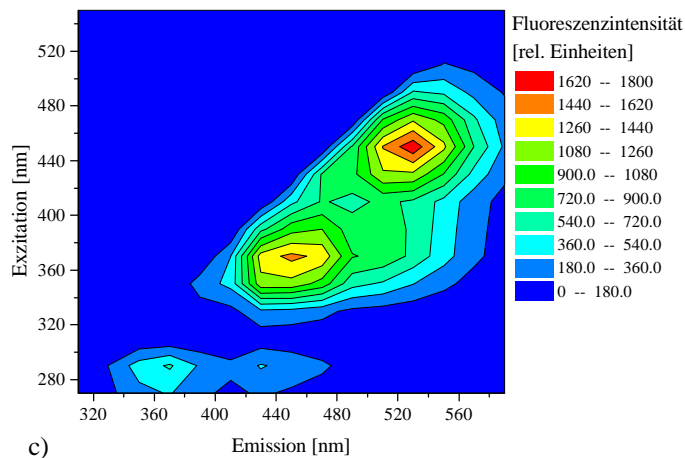


Abbildung 4-14

Fluoreszenzspektren zu verschiedenen Zeitpunkten der Hefereinzucht H2

- Beginn des ersten Abschnittes
(Extraktgehalt 11,3%; pH-Wert 4,94; Zellzahl 1,3 Mio./mL)
- Beginn des zweiten Abschnittes
(Extraktgehalt 11,3%; pH-Wert 4,97; Zellzahl 1,0 Mio./mL)
- Ende des zweiten Abschnittes
(Extraktgehalt 2,3 %; pH-Wert 3,70; Zellzahl 212,8 Mio./mL)



Grundsätzlich sind die Informationen, die aus den Fluoreszenzspektren gewonnen werden, für eine Beobachtung des Verlaufes der Hefereinzucht geeignet. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass der apparative Aufbau bei den Messungen den Gegebenheiten angepasst werden muss. Außerdem sind bei der chemometrischen Auswertung die unterschiedlichen Bedingungen bei der Hefereinzucht zu beachten, wie zum einen die variierende Würzezusammensetzung und zum anderen die unterschiedlichen Zelldichten zu Beginn der einzelnen Prozesse. Diese Faktoren können über eine Auswertung mit Differenzspektren ausgeglichen werden, wie in Kapitel 4.2.3 gezeigt wurde.

4.4 Untersuchungen bei Kultivierungen von CHO-Zellen

Die genetisch veränderten CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) produzieren das Glycoprotein t-PA (tissue plasminogen activator), das zur Fibrinolyse bei Herzinfarkten eingesetzt wird und dessen biotechnische Produktion durch tierische Zellen essentiell in Bezug auf posttranslationale Modifikation wie Glykosylierung und korrekte Faltung des Proteins ist. Die Analytik für das Glycoprotein mittels ELISA ist verhältnismäßig teuer und zeitintensiv. Die Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozessbeobachtung wäre eine Möglichkeit diese Produktionskosten zu verringern. Neben der Analytik des Glykoproteins soll auch der Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie für die Beobachtung des Zellwachstums und des Glukoseverbrauchs untersucht werden. Da nur von einer Kultivierung von CHO-Zellen Fluoreszenzdaten aufgenommen werden konnten, ist eine Validierung der Modelle über die Vorhersage einer weiteren Kultivierung nicht möglich. Es werden deshalb bei diesem Beispiel die jeweiligen Modellkalibrierungen für die verschiedenen Prozessgrößen dargestellt und diskutiert.

4.4.1 Prozessverlauf

Die offline analysierten Prozessgrößen der Kultivierung der CHO-Zellen sind im zeitlichen Verlauf in Abbildung 4-15 dargestellt. Während des gesamten Prozesses wird die Glukose von 2,33 g/L auf fast 0,03 g/L kontinuierlich abgebaut. Gleichzeitig ist ein Zellwachstum von 0,29 Mio. Zellen/mL auf 1,03 Mio Zellen/mL zu beobachten. Die produzierte t-PA-Konzentration beträgt am Ende der Kultivierung 3,37 mg/L.

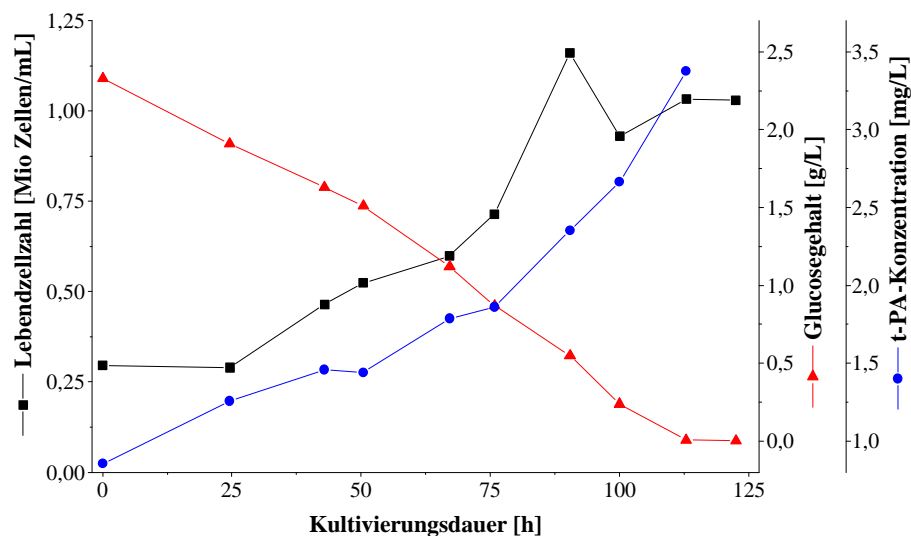


Abbildung 4-15

Darstellung der Lebendzellzahl, Glukosegehalt und t-PA-Gehalt während der Kultivierung von CHO-Zellen

Der zur 91. Stunde ermittelte Wert der Zellzahl ist auf einen Analysenfehler zurückzuführen und wird deshalb bei der weiteren chemometrischen Auswertung nicht berücksichtigt. Die dargestellten Verläufe der Prozessgrößen sind charakteristisch für eine Kultivierung tierischer Zellen.

4.4.2 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Die Messungen werden bei dieser Kultivierung mit dem Fluoreszenzspektrometer Hitachi F-4500 durchgeführt. Bei dem Messprinzip des Hitachi-Spektrometers werden Gitter verwendet, um das monochromatische Exzitations- und Emissionslicht zu erzeugen. Deshalb wird bei diesem Spektrometer auch das Streulicht detektiert, wie in dem abgebildeten Spektrum zu erkennen ist (Abbildung 4-16).

Bei diesem Spektrum vom Beginn der Kultivierung ist bereits eine sehr hohe Fluoreszenzintensität im Aminosäurebereich insbesondere bei $290\text{ nm}_{\text{Ex}}/340\text{ nm}_{\text{Em}}$ zu erkennen, die durch die hohe Konzentration an Aminosäuren (Tryptophan) im Kulturmedium bedingt ist. Der Bereich um $340\text{ nm}_{\text{Ex}}/420\text{ nm}_{\text{Em}}$ (NADH) weist hingegen nur eine geringe Intensität auf.

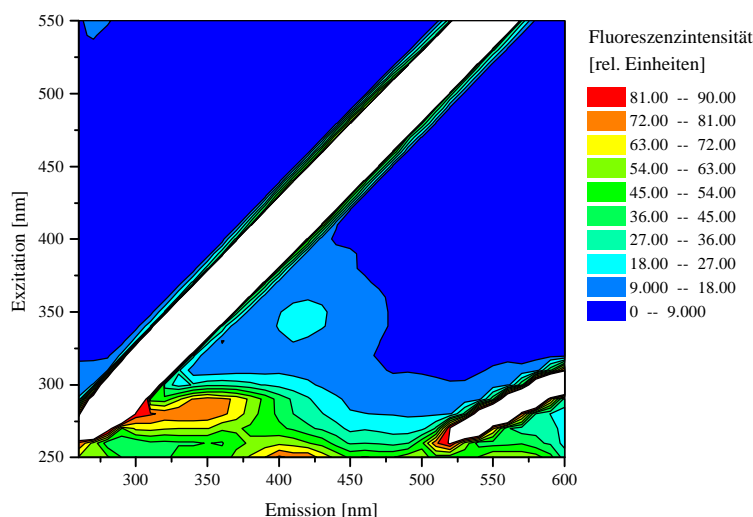


Abbildung 4-16

Fluoreszenzspektrum zu Beginn der Kultivierung von CHO-Zellen (Hitachi F-4500)

Die Änderungen der Fluoreszenzintensität während der Kultivierung sind sehr gering und deshalb wird auf die Darstellung weiterer Spektren verzichtet. Stattdessen werden die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensitäten einzelner Wellenlängenkombinationen dargestellt.

Bei Betrachtung der Verläufe der Fluoreszenzintensitäten, die in Abbildung 4-17 dargestellt sind, können deutliche Tendenzen festgestellt werden. So ist im Bereich der Aminosäuren ($280\text{ nm}_{\text{Ex}}/300\text{ nm}_{\text{Em}}$ und $280\text{ nm}_{\text{Ex}}/350\text{ nm}_{\text{Em}}$) eine Abnahme zu erkennen, da diese während der Kultivierung verstoffwechselt werden. Ein kontinuierlicher Anstieg während der gesamten Kultivierung ist bei $340\text{ nm}_{\text{Ex}}/420\text{ nm}_{\text{Em}}$ (NADH) zu erkennen. Und auch die Wellenlängenkombination $400\text{ nm}_{\text{Ex}}/400\text{ nm}_{\text{Em}}$ im Bereich des Streulichtes zeigt einen durchgehenden Anstieg der Intensität. Diese Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten im Streulicht und NADH-Bereich können auf den Anstieg der Zellzahl zurückgeführt werden. Beispiele für die Korrelation von Fluoreszenzintensität des Streulichtes bzw. im NADH-Bereich und der Zellzahl werden für Kultivierungen anderer Mikroorganismen von MAROSE [1999] und LINDEMANN [1998] dargestellt.

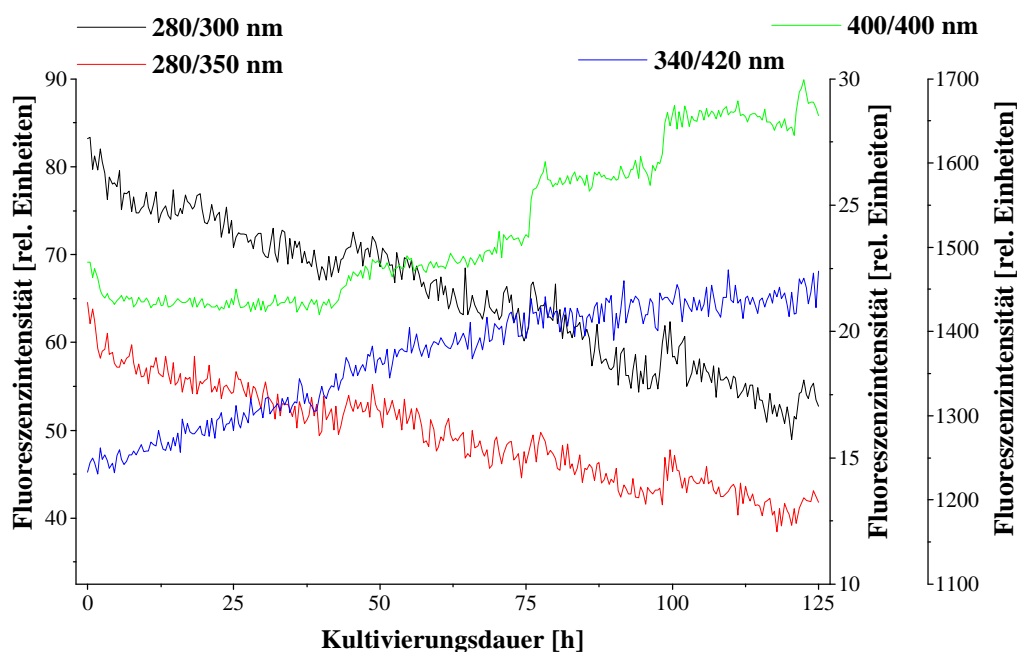


Abbildung 4-17

Darstellung der Fluoreszenzintensität verschiedener Wellenlängenkombinationen während der Kultivierung von CHO-Zellen

Beeinträchtigt wird der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten durch das Signalauschen, das auf den Messaufbau zurückzuführen ist. Bei diesen Messungen wird, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, der Lichtleiter an das ursprünglich für Küvettenmessungen konzipierte Spektrometer durch einen im Institut angefertigten Einsatz angekoppelt. Vergleiche bei anderen Kultivierungen, bei denen Messungen mit beiden Spektrometern (Hitachi F-4500 und BioView-Sensor) durchgeführt wurden, zeigen, dass das Signal-Rausch-Verhältnis beim

BioView-Sensor deutlich höher ist. Die chemometrische Auswertung kann dennoch durchgeführt werden, da das Signalrauschen geringer ist als die Varianz der Fluoreszenzintensitäten während der gesamten Kultivierung.

4.4.3 Modellbildung und Kalibrierung

Bei der chemometrischen Auswertung wird für die Prozessgrößen Zellzahl, Glukosegehalt und t-PA-Gehalt die Berechnung eines Kalibrationsmodells durchgeführt. Die berechneten Werte und zum Vergleich die offline analysierten Werte sind für alle drei Prozessgrößen in Abbildung 4-18 dargestellt. Die Fehler der Kalibrierungen (RMSEC) sind in Tabelle 4-3 angegeben.

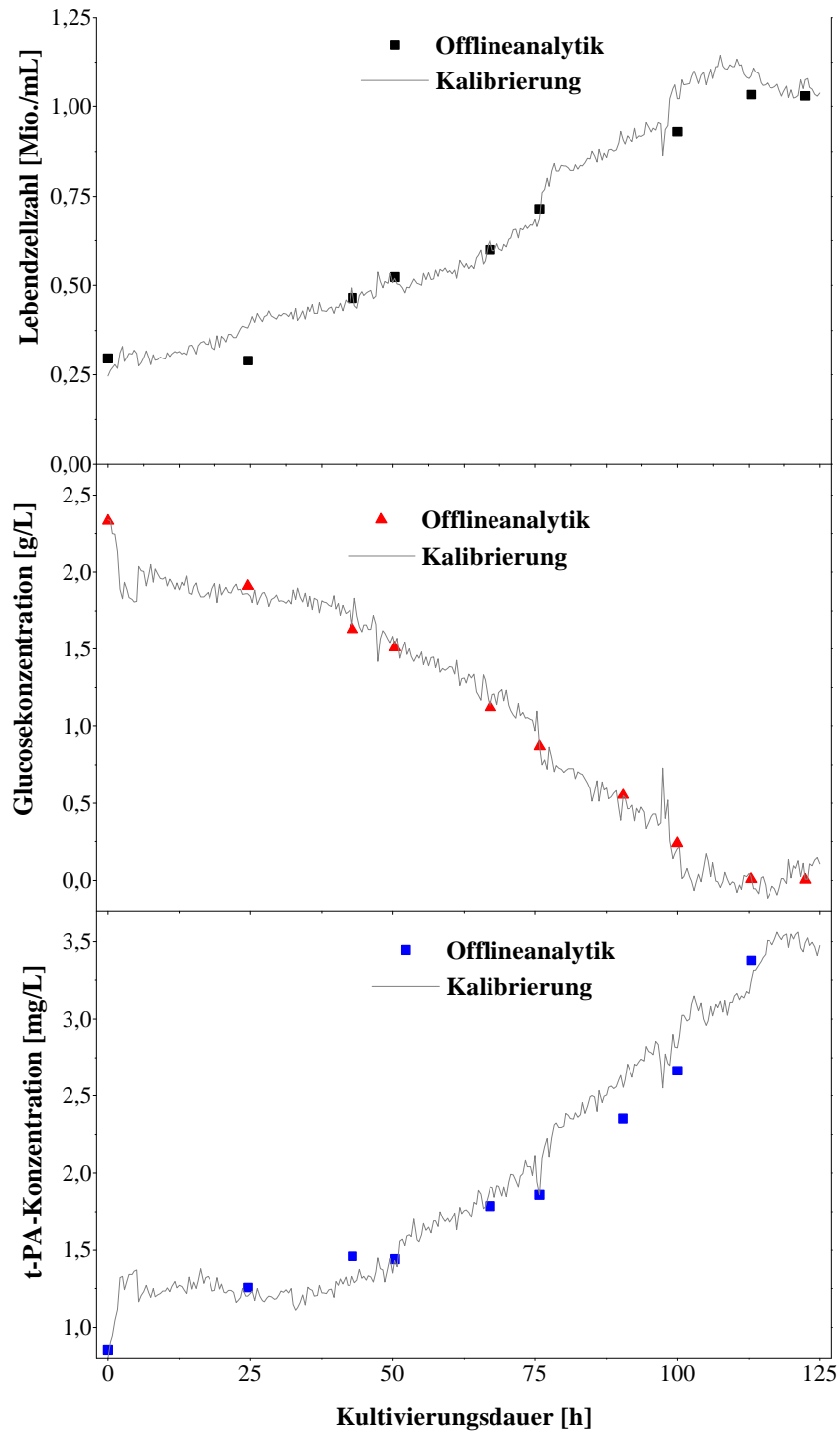
Für alle drei Prozessgrößen stimmen die Verläufe der kalibrierten Werte gut mit den offline bestimmten Werten überein, das Signalrauschen der Fluoreszenzdaten wird jedoch auch auf die Kalibrierungen übertragen. Die Fehler der Kalibrierungen sind für alle Prozessgrößen sehr gering.

Der kleinste Fehler der Kalibrierung liegt für die Prozessgröße Glukose vor. Hier wäre im Vergleich zur Zellzahl und zur t-PA-Konzentration ein höherer Fehler zu erwarten gewesen, da für diese beiden Prozessgrößen ein direkter Bezug von Konzentration zur Fluoreszenz besteht. Die Zellzahl kann mit der NADH-Fluoreszenz oder der Fluoreszenz des Streulichtes korreliert werden und die t-PA-Konzentration mit der Aminosäurefluoreszenz. Die Glukosekonzentration kann nur indirekt mit diesen Fluoreszenzintensitäten korreliert werden. Die Gründe für diese genauere Berechnung der Glukosekonzentration können zum einen die höhere Genauigkeit der Offline-Bestimmung der Glukosekonzentration und zum anderen ein unterschiedlicher Einfluss des Signalrauschens auf die Kalibrierungen sein.

Tabelle 4-3

Übersicht der RMSEC der verschiedenen Prozessgrößen der Kultivierung von CHO-Zellen

Prozessgröße	PLS 1-Modell	
	RMSEC (abs.)	RMSEC (rel.)
Zellzahl	0,05 Mio./mL	5,2 %
Glukosegehalt	0,022 g/mL	0,9 %
t-PA-Gehalt	0,11 mg/L	3,5 %

**Abbildung 4-18**

Darstellung der Kalibrierung von Zellzahl, Glukosegehalt und t-PA-Gehalt bei einer Kultivierung von CHO-Zellen

Für eine Anwendung dieser Methode zur Prozessbeobachtung können aufgrund der geringen Fehler der Kalibrierungen gute Ergebnisse bei der Vorhersage der hier untersuchten

Prozessgrößen erwartet werden. Die Durchführung der fluoreszenzspektroskopischen Messungen sollte dann mit dem BioView-Sensor erfolgen, um das Signal-Rausch-Verhältnis, das bei den Messungen mit dem Hitachi F-4500 sehr klein ist, zu verbessern.

4.5 Untersuchungen bei Kultivierungen von *Claviceps purpurea*

Der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* bildet als Sekundärmetabolite die sogenannten Ergotalkaloide, die als pharmazeutische Wirkstoffe verschiedene therapeutische Anwendungsgebiete finden. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm produziert hauptsächlich die Alkaloide Ergotamin und α -Ergokryptin.

Interessant ist bei dieser Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Prozessbeobachtung, dass die Produkte, die Ergotalkaloide, eine Eigenfluoreszenz bei $330 \text{ nm}_{\text{Ex}}/430 \text{ nm}_{\text{Em}}$ aufweisen. Ziel der Untersuchungen ist es deshalb, die Bildung der Ergotalkaloide sowie das Wachstum während der Kultivierung von *Claviceps purpurea* zu verfolgen.

4.5.1 Prozessverlauf

Während der Kultivierungen wird das Wachstum des Pilzes über die Bestimmung der Biotrockenmasse und des extrazellulären Proteingehaltes beobachtet. Zur Kontrolle der Produktion wird die Gesamtalkaloidkonzentration im Medium analysiert.

In Abbildung 4-19 sind als Beispiel die Verläufe der Prozessgrößen (Biomasse, Proteingehalt, Alkaloidkonzentration) während einer Kultivierung im Bioreaktor dargestellt.

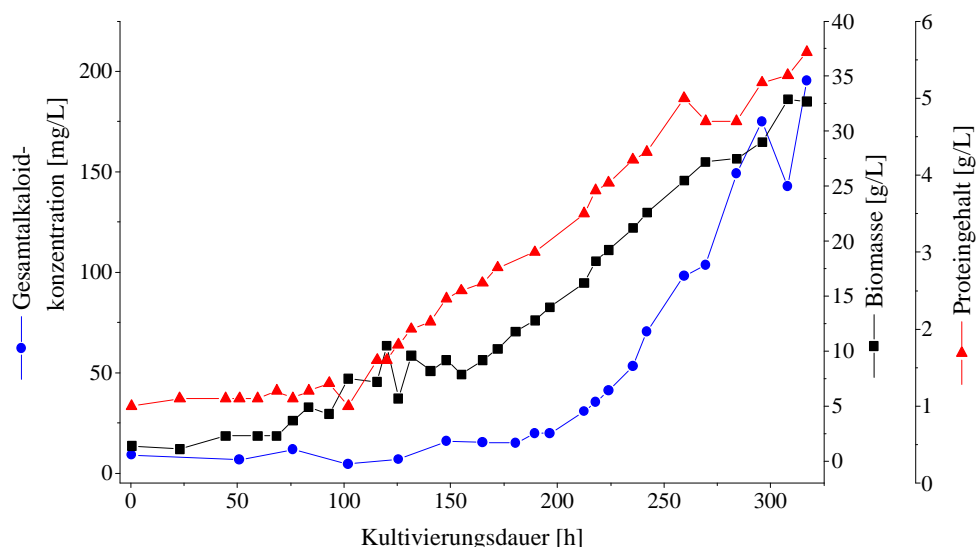


Abbildung 4-19

Darstellung der Verläufe der Prozessgrößen Biomasse, Proteingehalt und Gesamtalkaloidgehalt während der Kultivierung von *Claviceps purpurea*

Nach der ca. 100 Stunden dauernden Adaptionsphase beginnt das Wachstum des Pilzes, wie an dem deutlichen Anstieg der Biotrockenmasse und des Proteingehaltes zu erkennen ist. Das Wachstum des Pilzes hält bis zum Ende der Kultivierung in der 317. Stunde an. Die Ausscheidung der Alkaloide in das Medium beginnt erst ab der 196. Stunde, erfolgt dann kontinuierlich, so dass zum Ende der Kultivierung die Sekundärmetabolite eine Konzentration von 195 mg/L erreichen.

4.5.2 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Während der Kultivierung von *Claviceps purpurea* werden Fluoreszenzspektren im Abstand von 30 Minuten aufgenommen. Zwei Spektren sind in Abbildung 4-20 gezeigt. In dem Spektrum, das zu Beginn der Kultivierung (nach 0,5 Stunden) aufgenommen wurde, sind Peaks in den Bereichen um 390 nm_{Ex}/450 nm_{Em} und 430 nm_{Ex}/530 nm_{Em} zu finden, die verschiedenen biogenen Fluorophoren (NAD(P)H, Flavine, s. Kapitel 3.1) zugeordnet werden können. In dem zweiten Spektrum, das nach 284 Stunden (zum Ende der Kultivierung) aufgenommen wurde, sind Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten in diesen Bereichen zu erkennen. Ein weiterer Peak mit der höchsten Fluoreszenzintensität im Bereich um 330 nm_{Ex}/430 nm_{Em} wird durch Fluoreszenzeigenschaften der Ergotalkaloide hervorgerufen. Der noch zu Beginn zu erkennende NADH-Fluoreszenzpeak wird im Verlauf der Kultivierung von der Fluoreszenz der Ergotalkaloide überlagert.

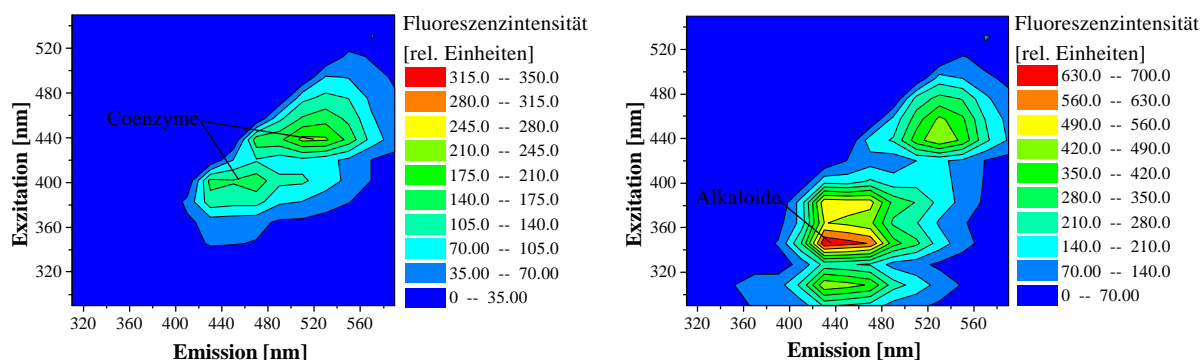


Abbildung 4-20

Fluoreszenzspektren (BioView-Sensor) zur 0,5. Stunde (links) und zur 284. Stunde (rechts) während der Kultivierung von *Claviceps purpurea*.

Interessant ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensitäten dieser Fluorophore während der Fermentation von *Claviceps purpurea* (Abbildung 4-21). Die Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination 330 nm_{Ex}/430 nm_{Em} (Ergotalkaloide) nimmt zunächst nur leicht

zu und steigt dann ab der 130. Stunde steiler an. Zur 240. Stunde wird ein Maximum erreicht und bis zum Ende der Kultivierung fällt die Fluoreszenzintensität wieder ab. Die Konzentration der Ergotalkaloide nimmt hingegen bis zum Ende der Kultivierung zu (s. Abbildung 4-19). Dieses Phänomen der Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Fluorophorkonzentration wird durch Energietransfer-Effekte hervorgerufen. Dabei wird das bei 430 nm emittierte Licht von den Ergotalkaloiden oder anderen Molekülen adsorbiert. Einen Nachweis dafür liefern die in Kapitel 4.5.3 beschriebenen Versuche mit verdünnten Kultivierungsüberständen. Es kann gezeigt werden, dass bei Verdünnung die Fluoreszenzintensität bei $330\text{ nm}_{\text{Ex}}/430\text{ nm}_{\text{Em}}$ zunimmt. Erst bei stark verdünnten Kultivierungsüberständen kann wieder eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Wahrscheinlich ist auch die Adsorption des Emissionslichtes der Ergotalkaloide durch andere Moleküle, aus der die kontinuierliche Zunahme der Emission bei 530 nm resultiert.

Ein Unterschied besteht auch in den Zeitpunkten der Zunahme der Fluoreszenzintensität und des Anstieges der Ergotalkaloidkonzentration im Medium. Die Fluoreszenzintensität im Bereich der Ergotalkaloide steigt bereits ab der 130. Stunde, die offline ermittelte Konzentration der Ergotalkaloide jedoch erst ab der 196. Stunde. Der Grund ist die sensitive Detektion der Ergotalkaloide durch die Fluoreszenzspektroskopie, die bereits eine Bestimmung von sehr geringen Konzentrationen ermöglicht, die bei dem verwendeten Offline-Analyseverfahren (modifizierter van Urk-Test) unterhalb der Nachweisgrenze liegen [MENGE, 2000].

Weitere Wellenlängenkombinationen, wie beispielsweise aus dem Fluoreszenzbereich der Proteine bzw. Aminosäuren ($270\text{ nm}_{\text{Ex}}/390\text{ nm}_{\text{Em}}$ und $290\text{ nm}_{\text{Ex}}/350\text{ nm}_{\text{Em}}$), zeigen zu Beginn der Kultivierung nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität. Etwa ab der 100. Stunde wird der Anstieg stärker, was mit der Zunahme des offline analysierten Proteingehaltes einhergeht. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination $290\text{ nm}_{\text{Ex}}/350\text{ nm}_{\text{Em}}$ zeigt zum Ende der Kultivierung eine Abnahme, die auf eine Beeinflussung durch die Fluoreszenz der Ergotalkaloide zurückzuführen ist (s. Kapitel 4.5.3).

Die Fluoreszenzverläufe der Wellenlängenkombinationen im Bereich der Aminosäuren oder auch die Kombinationen mit den Neutraldichtefiltern spiegeln zwar tendenziell das Wachstum des Pilzes, eine direkte Korrelation der Verläufe ist jedoch sehr ungenau und kann nicht für die Bioprozessbeobachtung eingesetzt werden.

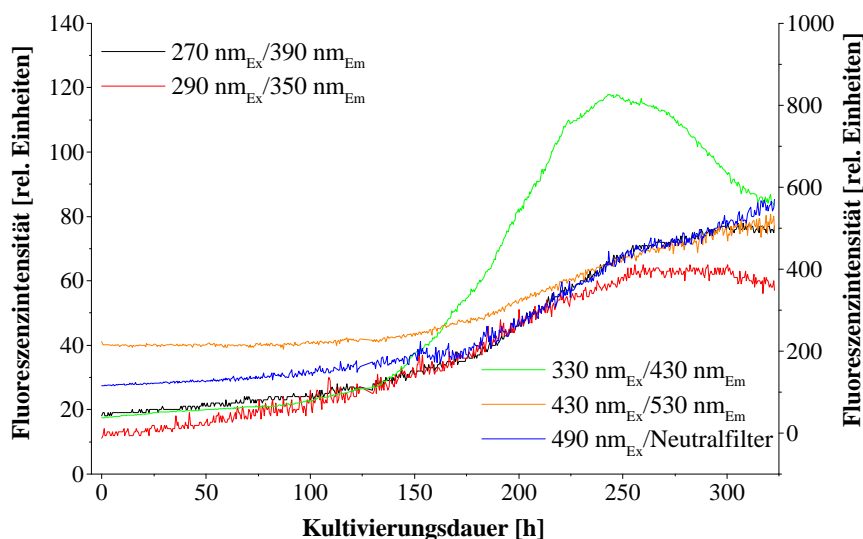
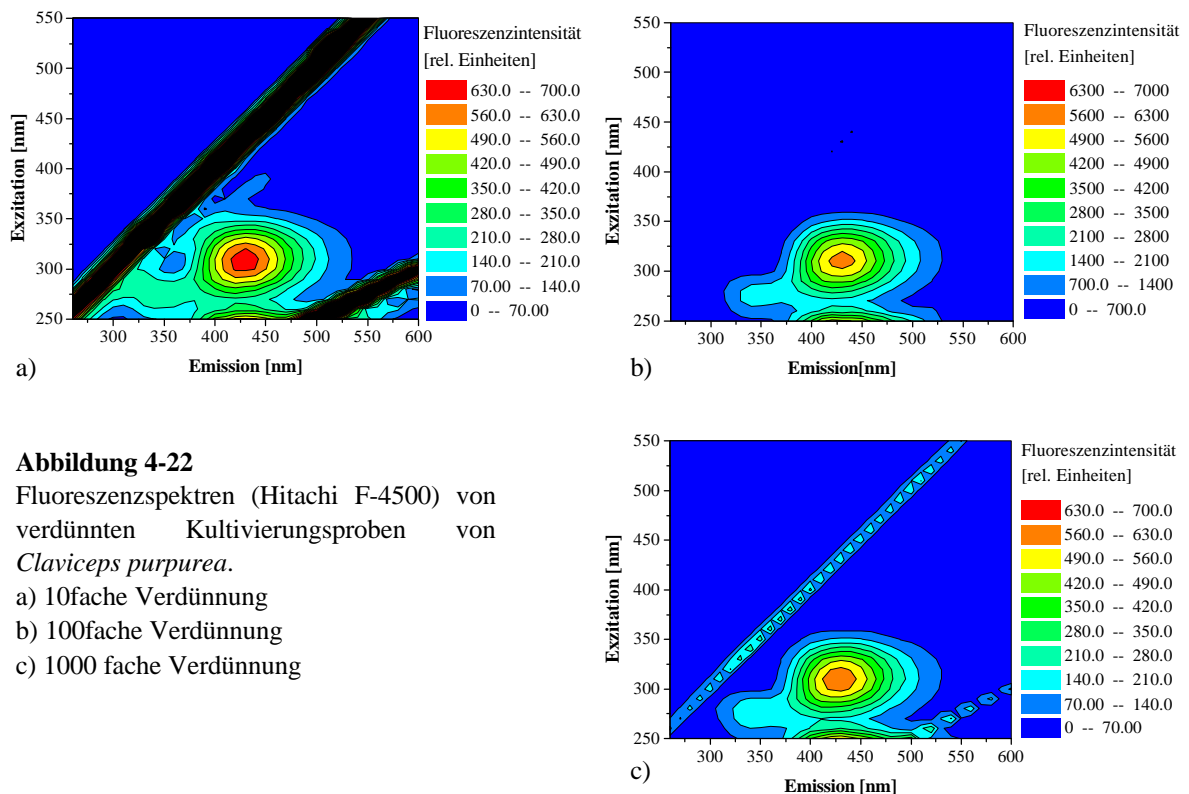


Abbildung 4-21

Darstellung der Verläufe der Fluoreszenzintensitäten einiger ausgewählter Wellenlängenkombinationen während der Kultivierung von *Claviceps purpurea*.

4.5.3 Fluoreszenzmessungen bei verdünnten Kultivierungsproben

Einen Hinweis auf die Stärke der Energietransfereffekte der Fluorophore geben fluoreszenzspektroskopische Messungen von verdünnten Medienüberständen. Abbildung 4-22 zeigt Spektren einer Kultivierungsprobe in verschiedenen Verdünnungsstufen. Diese Probe wurde am Ende einer Kultivierung genommen und enthält eine hohe Konzentration an Ergotalkaloiden. Der Ergotalkaloidpeak im ersten Spektrum (10-fache Verdünnung) hat eine relative Fluoreszenzintensität von 675. Im zweiten Spektrum (100-fache Verdünnung) hat dieser Peak eine Intensität von 6000. Bei weiterer Verdünnung (1000-fach) beträgt die Fluoreszenzintensität nur noch 625. Das bedeutet, dass mindestens bis zu einer 100-fachen Verdünnung der Kultivierungsproben Energietransfereffekte auftreten und dadurch bei abnehmender Fluorophorkonzentration (Verdünnung) die Fluoreszenzintensität zunimmt. Erst bei der 1000-fachen Verdünnung ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der Verdünnung festzustellen. Der gleiche Effekt kann für den Wellenlängenbereich um $280 \text{ nm}_{\text{Ex}}/350 \text{ nm}_{\text{Em}}$ (Tryptophan) beobachtet werden. Ebenfalls bei einer 100-fachen Verdünnung ist die Fluoreszenzintensität in diesem Bereich am größten und nimmt bei weiterer Verdünnung ab.

**Abbildung 4-22**

Fluoreszenzspektren (Hitachi F-4500) von verdünnten Kultivierungsproben von *Claviceps purpurea*.

- a) 10fache Verdünnung
- b) 100fache Verdünnung
- c) 1000 fache Verdünnung

Werden alle Kultivierungsproben 1000-fach verdünnt und fluoreszenzspektroskopisch analysiert, ist eine Korrelation der Fluoreszenzwerte mit den Verläufen der Prozessparameter Proteingehalt und Ergotalkaloidkonzentration möglich, wie Abbildung 4-23 zeigt. Die Kurve der Wellenlängenkombination 280 nm_{Ex}/350 nm_{Em} im Fluoreszenzbereich der Aminosäure Tryptophan kann mit dem Verlauf des analysierten Proteingehaltes korreliert werden. Das gleiche gilt für die Verläufe der Wellenlängenkombination 330 nm_{Ex}/440 nm_{Em} und der Ergotalkaloidkonzentration.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Fluoreszenzspektren Informationen über den Bioprozess und insbesondere die Produktion der Ergotalkaloide enthalten, die aber aufgrund der Einflüsse von Energietransfereffekten nicht direkt für eine Bioprozessbeobachtung verwendet werden können. Deshalb sind zur Aufdeckung der inneren Struktur der Spektren und der komplexen Zusammenhänge chemometrische Verfahren erforderlich, die es ermöglichen, die Informationen der Fluoreszenzspektren für die Analytik der Bioprozessgrößen zu nutzen.

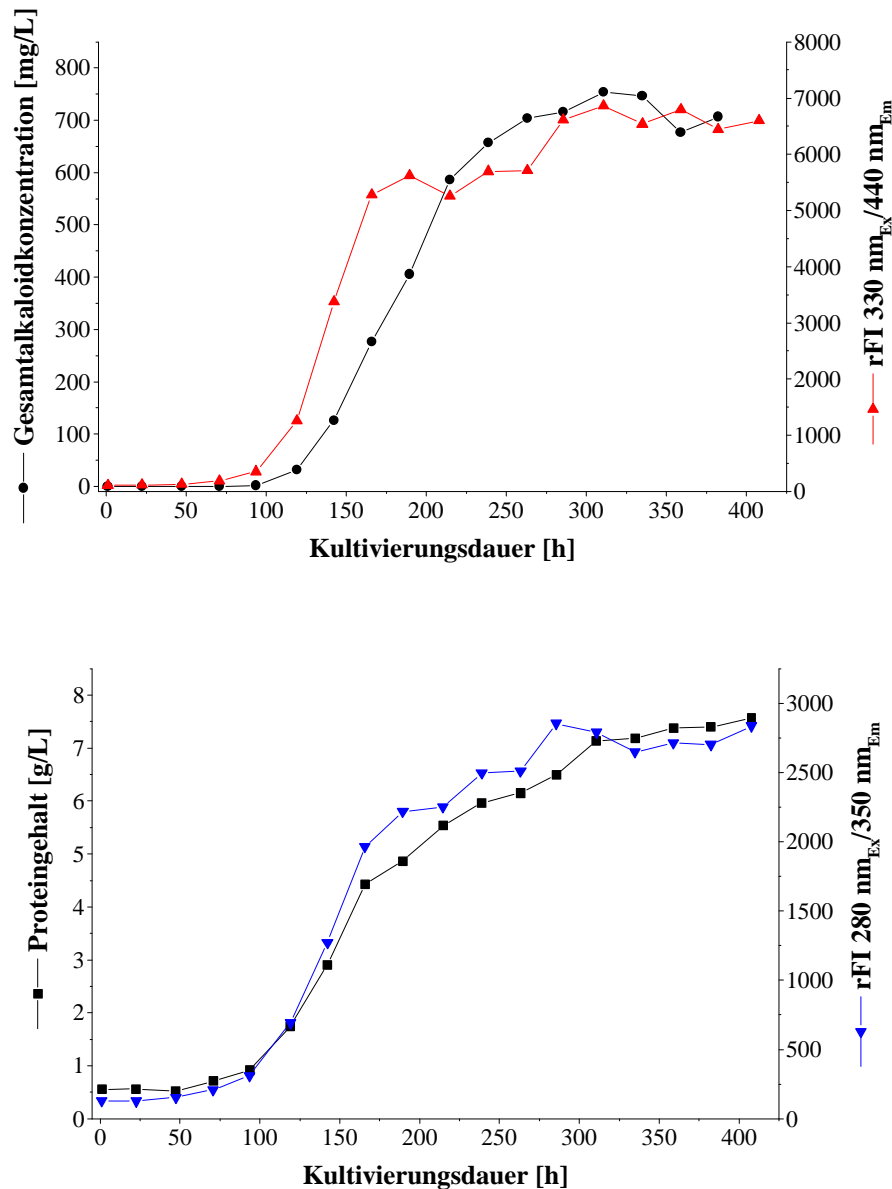


Abbildung 4-23

Darstellung der Fluoreszenzintensität ausgewählter Wellenlängenkombinationen (Hitachi F-4500) von verdünnten Kultivierungsproben im Vergleich zu den Verläufen der Prozessgrößen Gesamtalkaloidkonzentration und Proteingehalt während der Kultivierung von *Claviceps purpurea* (rFI: relative Fluoreszenzintensität [rel. Einheiten])

4.5.4 Modellbildung und Validierung

Für die Prozessgrößen Biotrockenmasse, Proteingehalt und Gesamtalkaloidkonzentration wird jeweils ein PLS1-Modell erstellt, dabei werden für das Modell der Biotrockenmasse und des Proteingehaltes zwei Hauptkomponenten verwendet. Für das Modell der Gesamtalkaloidkonzentration werden drei Hauptkomponenten angewendet [BOEHL, 2003].

Eine erste Bewertung der Modelle erfolgt mittels Sensitivitätsspektren. Die Sensitivitätsspektren in Abbildung 4-24 zeigen die Auftragung des Betrages der auf eins normierten Regressionskoeffizienten der einzelnen Wellenlängenkombinationen. Anhand der Spektren kann die Relevanz der Wellenlängenkombinationen für die Vorhersagen beurteilt werden.

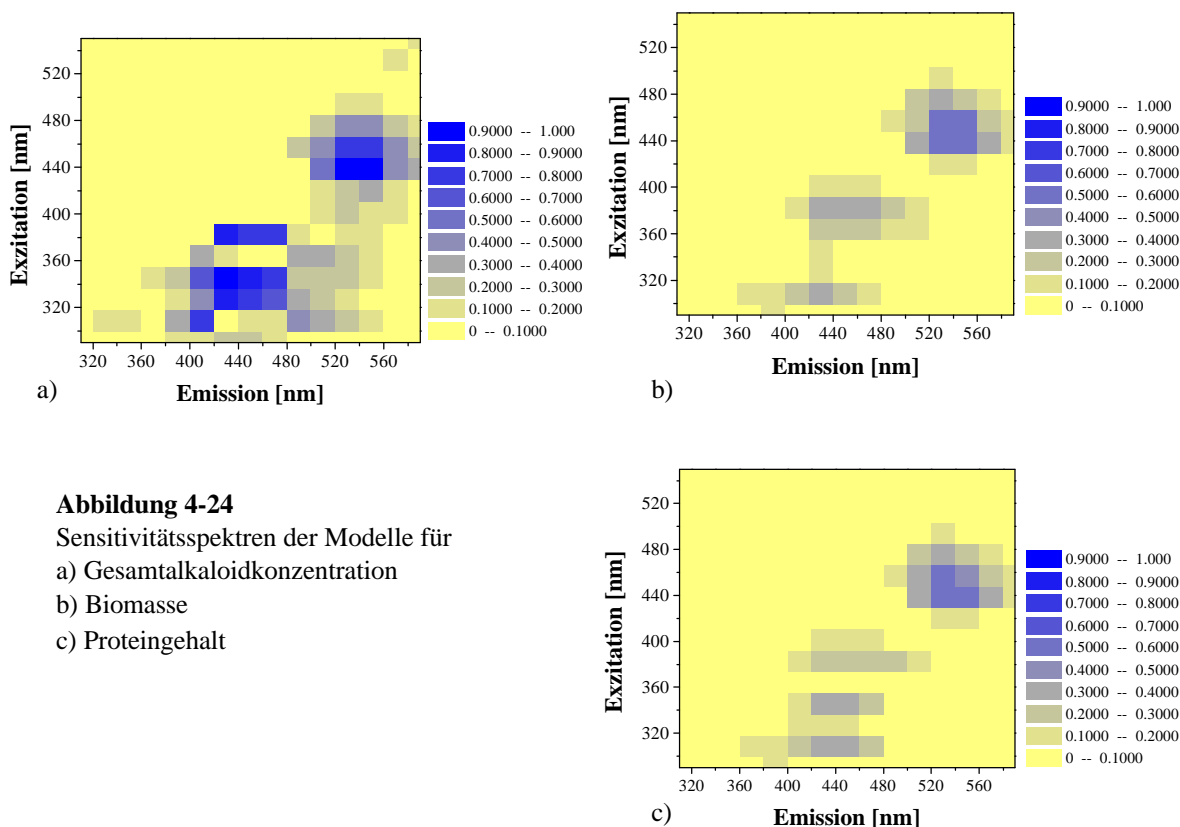


Abbildung 4-24

Sensitivitätsspektren der Modelle für

a) Gesamtalkaloidkonzentration

b) Biomasse

c) Proteingehalt

Der Vergleich der Sensitivitätsspektren der Modelle für Biotrockenmasse und Proteingehalt zeigt, dass die Relevanz der Wellenlängenkombinationen für die Berechnung dieser beiden Prozessvariablen ähnlich ist. In beiden Spektren liegen die höchsten Beträge der Regressionskoeffizienten im Bereich der Flavine ($430 \text{ nm}_{\text{Ex}}/530 \text{ nm}_{\text{Em}}$) und im Bereich der Neutralfilter. (Die Wellenlängenkombinationen mit den Neutraldichtefiltern können bei dieser Auftragung nicht dargestellt werden und die entsprechenden Ergebnisse werden deshalb beschrieben). Diese Übereinstimmung der Sensitivitätsspektrum ist mit dem vergleichbaren Verlauf der beiden Prozessvariablen, die beide das Wachstum des Pilzes während der Kultivierungen beschreiben, zu erklären. Die Gewichtung des Bereichs der Flavine und der Neutraldichtefilter ist folgerichtig, da in beiden Bereichen eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen ist und der Einfluss der Ergotalkaloidfluoreszenz verhältnismäßig gering ist (s. Abbildung 4-21).

Das Sensitivitätsspektrum für die Alkaloide zeigt eine hohe Sensitivität im Bereich um $310 \text{ nm}_{\text{Ex}}/430 \text{ nm}_{\text{Em}}$ bzw. $370 \text{ nm}_{\text{Ex}}/430 \text{ nm}_{\text{Em}}$, also im Bereich der Fluoreszenz der Ergotalkaloide. Die ausschliessliche Korrelation mit der Fluoreszenz der Ergotalkaloide ist aufgrund der Energietransfereffekte für die Beschreibung der Alkaloidkonzentration nicht ausreichend, wie in Kapitel 4.5.3 gezeigt ist. Zur Korrektur werden deshalb weitere Informationen aus anderen Bereichen der Spektren genutzt, dabei gehen vor allem Daten aus dem Bereich der Flavine ($430 \text{ nm}_{\text{Ex}}/530 \text{ nm}_{\text{Em}}$) mit in die Berechnungen ein.

Die Relevanz der verschiedenen Wellenlängenkombinationen ist für alle Modelle nachvollziehbar und die Modelle sollten für die Vorhersagen der Prozessvariablen geeignet sein. Deshalb werden im nächsten Schritt die Modelle durch Übertragung auf eine zweite Kultivierung von *Claviceps purpurea* validiert. Dazu werden die Fluoreszenzdaten, die während dieser Kultivierung aufgenommen wurden, verwendet und die daraus resultierenden Vorhersagen der Modelle mit den offline gemessenen Konzentrationen der Prozessgrößen verglichen. In Abbildung 4-25 sind die vorhergesagten Verläufe der drei Prozessgrößen sowie zum Vergleich die offline ermittelten Daten der zweiten Kultivierung dargestellt.

Die vorhergesagten Werte für die Alkaloidkonzentration zeigen sehr gut den Verlauf dieser Prozessgröße während der Kultivierung von *Claviceps purpurea*. Der Fehler der vorhergesagten Werte ist im Vergleich zu den offline ermittelten Daten mit 3,30 % (Tabelle 4-4) sehr gering. Das entwickelte Modell ist somit geeignet, um für eine Online-Bestimmung des Alkaloidgehaltes durch fluoreszenzspektroskopische Messungen eingesetzt zu werden.

Es ist zu erkennen, dass die Vorhersagen für Biotrockenmasse und Proteingehalt zwar den tendenziellen Verlauf dieser Variablen während der Kultivierung wiedergeben, aber beide Kurven unterhalb der offline ermittelten Werte liegen. Der Grund für diese Abweichung findet sich bei der Betrachtung des Differenzspektrums, das aus den jeweiligen Startspektren der beiden Kultivierungen berechnet ist (Abbildung 4-26).

Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen den Anfangsspektren der beiden Kultivierungen, insbesondere in den Bereichen, die eine hohe Sensitivität der Modelle aufweisen, wie im Bereich der Flavine ($430 \text{ nm}_{\text{Ex}}/530 \text{ nm}_{\text{Em}}$) und der Neutraldichtefilter. Diese Unterschiede können zum einen auf geringe Unterschiede in den Animpfdichten zurückgeführt werden. Zum anderen könnte das Alter der Vorkultur einen Einfluss haben sowie unterschiedliche Färbungen der Kulturmedien. Da die Kulturmedien eine sehr hohe Konzentration an Saccharose enthalten und bei der Sterilisation bei $110 \text{ }^\circ\text{C}$

Maillardreaktionen nicht vermieden werden können, erfolgt eine Verfärbung des Mediums beim Autoklavieren.

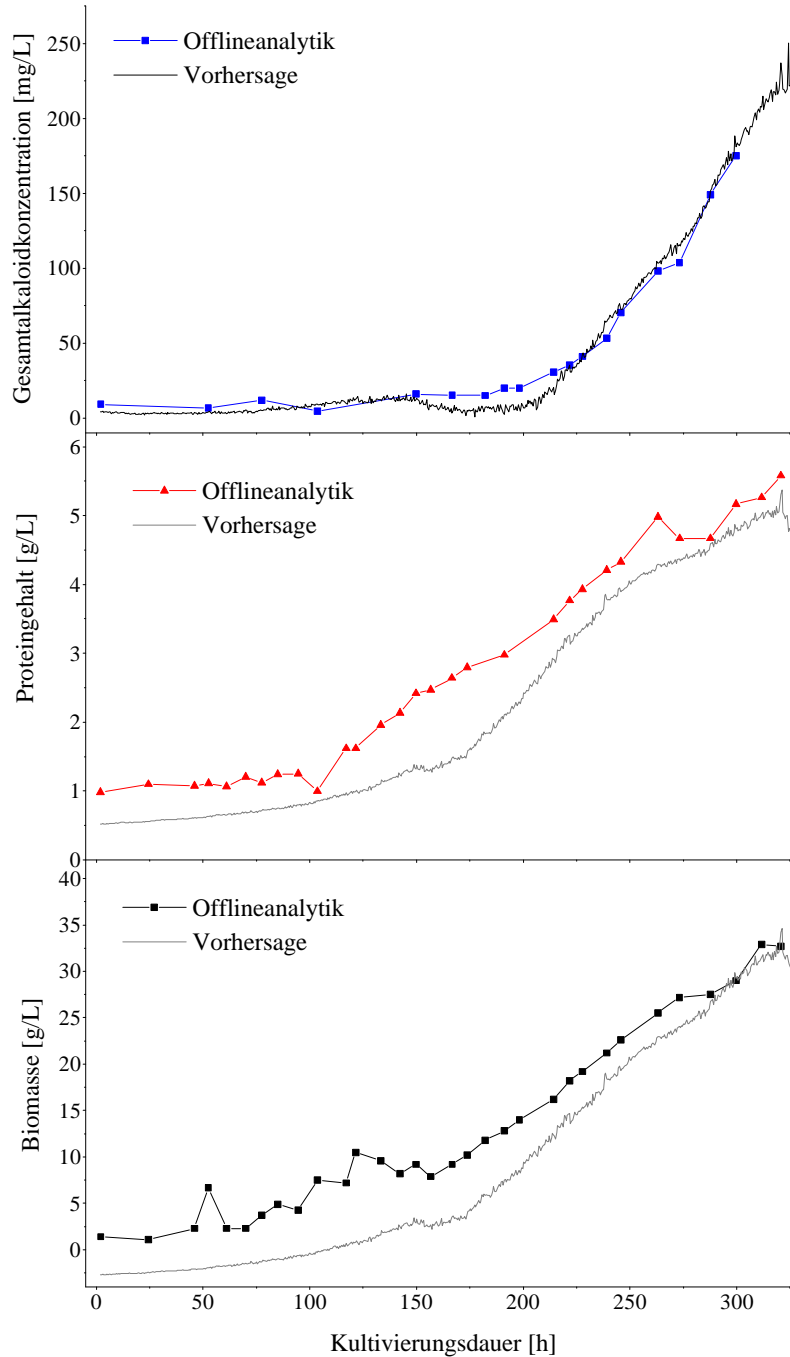


Abbildung 4-25

Darstellung der Vorhersage für die Prozessgrößen Gesamtalkaloidkonzentration, Proteingehalt und Biomasse während der Kultivierung von *Claviceps purpurea*

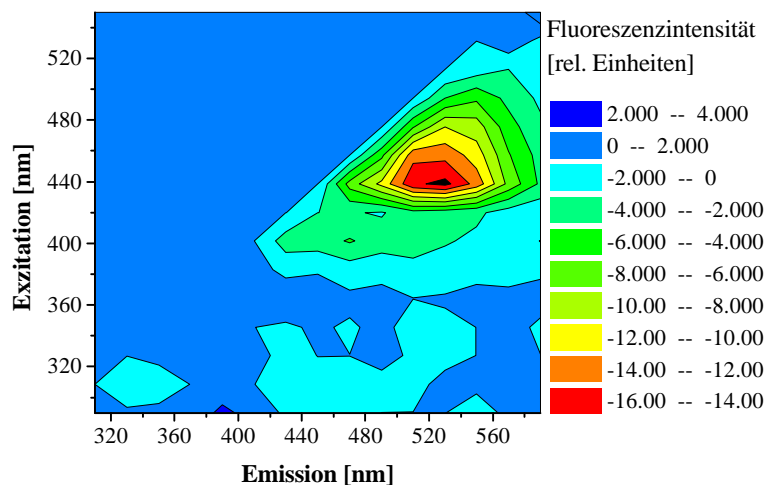


Abbildung 4-26

Differenzspektrum aus den Anfangsspektren von zwei verschiedenen Kultivierungen von *Claviceps purpurea*

Um diesen Einfluss für die Vorhersagen zu eliminieren, besteht die Möglichkeit, die Modelle und Vorhersagen auf Basis von Differenzspektren zu erstellen. Dabei wird die Differenz aus einem Mittelwertspektrum, das aus 5 aufeinander folgenden Anfangsspektren berechnet wird, und jedem einzelnen Spektrum, das im Verlauf der Kultivierungen aufgenommen wird, gebildet. In die Berechnung der Modelle bzw. in die Vorhersage fließen dann nur die absoluten Änderungen während der Kultivierung ein. Dabei ändern sich nicht die Sensitivitäten der Modelle und somit auch nicht die Qualität der Vorhersagen, sondern lediglich der Ordinatenabschnitt der vorhergesagten Werte.

Die Vorhersagen auf Basis der Differenzspektren sind in Abbildung 4-27 dargestellt. Die Fehler der Vorhersagen (RMSEP) mit und ohne Differenzspektren sind zum Vergleich in Tabelle 4-4 aufgeführt.

Die Vorhersage der Alkaloidkonzentration mit den Differenzspektren zeigt nur einen sehr geringen Unterschied, der RMSEP ist um 0,1 % höher als bei der Vorhersage auf Basis der nicht vorverarbeiteten Fluoreszenzspektren. In diesem Fall ist die Verwendung der Fluoreszenzdaten ohne Datenvorverarbeitung für die Bestimmung der Alkaloidkonzentration ebenfalls möglich.

Für die anderen beiden Prozessvariablen, die das Wachstum des Pilzes wiedergeben, liefert die Methode mit den Differenzspektren die besten Ergebnisse. Die berechneten Verläufe der Biotrockenmasse und des Proteingehaltes geben gut das Wachstum des Pilzes während der Kultivierung wieder. Die Abweichungen der Vorhersagewerte von den offline ermittelten

Daten sind allerdings mit 7,2 % (Biotrockenmasse) und 5,7 % (Proteingehalt) höher als bei den Alkaloiden.

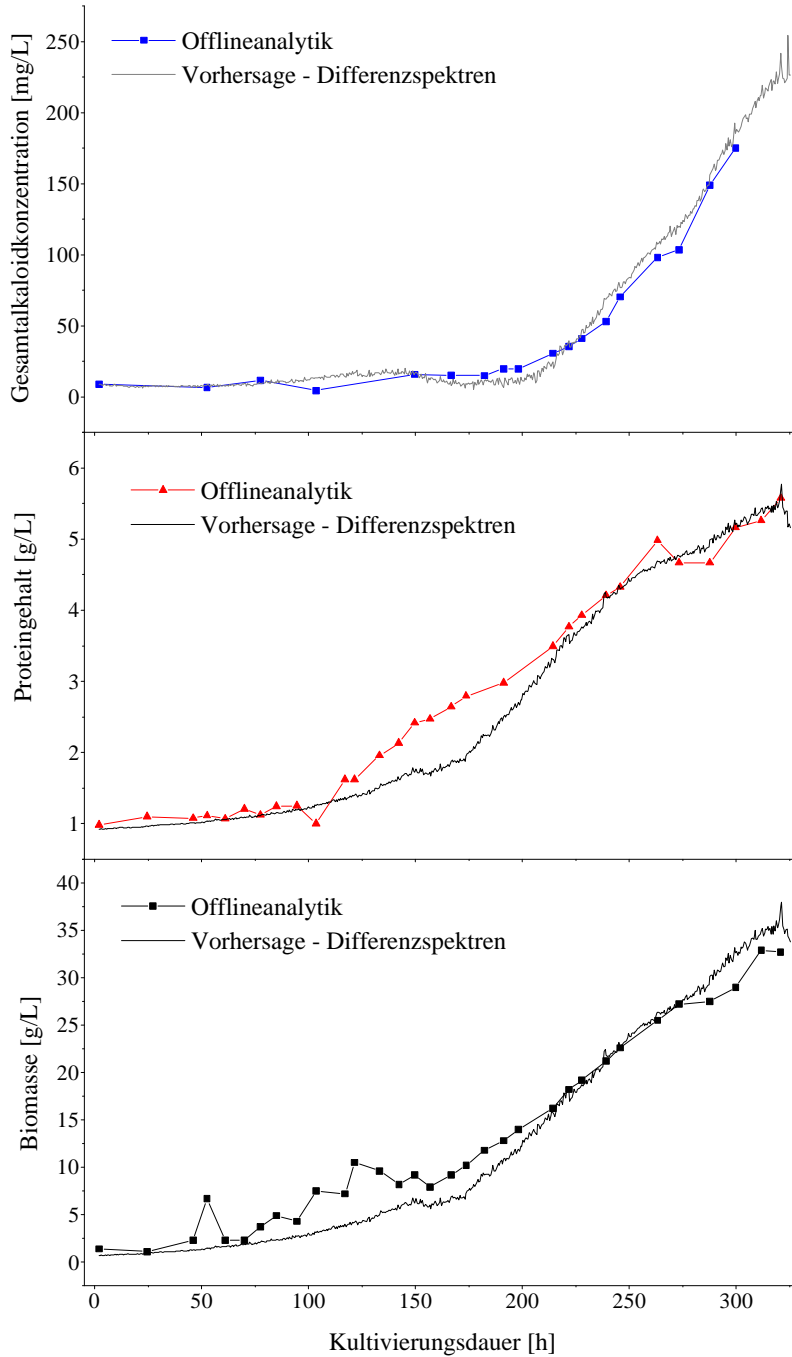


Abbildung 4-27

Darstellung der Vorhersage auf Basis von Differenzspektren für die Prozessgrößen Gesamtalkaloidkonzentration, Proteingehalt und Biomasse während der Kultivierung von *Claviceps purpurea*

Tabelle 4-4

Fehler der einzelnen Vorhersagen der Prozessvariablen der Kultivierung von *Claviceps purpurea* (angegeben sind die absoluten (abs.) und relativen (rel.) RMSEP)

Prozessgröße	PLS 1-Modell	PLS 1-Modell
	RMSEP abs. (rel.)	Differenzspektren RMSEP abs. (rel.)
Ergotalkaloide	8,2 mg/L (3,3 %)	8,4 mg/L (3,4 %)
Biotrockenmasse	4,9 g/L (14,2 %)	2,5 g/L (7,2 %)
Proteingehalt	0,6 g/L (10,8 %)	0,3 g/L (5,7 %)

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Online-Prozessbeobachtung durch chemometrische Auswertung von fluoreszenzspektroskopischen Messungen während Kultivierungen von *Claviceps purpurea* möglich ist. Die Bildung der Alkaloide kann sehr gut verfolgt werden, da die Ergotalkaloide selbst fluoreszieren und deshalb eine Vorhersage mit geringen Fehlern möglich ist. Unter Einsatz der erstellten PLS1-Modelle kann die Vorhersage direkt aus den Fluoreszenzmesswerten erfolgen. Zur Darstellung des Pilzwachstums ist eine Berücksichtigung der unterschiedlichen Anfangsbedingungen in den Fluoreszenzspektren erforderlich. Insgesamt sind die berechneten Vorhersagen geeignet, um die zeitaufwendige Offline-Analytik der Prozessvariablen durch Online-Fluoreszenzmessungen zu ersetzen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit zur Online-Prozessbeobachtung mit dem Vorteil, nicht-invasive Messungen in situ durchzuführen und innerhalb einer relativ kurzen Messzeit vielfache Informationen über den aktuellen Stand des Prozesses zu erhalten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die 2D-Fluoreszenzspektroskopie als Methode zur Prozessbeobachtung an mehreren Beispielen von Bioprozessen anzuwenden, wobei jeweils wichtige Prozessgrößen unter Verwendung von chemometrischen Methoden aus den Fluoreszenzdaten berechnet werden sollten.

Zu Beginn dieser Untersuchungen stand die Durchführung von Online-Fluoreszenzmessungen während der Kultivierungen und die Durchführung der Offline-Analytik der ausgewählten Prozessgrößen, um die für die chemometrische Datenanalyse erforderlichen Datensätze zu generieren.

Bei Kultivierungen des Pilzes *Claviceps purpurea* im Labormaßstab wurden während der Bioprozesse Proben zur Bestimmung der Biomasse, des Proteingehaltes und der Alkaloidkonzentration gesammelt. Entsprechend wurden bei der Kultivierung von CHO-Zellen die Zellzahl, die Glukosekonzentration und die t-PA-Konzentration analysiert. Bei Bierbrauprozessen (Gärungen) im Technikumsmaßstab und bei Hefereinzuchtprozessen in der Brauerei wurden die Zellzahl, der Extraktgehalt und der pH-Wert bestimmt. Bei den Gärungen wurde zusätzlich die Konzentration der vicinalen Diketone analysiert.

Für jeden Prozess wurden die erhaltenen Datensätze durch grafische Auftragungen ausgewertet. So konnten Ausreißer bei der Offline-Analytik bei den folgenden Berechnungen ausgeschlossen werden.

Die Fluoreszenzdaten wurden ebenfalls mit Hilfe von grafischen Darstellungen ausgewertet. Beim Vergleich von Fluoreszenzspektren konnten Änderungen der Fluoreszenzintensitäten von bestimmten Wellenlängenkombinationen während der Kultivierungen beobachtet und diesen Wellenlängenkombinationen verschiedene biogene Fluorophore zugeordnet werden. Bei allen Bioprozessen konnten Veränderung der Fluoreszenzintensitäten bei den Fluorophoren NADH, FMN und der Aminosäure Tryptophan festgestellt werden. Bei den Kultivierungen von *Claviceps purpurea* kommen die fluoreszierenden Ergotalkaloide hinzu.

Bei den Auftragungen der zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensitäten dieser Fluorophore wurde eine erste Bewertung der Qualität der Fluoreszenzdaten vorgenommen. So konnten mit Hilfe dieser Darstellungen starkes Signalrauschen oder Beeinflussungen der Fluoreszenzintensitäten durch schwankende Prozessparameter festgestellt werden.

Starkes Signalrauschen trat bei den Online-Fluoreszenzmessungen mit dem Spektrometer Hitachi F-4500 auf, das auf den Messaufbau zurückzuführen ist. Besser geeignet für Online-Fluoreszenzmessungen ist der BioView-Sensor, der für solche Anwendungen konzipiert wurde und bei dem ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis bei Online-Messungen erreicht wird.

Das Spektrometer Hitachi F-4500 wurde für die Fluoreszenzmessungen bei den Kultivierungen der CHO-Zellen eingesetzt. Obwohl das ungünstige Signal-Rausch-Verhältnis die weitere chemometrische Datenanalyse beeinflusste, konnten die Fluoreszenzdaten genutzt werden, um eine erste Evaluierung der Daten bei diesen Kultivierungen vorzunehmen.

Bei den Bierbrauprozessen wurde ein Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Fluoreszenzdaten beobachtet. So bewirkte bereits eine geringe Temperaturschwankung bei den Gärungen, die bei einer Kultivierungstemperatur von 10 °C durchgeführt wurden, eine Änderung der Fluoreszenzintensität, die deutlich größer ist als das reguläre Rauschen bei den Messungen. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass nur bei Temperaturen unter 12 °C der Einfluss der Temperatur entsprechend stark ist. Bei Temperaturen über 20 °C sind Einflüsse von geringen Temperaturschwankungen auf die Fluoreszenzintensitäten nicht mehr feststellbar.

Da sich die Temperaturschwankungen bei den Gärungen auf die Fluoreszenzdaten auswirken und zu Abweichungen bei den späteren Vorhersagen führen, sind Temperaturänderungen bei der Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie bei den Bierbrauprozessen in der Auswertung zu berücksichtigen.

Die Notwendigkeit des Einsatzes von chemometrischen Methoden zur Auswertung der Fluoreszenzdaten wurde am Beispiel der Kultivierungen von *Claviceps purpurea* gezeigt. Die von dem Pilz *Claviceps purpurea* produzierten Ergotalkaloide fluoreszieren bei 330 nm_{Ex}/430 nm_{Em}. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität dieser Wellenlängenkombination während der Kultivierungen entspricht jedoch nicht dem Verlauf der offline analysierten Ergotalkaloidkonzentration, weil bei hohen Konzentrationen von Ergotalkaloiden

Energietransfereffekte die Fluoreszenzintensität beeinflussen. Bei Verdünnung von Kultivierungsproben konnte eine Korrelation der Fluoreszenzintensität mit der Konzentration an Ergotalakloiden erzielt werden, da die Energietransfereffekte in den verdünnten Kulturüberständen nicht auftreten.

Die Konzentration von Fluorophoren ist auch bei anderen Bioprocessen im Allgemeinen so hoch, dass Energietransfereffekte die Fluoreszenzmessungen beeinflussen. Deshalb ist die chemometrische Datenanalyse erforderlich, um die in den Fluoreszenzspektren enthaltenen Informationen für die Bioprocessbeobachtung zu nutzen.

Bei Bioprocessen, bei denen die Anfangsbedingungen wie Medienzusammensetzung oder Animpfdichte bei jedem Prozess unterschiedlich sind, ist die Berechnung von Differenzspektren im Rahmen der Datenvorverarbeitung sinnvoll. Auf diese Weise wird eine bessere Vergleichbarkeit der Prozesse erzielt, da nur die absoluten Änderungen der Fluoreszenzintensitäten während der Bioprocessen in die Auswertung eingehen.

Bei den Bierbrauprocessen variierte die Zusammensetzung der Würze, die für die verschiedenen Prozesse verwendet wurde. Beim Vergleich der Fluoreszenzspektren der reinen Würze konnte der Einfluss der unterschiedlichen Zusammensetzung auf die Fluoreszenzintensität gezeigt werden. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse wurde die Auswirkung der unterschiedlichen Würzezusammensetzung und verschiedener Animpfdichten auf die chemometrische Datenanalyse untersucht. Es wurde gezeigt, dass bei Verwendung der Differenzspektren die Unterschiede zwischen den Processes, die durch die verschiedenen Anfangsbedingungen hervorgerufen werden, aufgehoben werden.

Die bei den Bioprocessen erhaltenen Datensätze (Fluoreszenzdaten und Offline-Werte der Prozessgrößen) wurden für die chemometrische Datenanalyse verwendet. Für jede Prozessgröße wurde ein PLS1-Modell erstellt und bewertet, dabei wurden bei allen Berechnungen die Differenzspektren der Fluoreszenzdaten verwendet.

Bei den Bierbrauprocessen wurden die erstellten PLS1-Modelle für die Prozessgrößen Extraktgehalt, Zellzahl, pH-Wert und Konzentration von vicinalen Diketonen durch Vorhersage bei einem weiteren Prozess angewendet. Dabei konnten die Verläufe während des Processes für den Extraktgehalt, die Zellzahl und den pH-Wert sehr gut berechnet werden. Die Fehler (Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung) der Vorhersagen

lagen zwischen 1,1 % und 6,9 % und die Vorhersagen konnten als zufriedenstellend bewertet werden.

Für die Konzentration der vicinalen Diketone wurde ebenfalls ein PLS1-Modell erstellt und eine Vorhersage berechnet. Es zeigte sich, dass die Bestimmung dieser Prozessgröße nicht durch die angewendete Methode der Online-Fluoreszenzspektroskopie möglich ist. Der extrazelluläre enzymatische Abbau der Diketone erfolgte hauptsächlich nach dem Absinken der Hefezellen im letzten Abschnitt der Gärungen und in diesem Zeitraum waren nur sehr geringe Änderungen der Fluoreszenzintensitäten zu messen. Die Varianz der Fluoreszenzdaten war deshalb zu gering, um die Konzentration der vicinalen Diketone zu berechnen.

Die bei Hefereinzuchtverfahren in der Brauerei aufgenommenen Fluoreszenzdaten konnten nicht für die chemometrische Datenanalyse verwendet werden, weil das in Intervallen durchgeführte Belüften und Umpumpen des Tankinhaltes die Messungen aufgrund der Bildung von Gasblasen beeinträchtigte. Für die Anwendung der Online-Fluoreszenzmessungen in der Brauerei ist deshalb ein anderer apparativer Messaufbau erforderlich. Grundsätzlich ist die Prozessbeobachtung bei der Hefereinzucht mittels Fluoreszenzspektroskopie möglich, wie die Auswertung der Fluoreszenzspektren, die während der Hefereinzucht aufgenommen wurden, zeigte.

Für die Prozessgrößen Zellzahl, Glukosekonzentration und t-PA-Konzentration, die bei der Kultivierung von CHO-Zellen analysiert wurden, wurden Modellkalibrierungen durchgeführt. Die Fehler dieser Kalibrierungen (Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung) waren sehr gering und die Modelle gaben den Verlauf der Prozessgrößen gut wieder. Für alle drei Prozessgrößen ist eine Verfolgung während der Kultivierung auf Basis der Fluoreszenzspektroskopie möglich.

Bei den Kultivierungen von *Claviceps purpurea* wurden PLS1-Modelle für die Größen Biomasse, Proteingehalt und Gesamtalkaloidkonzentration erstellt. Die Biomasse und der Proteingehalt konnten bei der Anwendung der Modelle mit Fehlern von 5,7 % bis 7,3 % vorhergesagt werden, dabei wurden die Verläufe während der Kultivierung sehr gut wiedergegeben. Die Vorhersage der Gesamtalkaloidkonzentration gelang auch bei Verwendung der Fluoreszenzdaten ohne Datenvorverarbeitung (Bildung von Differenzspektren). Die auftretenden Energietransfereffekte, die die Fluoreszenzintensität

der Alkaloide beeinträchtigen, wurden bei der chemometrischen Berechnung durch Einbeziehung von weiteren Wellenlängenkombinationen ausgeglichen, wie anhand von Sensitivitätsspektren gezeigt wurde. Die Sensitivitätsspektren ermöglichten eine unmittelbare Beurteilung der Anwendbarkeit der Modelle und gaben Rückschlüsse auf die für die Vorhersagen relevanten Wellenlängenkombinationen.

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Bioprozesse bietet die Online-Fluoreszenzspektroskopie eine schnelle und effektive Möglichkeit zur Verfolgung der Prozessgrößen auf Basis von 2D-Fluoreszenzspektren. Eine Steigerung der Vorhersagegenauigkeit kann durch eine Verbesserung der Modelle erzielt werden, indem Daten von weiteren Prozessen mit in die Modellierung einbezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

AMICI, A. M., MINGHETTI, A., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L., Production of ergotamine by a strain of *Claviceps purpurea* (Fr.), Tul., *Experientia*, 22, 415-416, 1966

BOEHL, D., SOLLE, D., TOUSSAINT, H.-J., MENGE, M., RENEMANN, G., LINDEMANN, C., HITZMANN, B., SCHEPER, T., Application of fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring and control, Proceedings of SPIE, Sep. 2000, Boston Massachusetts USA

BOEHL, D., SOLLE, D., HITZMANN, B., SCHEPER, T., Fluorescence monitoring during cultivations of *Claviceps purpurea* and chemometric modelling for bioprocess characterisation, 2003, unveröffentlicht

CHRISTENSEN, J., NORGAARD, L., LINDEMANN, C., On-line fluorescence spectroscopy and chemometrics for qualitative and quantitative analysis: Application in the sugar industry, *Spectroscopy Europe*, 11, 5, 1999

DANZER, K., HOBERT, H., FISCHBACHER, C., JAGEMANN, K.-U., *Chemometrik – Grundlagen und Anwendungen*, Springer Verlag, Berlin, 2001

ESBENSEN, K. H., *Multivariate Data Analysis- in practice*, 4th Edition, Camo, 2000

FRERICHS, J.-G., Entwicklung eines In-situ-Mikroskops zur bildgestützten Online-Überwachung von Bioprozessen, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2000

HARBECK, C., LINDEMANN, C., SOSNITZA, P., FAURIE, R., SCHEPER, T., Fluorescence Spectroscopy for Online Monitoring of Chromatographic Molasses Desugarization, *G.I.T.Laboratory Journal*, 2001

LAVINE, B. K., WORKMAN, J. JR., *Chemometrics*, *Anal. Chem.*, 74, 2763-2770, 2002

LI, J.-K., HUMPHREY, A. E., Use of fluorimetry for monitoring and control of a bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 1043 –1049, 1991

LINDEMANN, C., Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung, Fortschr.-Ber. VDI, Reihe 17, Nr. 171, Düsseldorf, 1998

MAROSE, S., Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1999

MENGE, M., Reaktionstechnische Optimierung der Ergotalkaloidproduktion bei *Claviceps purpurea*, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2000

MICHELON, L. E., KELLEHER, W. J., The spectrometric determination of ergot alkaloids. A modified procedure employing paradimethylaminobenzaldehyd, *Lloydia*, 26 (3), 192-201, 1963

NARZIß, L. Abriß der Bierbrauerei, 6., neu bearbeitete Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1995

RENEMANN, G., Prozessoptimierung und Onlineproduktanalytik bei Tierzellkultivierungen, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2001

SCHWEDER, O., Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Analytik von Hefezellkulturen, Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2001

SCHULMAN, S.G., Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications –Part 1, Chemical Analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York, 1985

SOLLE, D., Analyse und Optimierung eines industriellen Biotransformationsprozesses zur Herstellung von Tryptophan, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2003

STÄRK, E., Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2002

WOLF, G., ALMEIDA, J. S., PINHEIRO, C., RODRIGUES, C., REIS, M. A. M., CRESPO, J. G., On-line fluorescence monitoring of bioreactors using pattern recognition approach, ESBES 3, Kopenhagen, 11.-13.9.2000

WOLFBEIS, O. S., Fluorescence of organic natural products, Molecular luminescence spectroscopy methods and applications - Part 1, Schulman, S. G., Chemical analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York, 1985

WOLFBEIS, O. S., Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors, Anal. Chem., 74, 2663-2678, 2002

www.bier.de

Tabelle 7-3:

Gainereinstellungen des BioView-Sensors bei den Kultivierungen von *Claviceps purpurea*

	Emission [nm]															
	310	330	350	370	390	410	430	450	470	490	510	530	550	570	590	ND
270	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
290	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
310	-	-	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	900
330	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
350	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
370	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
390	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
410	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
430	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	900
470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	1000	900
490	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	1000	900
510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	1000	1000	900
530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1100	1100	900
550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1100	900
ND	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	-

7.2 Medienzusammensetzung

Bei den Kultivierungen von *Claviceps purpurea* werden verschiedene, jeweils frisch angesetzte Kultivierungsmedien verwendet. Die Zusammensetzungen für das T2-Medium für die Stammhaltung auf Agarplatten und die Medien für die Flüssigkulturen sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 7-4

Zusammensetzung des T2-Mediums nach AMICI [1966]

Komponente	Menge
Saccharose	100,0 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
L-Asparagin	10,0 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,12 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20,0 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	15,0 mg
Nicotinsäureamid	0,08 mg
Agar-Agar	20,0 g
Leitungswasser	ad 1000 mL
pH (einstellen mit HCl)	5,2

Tabelle 7-5

Zusammensetzung der Medien für Flüssigkulturen nach AMICI [1966]

Komponente	InOc-Medium (Vorkultur)	T25-Medium (Hauptkultur)
	Menge	Menge
Saccharose	100,0 g	100,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	0,5 g
Citronensäure-1-hydrat	10,0 g	15,0 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,0 g	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g	0,5 g
KCl	0,12 g	0,12 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	7,0 mg	7,0 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6,0 mg	6,0 mg
Nicotinsäureamid	0,75 mg	0,75 mg
Leitungswasser	ad 1000 mL	ad 1000 mL
pH (einstellen mit HCl)	5,2	5,2

7.3 Reagenzien

7.3.1 Reagenzien für den t-PA-ELISA (Fa. Biopool international)

Coating-Puffer:	0,21 g NaHCO ₃ in 25 mL entmineralisiertem Wasser
Coating-Lösung:	250 µL „Coat“ (Antikörperkonzentrat aus dem Testkit) mit Coating-Puffer auf 25 mL verdünnen
t-PA-Standard:	15 µL t-PA-Standard mit PET-Puffer auf 500 µL verdünnen, weitere Verdünnung auf verschiedene t-PA-Konzentrationen (0-30 mg/L)
Konjugat:	40µL Konjugat-Konzentrat mit PET Puffer auf 8 mL verdünnen

7.3.2 Reagenzien für den BIORAD DC Protein Assay

Reagenz A:	wässrige Lösung aus 1-5 % NaOH, < 1% Natriumtartrat, < 1% CuSO ₄
Reagenz B:	wässrige Lösung aus < 1 % LiSO ₄ , Na-Salz der Wolframsäure, < 1% Na-Salz der Molybdänsäure, < 1% Phosphorsäure

7.3.3 Reagenzien für den Photometertest nach van Urk

Reagenz 1:	100 mg p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 mL halbkonz. Schwefelsäure
Reagenz 2:	10 mg Natriumnitrit in 10 mL entmineralisiertem Wasser (frisch ansetzen)

7.4 Temperatureinfluss bei Gärungen

Bei den durchgeführten Gärungen wurden bei Temperaturschwankungen Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensitäten beobachtet. In Abbildung 7-1 ist als Beispiel der Verlauf der Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination $270\text{ nm}_{\text{Ex}}/370\text{ nm}_{\text{Em}}$ und der Temperaturverlauf während der Gärung B4 dargestellt. Als die Kühlung des Reaktors in der 240. Stunde ausfiel und ein Temperaturanstieg auf über 17 °C erfolgte, ist ein gleichzeitiger Abfall der Fluoreszenzintensität zu beobachten.

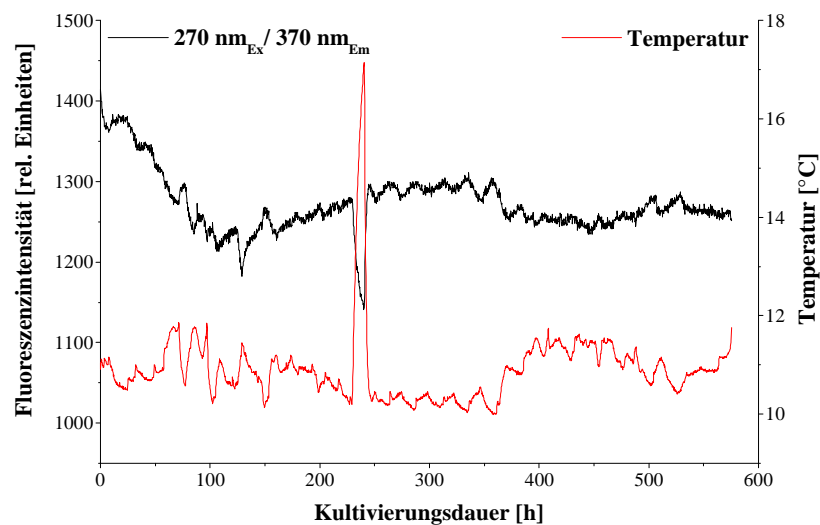


Abbildung 7-1

Darstellung der Fluoreszenzintensität der Wellenlängenkombination $270\text{ nm}_{\text{Ex}}/370\text{ nm}_{\text{Em}}$ im Vergleich zur Kultivierungstemperatur während der Gärung B4

7.5 Abkürzungen

abs.	absolut
AG	Aktiengesellschaft
BSA	Bovine Serum Albumin
cal	Kalibrierung
CHO	Chinese Hamster Ovary
cm^2	Quadratcentimeter
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
Ex	Exzitation
Em	Emission
Fa.	Firma

FMN	Flavinadenindinucleotid
hL	Hektoliter
h	Stunden
InOc	Inokulation
L	Liter
Min	Minuten
Mio.	Million
mL	Milliliter
mm	Millimeter
Mrd.	Milliarden
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nd-Filter	Neutraldichtefilter
Nm ³	Normkubikmeter
nm	Nanometer
PCA	Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PET	Phosphate buffered saline–Ethylendiamintetraacetat–Tween–Puffer
PLS	Partial Least Square
ppm	parts per million
pre	Vorhersage
rel.	relativ
rFI	relative Fluoreszenzintensität
rpm	Umdrehungen pro Minute
RISP	Real Time Integrating Software Platform
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
s.	siehe
s.u.	siehe unten
t-PA	tissue plasminogen activator
µm	Micrometer
val	Validierung
vgl.	vergleiche
YSI	Yellow Springs Instruments
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
®	Registered Trademark
2D	zweidimensional
Ø	Durchmesser