

**Nicht-invasive Analysemethoden und
multivariate Datenauswertung zur
automatisierten Beobachtung und
Regelung von Bioprozessen**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
- Dr. rer. nat. -
genehmigte**

DISSERTATION

von

**Dipl.-Chem. Kirsten Hantelmann
geboren am 20. Oktober 1975, in Peine**

Hannover 2005

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Tag der Promotion: 28. April 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis Mai 2004 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm danke ich besonders für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats sowie die vielen Diskussionen und kreativen Ideen während der Zusammenarbeit im Projekt.

Dem gesamten Arbeitskreis und allen Angestellten des Instituts für Technische Chemie möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft danken.

Mein spezieller Dank gilt

der DFG für die finanzielle Förderung des Projekts sowie den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Herbert Märkl und Prof. fil. Dr. Volker Kasche als Projektpartnern an der TU Hamburg-Harburg für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Burkhard Ernst für die Zusammenarbeit bei den *E. coli* – Kultivierungen

Marco Kollecker und Dirk Hüll für die sehr entspannte Zusammenarbeit während vieler Fedbatch-Nachtschichten („...die FIA kalibriert noch...“) und Dr. Dörte Solle für die „Einführung in die Chemometrie“

Arne Burzlaff für die Durchführung der Cytometrie, Thomas Brückerhoff und Dr. Jan-Gerd Frerichs für die Aufnahme und Auswertung der In-situ Bilder sowie Dr. Frank Stahl und Silke Buchholz für die Durchführung der Genexpressionsanalysen bei den *S. cerevisiae* - Kultivierungen

Dr. Carsten Lindemann, der bei der Firma DELTA Light & Optics stets als Ansprechpartner bereit stand und schnelle Hilfe bei allen BioView Problemen lieferte

Oliver Schweder und Bastian Rode für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Schwerpunktarbeiten

Dr. Sascha Beutel und Dr. Frank Stahl für das Korrekturlesen

Wilhelm Behnsen und allen Mitarbeitern für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen kleinen und größeren Reaktorproblemen

Danke für die Freundschaften, die in den Jahren entstanden sind, die über den Uni-Alltag hinausgingen und meine Promotionszeit mit so schön gemacht haben

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Liebe und die jahrelange Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären

Abstract

Kirsten Hantelmann

Nicht-invasive Analysemethoden und multivariate Datenauswertung zur automatisierten Beobachtung und Regelung von Bioprozessen

In dieser Arbeit wurde die 2D-Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit multivariater Datenauswertung als effektives Verfahren zur nicht-invasiven Bioprocessanalytik eingesetzt. Über die online aufgenommenen Spektren und eine anschließende chemometrische Auswertung konnten Informationen über verschiedene wichtige Prozessgrößen gewonnen werden.

Bei synchronen *Saccharomyces cerevisiae* Kultivierungen wurden durch Hauptkomponentenanalyse und PLS-Regression die Fluoreszenzdaten deutlich reduziert. Über die Korrelation der Spektren mit offline bestimmten Prozessgrößen konnten Modelle erstellt werden, die eine genaue Vorhersage intra- und extrazellulärer Variablen aus den Spektren erlauben. Eine Übertragung der Modelle auf weitere Kultivierungen mit unterschiedlicher Verdünnungsrate war möglich.

Für *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen wurde basierend auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine Prozessregelung entwickelt, die die Fütterung bei rein oxidativem Wachstum und maximaler Biomasseausbeute ermöglicht. Die Produktion von Ethanol, die bei Hefen oberhalb einer kritischen Glucosekonzentration aufgrund des Crabtree-Effekts einsetzt, konnte vollständig unterdrückt werden. Über die 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurden Änderungen des Stoffwechsels dabei umgehend erfasst. Auch hier war eine Übertragung des zur Regelung verwendeten Modells auf vergleichbare Fedbatch-Kultivierungen möglich.

Durch den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie und eine nachgeschaltete multivariate Datenauswertung konnten bei einem Hochzelldichte-Prozess von *Escherichia coli* die einzelnen Phasen des Prozessverlaufs identifiziert werden. Über PLS-Modelle wurden aus den Spektren wichtige Größen wie die Biotrockenmasse, Substrat- und Produktkonzentration vorhergesagt. Weiterhin wurden Ansätze zur Prozessregelung für *E.coli* Fedbatch-Kultivierungen entwickelt, die eine Fütterung unterhalb der kritischen Glucosekonzentration zum Ziel haben. Eine die Ausbeute herabsetzende Acetatproduktion konnte in den Spektren erkannt werden.

Stichworte: 2D-Fluoreszenzspektroskopie, PCA, PLS, *S. cerevisiae*, *E. coli*

Abstract

Kirsten Hantelmann

Non-invasive analytical methods and multivariate data analysis for the automation of bioprocess observation and control

In this thesis 2D fluorescence spectroscopy combined with multivariate data analysis has been applied as an effective and non-invasive tool for bioprocess monitoring. Using chemometrics to analyze online measured spectra has proven to provide important information on relevant process variables.

With synchronous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, 2D fluorescence data was reduced using principal component analysis. The fluorescence data was correlated to offline measured variables via PLS regression. Thus it has been possible to predict various extra- and intracellular variables from the spectra accurately. The models built could be transferred to further cultivations run at different dilution rates.

Based on 2D fluorescence spectroscopy a process control for *S. cerevisiae* fedbatch cultivations has been developed and established. The process control renders it possible to run the fedbatch cultivation at pure oxidative growth and a maximum biomass yield. The production of ethanol, which occurs due to the Crabtree effect, was suppressed by a feeding strategy below the critical glucose concentration and in-time control of metabolic changes via 2D fluorescence spectroscopy. The model used for the process control could be transferred to similar fedbatch cultivations accordingly.

Furthermore, 2D fluorescence spectroscopy has been applied to monitor high cell density cultivations of *Escherichia coli*. Multivariate analysis of the spectral data provided insights into single process phases. By building PLS models variables such as biomass and concentrations of substrate as well as product could be predicted from the spectra. In addition, first steps were taken to develop a process control for *E. coli* fedbatch cultivations that allows for a glucose-limited feeding suppressing the production of acetate. The occurrence of which could be detected in the 2D fluorescence spectra.

Keywords: 2D fluorescence spectroscopy, PCA, PLS, *S. cerevisiae*, *E. coli*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. GRUNDLAGEN	3
2.1 CHEMOMETRIE IN DER BIOANALYTISCHEN SPEKTROSKOPIE	3
2.1.1. Zweidimensionale (2D-)Fluoreszenzspektroskopie	8
2.1.2. Chemometrische Auswertung von Fluoreszenzspektren	10
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1. 2D-FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	15
3.2. CHEMOMETRIE	18
3.2.1. PLS-Modelle	18
3.2.2. Savitzky–Golay-Filter	21
3.3. CYTOMETRIE	21
3.4. IN-SITU MIKROSKOPIE	23
3.5. DNA-CHIPTECHNOLOGIE	24
3.6. FLIEßINJEKTIONSANALYSE	26
4. SYNCHRONE <i>S. CEREVISIAE</i> – KULTUREN	28
4.1. DIE BÄCKERHEFE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	28
4.1.1. Zellzyklus	28
4.1.2. Stoffwechsel	30
4.1.3. Synchrones Wachstum	31
4.2. ZIELSETZUNG DER EXPERIMENTE	33
4.3. KULTIVIERUNGSPARAMETER UND DURCHFÜHRUNG	33
4.4. DIE SYNCHRONE KULTUR H1	34
4.4.1. Beobachtung des synchronen Wachstums	34
4.4.2. Genexpressionsanalyse der synchronen Kultur H1	39
4.5. CHEMOMETRISCHE DATENAUSWERTUNG DER SYNCHRONEN KULTUR H1	44
4.5.1. Hauptkomponentenanalyse	44
4.5.2. PLS-Modelle	47
4.6. ÜBERTRAGBARKEIT DER MODELLE	51
4.7. ZUSAMMENFASSUNG	56
5. FEDBATCH-KULTIVIERUNGEN VON <i>S. CEREVISIAE</i>	57
5.1. GRUNDLAGEN ZUR FLUORESZENZBASIERTEN GLUCOSEREGELUNG	57
5.2. KULTIVIERUNGSPARAMETER UND DURCHFÜHRUNG	59
5.3. FIA-BASIERTE GLUCOSEREGELUNG DER FEDBATCH-KULTIVIERUNG FB1	60
5.4. MODELL ZUR FLUORESZENZBASIERTEN GLUCOSEREGELUNG BEI FEDBATCH-KULTIVIERUNGEN	62
5.5. FLUORESZENZBASIERTE GLUCOSEREGELUNG BEI <i>S. CEREVISIAE</i> FEDBATCH-KULTIVIERUNGEN	65
5.5.1. <i>S. cerevisiae</i> -Kultivierung FB2	65
5.5.2. <i>S. cerevisiae</i> -Kultivierung FB3	67
5.6. ZUSAMMENFASSUNG	69
6. HOCHZELLDICHTE <i>E. COLI</i>-KULTIVIERUNGEN	70
6.1. PENICILLIN AMIDASE-PRODUKTION IN REKOMBINANTEN <i>E. COLI</i>	70
6.2. ZIELSETZUNG DER EXPERIMENTE	72
6.3. BATCH-KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i> BL21(DE3)	72
6.3.1. Kultivierungsparameter und Durchführung	72
6.3.2. Beobachtung der <i>E. coli</i> BL21(DE3) Batch-Kultivierung	73

6.3.3. Hauptkomponentenanalyse	76
6.3.4. PLS-Modelle	78
6.5. FEDBATCH-KULTIVIERUNGEN VON <i>E. COLI</i> BL21(DE3) MIT INDUKTION	80
6.5.1. KULTIVIERUNGSPARAMETER UND DURCHFÜHRUNG	80
6.5.2. BEOBACHTUNG DER <i>E. COLI</i> BL21(DE3) FEDBATCH-KULTIVIERUNG	81
6.5.3. HAUPTKOMPONENTENANALYSE	83
6.5.4. PLS-MODELLE	85
6.6. <i>E. COLI</i> BL21(DE3) FEDBATCH-KULTIVIERUNG MIT EXPONENTIELLER FÜTTERUNG UND INDUKTION	87
6.7. <i>E. COLI</i> BL21(DE3) FEDBATCH-KULTIVIERUNGEN ZUR ENTWICKLUNG EINER FLUORESCENZBASIERTEN GLUCOSEREGELUNG	89
6.7.1. Kultivierungsparameter und Durchführung	89
6.7.2. Fedbatch-Kultivierung FB E1 mit exponentieller Fütterung	91
6.7.3. Fedbatch-Kultivierung FB E2 mit konstanter Fütterung	94
6.8. ZUSAMMENFASSUNG	97
<hr/> 7. SENSITIVITÄTSANALYSE VON 2D-FLUORESCENZSPEKTREN	<hr/> 99
7.1. DURCHFÜHRUNG	99
7.2. INFORMATIONSGEHALT VON 2D-FLUORESCENZSPEKTREN	100
7.3. CHEMOMETRISCHE SENSITIVITÄTSANALYSE	103
7.4. ZUSAMMENFASSUNG	105
<hr/> 8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	<hr/> 106
<hr/> 9. LITERATUR	<hr/> 111
<hr/> 10. ANHANG	<hr/> 124
10.1. ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	124
10.2. BioVIEW®-SPEZIFIKATIONEN	126
10.3. VERSUCHSAUFBAU	127
10.4. MEDIEN	128
10.4.1. Schatzmann-Medium für <i>S. cerevisiae</i>	128
10.4.2. Medien für <i>E. coli</i>	129
10.5. VORKULTUREN	130
10.5.1. <i>S. cerevisiae</i>	130
10.5.2. <i>E. coli</i>	130
10.6. ONLINE-ANALYTIK	131
10.6.1. pH-Wert	131
10.6.2. Gelöstsauerstoff (pO ₂)	131
10.6.3. Abgasanalytik	131
10.6.4. Respiratorischer Quotient	132
10.6.5. FIA-Puffer	133
10.7. OFFLINE-ANALYTIK	133
10.7.1. Zellzahl	133
10.7.2. Biotrockenmasse	133
10.7.3. Optische Dichte	134
10.7.4. Glucose	134
10.7.5. Ethanol	135
10.7.6. Acetat	135
10.8. CYTOMETRIE	136
10.8.1. Zellzyklus	136
10.8.2. Proteine	136
10.8.3. Lipide	136
10.9. DNA-CHIPTECHNOLOGIE	137
10.9.1. Isolation der RNA	137
10.9.2. DNA-Chip-Herstellung	137
10.10. ÜBERSICHT GENEXPRESSIONSANALYSE	138
10.11. KOEFFIZIENTEN FÜR DEN SAVITZKY-GOLAY-FILTER	143

1. Einleitung und Zielsetzung

Bis Mitte der 90er Jahre waren die Haupteinsatzbereiche der Biotechnologie der Nahrungsmittelsektor und der Umweltschutzbereich. Die Fortschritte der Molekularbiologie und vor allem der Gentechnik tragen heute dazu bei, dass sich die moderne Biotechnologie auch in anderen Bereichen rasch fortentwickelt.

Die „Rote Biotechnologie“, die den Pharmabereich und die Medizin abdeckt, profitiert bislang am stärksten von den neuen Möglichkeiten und ist für die Pharmaindustrie die treibende Innovationskraft geworden. Aktuell haben Bioprodukte wie Proteine, Antikörper und Enzyme bereits einen Marktanteil von 20% und Neuentwicklungen sollen zu 50% biotechnologisch gewonnene Produkte sein [Hoppenheidt et al., 2004]. Allein der Weltmarkt für therapeutische Antikörper wurde 2002 bereits auf 5,4 Milliarden US\$ geschätzt und soll sich bis 2008 verdreifachen [Ernst & Young, 2004]. In der „Grünen Biotechnologie“, d.h., den Anwendungen im Agrarsektor, begann die Nutzung von gentechnisch veränderten Pflanzen (und Tieren) vor 10 Jahren. In den USA werden inzwischen 46% des Mais, 86% des Sojas und 76% der Baumwolle mit gentechnisch verändertem Saatgut angebaut [BIO, 2004]. Aktuelle Entwicklungen haben die Nutzung von Pflanzen und Tieren zur kostengünstigen Produktion von Pharmaprodukten und Industrierohstoffen zum Ziel [D'Aquino, 2003]. In Europa und Deutschland behindert die Entwicklung in diesem Bereich jedoch zurzeit noch die Diskussion um das Gefährdungspotenzial transgener Pflanzen.

Ein großes Zukunftspotenzial wird dagegen der "Weißen Biotechnologie" vorhergesagt, deren Ziel die ökonomische und ökologische Optimierung industrieller Prozesse ist.

Experten gehen davon aus, dass sich das Umsatzvolumen in der Biotechnologie weltweit bis zum Jahr 2010 verzehnfachen und auf rund 20% des Chemieumsatzes ansteigen wird [Bachmann et al., 2000; Festel et al., 2004]. In der industriellen Produktion eröffnet die Biotechnologie neue Perspektiven für eine umweltgerechte, ressourcenschonende Wirtschaftsweise. Durch ein besseres Verständnis des zellulären Metabolismus und der Genomforschung können Stoffwechselwege gezielt modelliert und die Produktmengen entsprechend erhöht werden. Obwohl die Biotechnologie in Zukunft auch zu einer nachhaltigen, zukunftsverträglichen Chemie beitragen soll, erfolgt die Prozessoptimierung heute primär aus ökonomischen Gründen. Grundlage jeder Prozessoptimierung ist dabei zunächst eine effektive Prozessbeobachtung.

Bei Bioprozessen ist es vorrangig nötig, den aktuellen biologischen Zellzustand, wie z.B. Vitalität und Wachstum der Zellen sowie den Metabolismus verfolgen zu können. Aus Gründen der Effizienz und aufgrund der nicht-invasiven Verfahrens-

weise haben sich hier optische Sensoren bewährt. Moderne Spektrophotometer erlauben die simultane und zerstörungsfreie Online-Bestimmung verschiedener Prozessvariablen. Ein Merkmal dieser multivariaten Messverfahren, zu denen auch die zweidimensionale (2D-) Fluoreszenzspektroskopie gehört, ist, dass sie enorme Datenmengen produzieren, die aufgrund der komplexen Wechselwirkungen in biologischen Systemen schwer interpretierbar sind. Zur Auswertung werden daher sogenannte Softwaresensoren eingesetzt. Mit Hilfe chemometrischer, multivariater Auswerteverfahren können so auch latente Informationen aus den Spektren extrahiert und in vivo Prozessgrößen bestimmt werden, die ansonsten durch Offline-Analysen zeitaufwändig bestimmt werden müssten.

In dieser Arbeit soll die 2D-Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit multivariaten Auswerteverfahren bei verschiedenen Bioprozessen eingesetzt werden. Zunächst soll an synchronen Hefekulturen das Potenzial dieser Methode hinsichtlich der Vorhersage verschiedener Prozessgrößen evaluiert werden. Im Speziellen werden Metabolismus, Zellmorphologie und Genexpression näher untersucht. Darauf aufbauend soll eine Online-Glucoseregulung bei Hefe-Fedbatch-Kultivierungen realisiert werden, um den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie als Instrument zur Prozesssteuerung zu überprüfen. Hinsichtlich der Prozessoptimierung sollen in Kooperation mit der TU Hamburg-Harburg Ansätze zur Steigerung der Produktausbeute bei einer hochzellichten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Kultivierung entwickelt werden.

2. Grundlagen

Die zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie ist eine relativ junge Anwendung in der Bioanalytik bzw. Bioprozessbeobachtung. Spektroskopische Methoden allgemein haben eine wesentlich längere Tradition und sind aufgrund der anfallenden Datenmengen prädestiniert für chemometrische Anwendungen. Zunächst wird deshalb als Einstieg ein genereller Überblick über chemometrische Anwendungen in der bioanalytischen Spektroskopie gegeben, bevor die für diese Arbeit wesentlichen Grundlagen der 2-dimensionalen Fluoreszenzspektroskopie sowie der Chemometrie erläutert werden.

2.1 Chemometrie in der bioanalytischen Spektroskopie

Die Chemometrie wird etwa seit Mitte der 70er Jahre als ein Zweig der Analytischen Chemie bzw. der Pharmazeutischen Chemie betrachtet. Moderne Analysengeräte produzieren große Mengen Rohdaten, die ohne eine nachgeschaltete Auswertung dieser Daten wertlos bleiben. So wurden chemometrische Methoden entwickelt, um genau diese Auswertung von Messdaten zu bewerkstelligen. Der Schwerpunkt liegt dabei bei mathematisch-statistischen Methoden, beginnend bei der uni- und multivariaten Regression und Kalibrierung, Hauptkomponenten- und Faktorenanalyse über Mustererkennung und Klassifizierung (Cluster-Algorithmen, neuronale Netzwerke) bis hin zu Validierungsstrategien und kombinatorischen Optimierungen wie z.B. genetischen Algorithmen.

In der analytischen Spektroskopie werden die Daten (d.h. die Spektren) zumeist durch eine Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis, PCA) in ihrer Dimension reduziert, um sie dann in Form eines Scatter-Plots zu homogenen Gruppen zusammen zu fügen. Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung Hierarchischer Cluster-Alysen (HCA), bei der die Daten entsprechend ihres Abstands bzw. ihrer Ähnlichkeit zusammengefasst werden. Sind bereits Datengruppen bekannt und sollen neue Daten nur zugeordnet werden, ist die Diskriminanzanalyse (DA) eine Möglichkeit der Mustererkennung, bei der die Varianz innerhalb der Gruppen minimiert und zwischen den Gruppen maximiert wird. Eine weitere mittlerweile gebräuchliche Methode zur Datenanalyse ist die Verwendung Artifiziereller Neuronaler Netze (ANNs), die das menschliche Gehirn imitieren. Ein Eingangssignal, zumeist über eine vorgeschaltete PCA gewonnen,

wird dabei durch verschiedene Übertragungsfunktionen innerhalb des Netzes in ein Ausgangssignal umgewandelt. Aufgrund der vielen möglichen Gewichtungen und Lernalgorithmen ist die Optimierung der ANNs oft kompliziert, und wie auch die Diskriminanzanalyse benötigt ein Neuronales Netz Test- und Validierungssets, um die Qualität der Analyse zu gewährleisten.

Sämtliche genannten chemometrischen Auswerteverfahren werden heutzutage in Kombination mit spektroskopischen Methoden in der Bioanalytik eingesetzt, unter denen die **Infrarot (IR) – Spektroskopie** eine wichtige Rolle einnimmt. Bereits 1954 wurden mit ihrer Hilfe von *Thomas* und *Greenstreet* Bakterien charakterisiert. Der infrarote Spektralbereich umfasst die Wellenlängen von ca. 760 nm bis zu 1000 μm und wird in nahes Infrarot (NIR, bis 3000 nm), mittleres Infrarot (MIR, bis 30 μm) und fernes Infrarot (FIR, bis 1000 μm) unterteilt. Für die Analytik sind insbesondere NIR und MIR interessant, charakteristische Schwingungsbanden erlauben die Charakterisierung und Quantifizierung von Biomolekülen wie Proteinen, DNA oder Zellwand-Komponenten. Die MIR – Spektroskopie, die die fundamentalen Schwingungsmoden von Molekülen erfasst, dient auch zur Identifizierung unbekannter Spezies.

Obwohl die erste bioanalytische Anwendung der IR-Spektroskopie bereits 50 Jahre alt ist, war die Anwendbarkeit aufgrund schwacher Spektrometerleistungen, hohem Signal/Rauschverhältnis und der Interferenz durch Wasser zunächst begrenzt. Erst durch die Entwicklung interferometrischer Techniken konnte sich mit der **Fouriertransform - Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie)** eine hochempfindliche und schnelle Analytik etablieren. Bei dieser Multiplextechnik wird ein Interferogramm aufgenommen, das die Fouriertransformierte des Spektrums darstellt.

FT-IR-Techniken haben mittlerweile in der Bioanalytik ihren festen Platz. Bei *Marley et al.* [2001] findet sich eine Übersicht der Veröffentlichungen der letzten 10 Jahre, die sich mit der Diskriminierung, Klassifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen über FT-IR-Spektroskopie und Chemometrie befassen. Durch Anwendung von Hauptkomponenten- und Clusteranalysen, ANNs und Diskriminanzanalysen konnten z.B. Stämme unterschiedlicher Bakterien und Hefen unterschieden oder auf die Reaktion auf Antibiotika und Mediumzusammensetzung untersucht werden.

Generell finden sich aufgrund ihrer großen Verbreitung in der Biotechnologie viele Anwendungen für Hefe-Kultiverungen. So konnten durch FT-IR-Spektroskopie und multivariate Diskriminanzanalyse 22 Brauhefestämme unterschieden werden [Timmins et al., 1998], durch FT-IR Daten und PCA wurde eine Qualitätskontrolle für Bier entwickelt [Duarte et al., 2004]. *Mazarevica et al.* [2004] beschreiben eine Möglichkeit zur Online-Vorhersage der Glucose- und Ethanol-Konzentration bei

einer Bäckerhefe-Kultivierung durch Kombination von MIR-Spektroskopie und multivariater Regression.

Weiter finden sich Anwendungen der NIR-Spektroskopie zur Vorhersage von Nährstoffkonzentrationen bei Batch-Kultivierungen [Brimmer et al., 1993]. Durch die Implementierung eines neuen Auswahlalgorithmus' für Wellenlängen und multivariate Kalibrierung konnten bei Fibroblasten-Kulturen Glucose- und Lactatkonzentrationen vorausgesagt werden [McShane et al., 1999]. *Hagman* und *Sivertsson* [1998] diskutieren die Anwendung der NIR-Spektroskopie zur Prozessbeobachtung von Säugerzellkulturen inklusive Kalibrationsstrategien zur Bestimmung von Nährstoffen und Metaboliten sowie der Möglichkeit zur Bestimmung der Zellqualität und Zellzahl. Auch bei *E. coli*-Kultivierungen konnten über verschiedene multivariate Modelle z.B. die Konzentrationen von Acetat und Ammonium sowie die Biomasse bestimmt werden [Hall et al., 1996]. 2002 wurde von *Mossoba et al.* [2002] eine Messanordnung zur Unterscheidung von pathogenen *E. coli*-Stämmen beschrieben, die FT-IR Daten von einem mit Bakterien beladenen optischen Film misst. Ebenfalls wurde durch den Einsatz von FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit verschiedenen chemometrischen Verfahren die Überproduktion von Metaboliten bei *E. coli*- und *Staphylococcus aureus*-Kulturen detektiert [Winson et al., 1997].

Spezielle Anwendungen der IR-Spektroskopie beschreiben beispielsweise das Monitoring von Festphasen-Fermentationen am Beispiel von Pilzbefall auf Mais [Gordon et al., 1993]. Die strukturellen Typen von Polysacchariden in Zellwänden verschiedener Hefen konnten ebenfalls durch den Einsatz von Infrarot-Spektroskopie in Verbindung mit multivariater Analyse bestimmt werden [Bahmed et al, 2003] und bei der Tierfutterherstellung konnte eine Qualitätsüberwachung realisiert werden [Johnson et al., 2004].

Oftmals werden in der Literatur mehrere Spektroskopiearten miteinander kombiniert, um die jeweiligen Vorteile optimal zu nutzen. Allen Methoden ist die Möglichkeit zur nicht-invasiven und zerstörungsfreien Messung zueigen, weshalb auch die Kombination mehrerer Analysen mit einer Probe problemlos möglich ist.

2002 wurden von *McGovern et al.* FT-IR- und Raman-Spektroskopie sowie die Pyrolyse-Massenspektrometrie (pyMS) zum Monitoring der Produktion von Gibberellinsäure aus dem Pilz *Gibberella fujikuroi* eingesetzt. Durch die Anwendung von multivariater Regression sowie neuronaler Netze konnte mit allen drei Methoden die Säurekonzentration vorhergesagt werden.

Die pyMS gehört nicht zu den spektroskopischen Methoden und arbeitet nicht zerstörungsfrei, wird jedoch häufig in Kombination oder auch allein zur Untersuchung von Bioprozessen herangezogen, da sie schnell und automatisiert Fingerprints von Biomolekülen liefert. In der Biotechnologie wird die pyMs

bevorzugt zur Identifikation und Quantifizierung von rekombinant produzierten Proteinen und anderen Stoffwechselprodukten eingesetzt [Goodacre et al., 1994, Goodacre et al., 1995, McGovern et al., 1999].

Die **Raman-Spektroskopie** ist verwandt mit der Infrarot-Spektroskopie. Auch hier werden charakteristische Schwingungs- und Rotationsbanden gemessen, die allerdings entsprechend dem Raman-Effekt auf der inelastischen Streuung des eingestrahlten Photons beruhen. Aufgrund der geringen Intensität der Raman-Streuung war es erst mit der Entwicklung von Lasern möglich, Raman-Spektren von Biomolekülen auszuwerten. Im Gegensatz zur IR-Spektroskopie erhält man im Raman-Spektrum diskrete Banden, und der Einfluss von Wasser ist aufgrund des geringen Streueffekts vernachlässigbar. Während im IR-Spektrum polare Gruppen besonders intensive Banden liefern, ist der Raman-Effekt bei unpolaren Gruppen stärker ausgeprägt. Die Raman-Streuung kann im sichtbaren sowie im ultravioletten (UV-) Bereich angeregt werden, wobei letzteres den störenden Einfluss von eventuell in der Probe auftretender Fluoreszenz verhindert.

Durch die Weiterentwicklung der Lasertechnik ist es heutzutage möglich, gezielt die elektronischen Übergänge bestimmter Chromophore anzuregen, um durch den Resonanzeffekt die Intensität der gestreuten Strahlung zu erhöhen. Diese Methode wird dementsprechend als **Resonanz-Raman-Spektroskopie** bezeichnet. Weiter ist es auch möglich, den Raman-Effekt mit FT-IR-Spektrometern zu messen, wodurch die besonders schwache Streuung im langwelligen Anregungsbereich gemessen werden kann.

Die Anwendungen der Raman-Spektroskopie in der Bioanalytik sind ebenso vielfältig wie die der IR-Spektroskopie. Durch den Einsatz der FT-Raman-Spektroskopie konnte(n) so beispielsweise der Befall von Nahrungsmitteln durch Mikroorganismen detektiert und die entsprechenden Stämme auch identifiziert werden. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Hauptkomponentenanalyse sowie Clusterbildung [Yang et al., 2003]. Analog zur FT-IR-Spektroskopie finden sich auch bei der FT-Raman-Spektroskopie vielfältige Einsatzmöglichkeiten zur Untersuchung von Zellsuspensionen und Trockenfilmen von Mikroorganismen [Schmitt et al., 1998; Naumann, 1998; Edwards et al., 1995]. Neben Clusteralgorithmen wurden hierbei auch ANNs zur Datenanalyse herangezogen. Bezüglich der Bioprozessbeobachtung beschreiben *Shaw et al.* [1999] ein Verfahren, über den Einsatz von dispersiver Raman-Spektroskopie in Verbindung mit multivariater Kalibrierung bei Hefen die Umwandlung von Glucose in Ethanol online zu beobachten. Die Untersuchung der alkoholischen Fermentation bei Hefen wird mit leicht unterschiedlicher Instrumentation mehrfach beschrieben [Shope et al., 1987; Gomy et al., 1988], wobei eine Anregung im UV-Bereich den störenden Einfluss der Fluoreszenz in der biologischen Probe verhindern konnte.

Die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie (UVR-R-Spektroskopie) ist ebenfalls eine etablierte Möglichkeit, um Bakterienstämme zu unterscheiden. Studien haben gezeigt, dass Änderungen in der Nukleinsäurekonzentration sehr genau detektiert [Wu et al., 2000] und sogar Spektren von *E. coli* in verschiedenen Wachstumsphasen vorhergesagt werden können [Wu et al., 2001]. Lopez-Diez und Goodacre [2004] haben durch Anwendung der UVR-R-Spektroskopie in Verbindung mit den chemometrischen Methoden PCA, DFA und HCA 27 Stämme der Gattungen *Bacillus* und *Brevibacillus* identifiziert und unterschieden.

IR- und Raman-Spektroskopie haben neben der Fluoreszenzspektroskopie (siehe 2.1.1.) ihren festen Platz in der Bioprozessanalytik. Nichtsdestotrotz gibt es vereinzelt auch Ansätze, andere Spektroskopiearten zur Bestimmung von Biomolekülen zu nutzen. Relativ häufig findet man dabei verschiedene **NMR (Nuclear magnetic resonance)-Techniken**. Die NMR-Spektroskopie ist keine optische Spektroskopie, da sie die Aufspaltung der Kernspins von Atomkernen (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) im Magnetfeld zur Analyse nutzt. Sie erfordert zusätzlich eine aufwändige Probenvorbereitung, weshalb sie bisher selten zur Prozessbeobachtung eingesetzt wird. Die Hauptanwendung bleibt die Analytik in der Organischen Chemie und Biochemie, wo die NMR-Spektren Aufschluss über die Strukturen von Biomakromolekülen auf atomarem Niveau geben.

In Kombination mit anderen spektroskopischen Methoden wird die NMR-Spektroskopie in der Bioanalytik meist unterstützend eingesetzt, so beispielsweise in der Qualitätskontrolle von Nahrungsmitteln [Duarte et al., 2004; Le Gall et al., 2001; Charlton et al., 2002]. Hinsichtlich der Bioprozessbeobachtung wurde von Bradamante et al. [2002] ein Verfahren beschrieben, die Produktion von Lovastatin, einem cholesterinsenkenden Medikament, durch den Einsatz von DOSY-NMR (diffusion-ordered spectroscopy-NMR) zu optimieren. Diese Methode nutzt die Diffusionsrate von Molekülen zur Trennung der auftretenden Resonanzen und damit zur Unterscheidung der Komponenten innerhalb einer Probe [Johnson, 1999]. Über die Festlegung von Hauptprozessvariablen und anschließender Clusteranalyse konnten im oben genannten Beispiel die Lovastatinkonzentration sowie Co-Metabolite und Verunreinigungen bestimmt und identifiziert werden.

Da die Biomasse eine grundlegende Größe ist, die bei Bioprozessen bestimmt werden muss, wurden diesbezüglich auch die meisten Ansätze entwickelt. Neben den genannten Methoden finden sich auch spezielle Verfahren wie **Streulicht-Messungen** sowie die **Dielektrische Spektroskopie**, wobei letztere über Impedanzmessungen ebenfalls in Kombination mit chemometrischen Methoden

eine zeitnahe und nicht-invasive Bestimmung der Biomasse ermöglicht [Jones et al., 1998, Nicholson et al., 1996, Schanne und Ceretti, 1978].

Im Speziellen soll nun jedoch mit der 2-dimensionalen Fluoreszenzspektroskopie eine häufiger genutzte Methode näher erläutert werden.

2.1.1. Zweidimensionale (2D-)Fluoreszenzspektroskopie

Die Entwicklung der Fluoreszenzspektroskopie als Werkzeug in der Bioanalytik begann mit der Entdeckung der Autofluoreszenz lebender Zellen im Jahre 1957 [Duysens und Ames, 1957].

Als Fluoreszenz bezeichnet man eine Form der Lumineszenz, bei der ein photochemisch angeregtes Molekül durch Relaxation Licht emittiert. Nach Anregung erfolgt dabei zunächst ein strahlungsloser Übergang von höheren angeregten Zuständen in den niedrigsten angeregten Zustand, weshalb bei der Fluoreszenz immer eine Rotverschiebung gegenüber der Absorption eintritt.

Fluoreszenz kann generell bei Molekülen auftreten, die leicht anregbare π -Elektronen besitzen. Bei der Bioprozessbeobachtung macht man sich vor allem die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren, des reduzierten Nicotinamid-Adenindinucleotid-(phosphat)s (NAD(P)H) sowie der Coenzyme Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadenindinucleotid (FAD) zunutze, welche als intrinsische Fluorophore in lebenden Zellen detektiert werden können.

Die ersten Fluoreszenzsensoren waren auf die Detektion der NAD(P)H-Fluoreszenz beschränkt [Harrison et al., 1970; Zabriskie und Humphrey, 1978], womit aber bereits online eine Bestimmung der Biomasse bei Hefe-Kultivierungen und später auch bei anderen Stämmen erreicht werden konnte [Meyer et al., 1984; Boyer und Humphrey, 1988]. Erst mit der Entwicklung von Mehrkanal-Spektrometern konnten dann auch andere Fluorophore gleichzeitig erfasst werden, wodurch sich die Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie hinsichtlich der Bioprozessbeobachtung immens erweiterten [Scheper und Schügerl, 1986; Li et al., 1991; Chenina, 1993].

Durch die Entwicklung der 2-dimensionalen Fluoreszenzspektroskopie, bei der die Spektren durch die Anregungs-/Emissionsmatrix und die zugehörigen Intensitäten im Endeffekt dreidimensional erhalten werden, war es dann auch unumgänglich, moderne Auswerteverfahren anzuwenden, um die Daten interpretieren zu können. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung biologischer Proben treten in den Spektren Überlagerungen auf, zudem erschweren äußere und innere Einflüsse auf die Fluoreszenz (z.B. pH-Wert, Gasblasen, Medienzusammensetzung, Streulicht, *Inner-filter*-Effekte, Fluoreszenzlöschung und der Kaskadeneffekt [Marose, 1999]) die eindeutige Zuordnung.

Zur Auswertung der Spektren werden daher multivariate Methoden eingesetzt, unter ihnen vor allem Hauptkomponentenanalysen und neuronale Netze [McGovern, 2002; Jung, 2002].

Im Zuge dessen sind mittlerweile vielfältige Anwendungen der 2-dimensionalen Fluoreszenzspektroskopie beschrieben worden. Hinsichtlich der Bioprozessbeobachtung konnte die Biotensid-Produktion in *Corynebacterium alkanolyticum* überwacht werden [Crosman et al., 2002], und über die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung des mitotischen Index' bei Säugerzellen wurde ein Zusammenhang zum Zellwachstum in Tierzellkulturen gefunden [Abu-Absi und Srien, 2002]. *Boehl et al.* [2003] beschreiben ein Verfahren, über eine chemometrische Auswertung Biomasse, Proteingehalt und produzierte Alkaloide bei *Claviceps purpurea*-Kulturen vorherzusagen. Basierend auf Fluoreszenzspektren in Kombination mit multivariater Regression konnten ebenso bei *Pseudomonas fluorescens* Aussagen über die Konzentration an Stoffwechselprodukten getroffen werden [Skibstedt et al., 2001].

Weiter wurden fluoreszenzbasierte Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie [Munk, 1989], in der Umwelttechnik [Chudyk et al., 1992] sowie in der Oberflächenanalyse beschrieben [Beutel et al., 2002].

Neben den intrinsischen werden auch extrinsische Fluorophore in der Bioanalytik eingesetzt, sei es über analytspezifische Fluoreszenzfarbstoffe oder durch Markierung von Zielmolekülen.

Eine wesentliche Rolle spielt dabei das GFP (Green fluorescent protein) als Marker und Reporter-Gen. So konnten über die GFP-Fluoreszenz quantitative Genexpressionsanalysen in Echtzeit durchgeführt werden [Canghai et al., 2002], und es wurde ein Verfahren zur Beurteilung von physiologischem Zellstress beschrieben [Funabashi et al., 2002]. Mit Hilfe von aromatischen Aminosäuren als Fluoreszenzmarkern konnten Konformationsanalysen von Proteinen durchgeführt werden [Brockhinke et al., 2000], und über Fluorescein-Diacetat-Markierung von Esterasen wurden in Tabakzellen Untersuchungen zur Lebensfähigkeit von Pflanzenzellen beschrieben [Vankova et al., 2001].

Obwohl die Fluoreszenzspektroskopie durch die lange Lebensdauer der Fluoreszenz von 10^{-9} bis 10^{-7} s und die hohe Empfindlichkeit gegenüber vor allem extrinsischen Fluorophoren prädestiniert für die Bioanalytik ist, ergeben sich durch die Komplexität der biologischen Systeme und die genannten vielfältigen Einflüsse auf die Fluoreszenz große Herausforderungen hinsichtlich der Datenauswertung. In dieser Arbeit werden bestimmte chemometrische Verfahren angewandt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.1.2. Chemometrische Auswertung von Fluoreszenzspektren

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie erlaubt die simultane Detektion einer Vielzahl von Prozessgrößen. Neben der direkten Messung der intrinsischen Fluorophore, die Auskunft über den Zellzustand geben, ist es auch möglich, aus den Fluoreszenzspektren latente Informationen zu gewinnen bzw. Prozessparameter zu bestimmen, die auf den ersten Blick nicht mit der Fluoreszenz in Verbindung stehen, wie z.B. Substrat- und Produktkonzentrationen.

Die Aufnahme eines 2D-Spektrums liefert eine Datenmatrix aus Exzitation, Emission und Intensität; in dieser Arbeit werden beispielsweise 150 Wellenlängenkombinationen (WLKs) pro Spektrum vermessen. Aufgrund der vielfältigen biologischen, chemischen und physikalischen Wechselwirkungen bei Bioprozessen ist eine lineare Abhängigkeit zwischen Prozessparameter und Fluoreszenz meist nicht gegeben. Vielmehr beeinflussen und überlagern sich Fluoreszenzen in benachbarten Bereichen des Spektrums und schaffen so gegenseitige Abhängigkeiten (Kolinearität) [Stärk, 2002]. Zur Auswertung müssen daher Methoden zur Anwendung kommen, die den Informationsgehalt des gesamten Spektrums berücksichtigen und die Datenmengen gleichzeitig komprimieren.

Eine vielfach genutzte Methode ist diesbezüglich die **Hauptkomponentenanalyse (PCA)** [Jolliffe, 1986]. Bei der PCA erfolgt eine lineare Transformation der Variablen, so dass möglichst wenig neue Variablen die relevante Information beschreiben, wobei das Maß für die Relevanz die Varianz ist. Die mit der PCA untersuchten Daten sind in einer Matrix organisiert. In einer Zeile befindet sich jeweils ein Objekt mit den Werten seiner Variablen. Bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erhält man diese Datenmatrix aus den Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen WLKs bei verschiedenen Messungen. Das bedeutet, jede Zeile der Matrix enthält ein Spektrum und jede Spalte die Fluoreszenzintensitäten einer Wellenlängenkombination. Die X-Variablen sind dementsprechend die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen WLK (siehe Abb. (2.1.2.1.)).

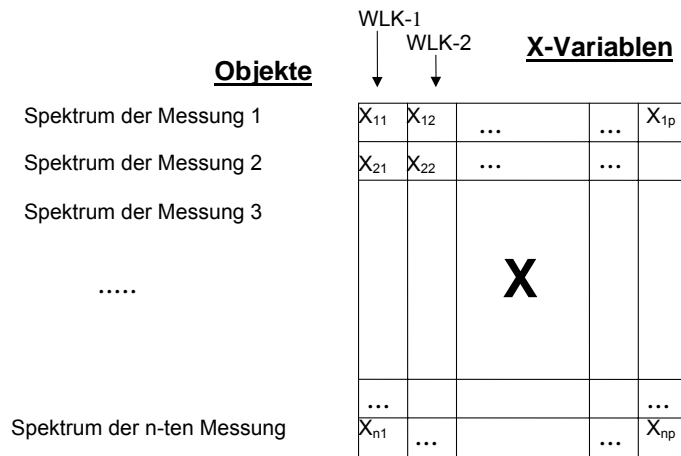


Abb. 2.1.2.1.: Datenmatrix von 2D-Fluoreszenzspektren. In den Zeilen befinden sich die Fluoreszenzintensitäten der aufgenommenen Spektren 1 bis n, in den Spalten die der Wellenlängenkombinationen 1 bis p

Der wesentliche Bestandteil der Hauptkomponentenanalyse ist die Hauptachsentransformation. Bei n Messungen und p Wellenlängenkombinationen lassen sich die Spektren als Punktwolke in einem p -dimensionalen kartesischen Koordinatensystem darstellen. Die Transformation erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird der Ursprung des Koordinatensystems in den Schwerpunkt der Punktwolke gesetzt, d.h., die Daten werden zentriert. Dazu wird von jeder Zelle der Mittelwert der Spalte subtrahiert, so dass die Gesamtsumme aller Werte einer Spalte Null wird. Im zweiten Schritt wird das Koordinatensystem so gedreht, dass die erste Koordinate die maximale Varianz der Daten beschreibt. Mathematisch betrachtet werden dazu die Eigenwerte der Kovarianzmatrix berechnet, die die Varianz in der neuen Koordinatenrichtung angeben. Damit ist die erste Hauptachse festgelegt und die Koordinate in dieser Richtung ist die erste Hauptkomponente.

Zur Berechnung der folgenden Hauptkomponenten, die zueinander orthogonal sind, wird die jeweils verbleibende Varianz maximiert. Für die p -dimensionalen Daten gibt es also maximal p Achsen bzw. Hauptkomponenten, die linear unabhängig voneinander sind [Hartung und Elpelt, 1999]. In Abbildung (2.1.2.2.) ist zur Anschauung die Lage der Hauptkomponenten für ein zweidimensionales Koordinatensystem ($p=2$ WLKs) schematisch dargestellt.

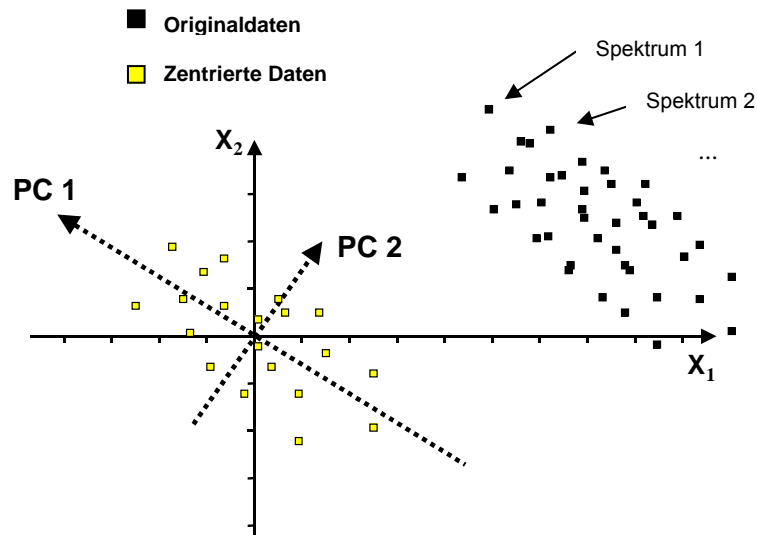


Abb. 2.1.2.2.: Lage der ersten und zweiten Hauptkomponente (PC) im zweidimensionalen Koordinatensystem nach Zentrierung der Fluoreszenzdaten

Die Anwendung der Hauptachsentransformation führt zur Vernachlässigung von Anteilen, die wenig zur Gesamtvarianz beitragen. Im Speziellen lässt sich so in den Spektren der eigentliche Dateninhalt von Fremdeinflüssen trennen, da z.B. Rauschen im Gegensatz zu den Messwerten keine Vorzugsrichtung im Raum aufweist. In der Regel genügen 3 bis 4 Hauptkomponenten, um den Großteil der Varianz zu beschreiben. Die damit zusammenhängende Reduktion der Variablenzahl führt zu einer einfacheren Übersicht der Daten und des zwischen ihnen bestehenden Zusammenhangs.

Durch die Berechnung der neuen Achsen wird die Ausgangsmatrix \mathbf{X} durch kleinere Matrizen angenähert. Die Informationen sind in der Score-Matrix \mathbf{T} und der Loading-Matrix \mathbf{P} enthalten, die Restmatrix \mathbf{E} enthält das Messrauschen (Gl. (2.1.2.1.)):

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (2.1.2.1.)$$

Die Scores geben die Koordinaten der Objekte bezüglich der Hauptkomponenten an. Im Score-Plot werden die Objekte der Datenmatrix in den neuen Datenraum, der durch die Hauptkomponenten aufgespannt wird, projiziert. In dieser Darstellung lassen sich leicht Gruppierungen, Unterschiede und Ausreißer identifizieren. Die Loadings sind die Faktoren der Linearkombination der ursprünglichen Variablen zur entsprechenden Hauptkomponente. Als Funktion der PCs aufgetragen zeigen sie die unterschiedlichen Einflüsse der Variablen (WLKs) auf die Komposition der Hauptkomponenten.

Zur Durchführung von Hauptkomponentenanalysen steht vielfältige Software zur Verfügung, die unterschiedliche Algorithmen zur Berechnung der benötigten Vektoren verwendet. Der einfachste unter ihnen ist das iterativ arbeitende

NIPALS-(Nonlinear Iterative Partial Least Squares)Verfahren. Aufwendigere Methoden basieren auf einer Matrixdiagonalisierung (z.B. Singulärwertzerlegung) oder auf einer Bidiagonalisierung wie das PLS-(Partial Least Squares)Verfahren [Otto, 1997].

Die Daten, die aus der Hauptkomponentenanalyse gewonnen werden, sollen letztendlich zur Modellierung von Prozessgrößen dienen. Das bedeutet, die Informationen aus den Spektren müssen mit den entsprechenden abhängigen Variablen (z.B. Offline-Daten) in Beziehung gesetzt werden, um so Kalibrationsmodelle zu erstellen. Als Methode bieten sich hierfür Regressionsverfahren an, von denen die PCR (Pincipal Component Regression) und die PLS-Regression eng verwandt mit der PCA sind. Erstere beinhaltet auch eine gewöhnliche Hauptkomponentenanalyse, die meist über eine Singulärwertzerlegung berechnet wird und an die sich dann eine konventionelle Regression anschließt. Die **PLS-Regression** ist eine relativ moderne Methode, die von *Wold* 1975 entwickelt wurde. Diese Methode unterscheidet sich von der PCR, indem sie die abhängigen Y-Variablen in die Komprimierung der X-Variablen mit einbezieht. Durch dieses Verfahren werden mögliche Einflüsse von X-Variablen minimiert, die zwar eine große Varianz besitzen, aber irrelevant hinsichtlich des Kalibrationsmodells sind. Die PLS-Regression ist wesentlich aufwändiger als die PCR, da zur Gewährleistung der Orthogonalität der Faktoren zwei Loading-Vektoren berechnet werden müssen [Adams, 1995]. Analog zur PCA werden die Daten zunächst zentriert. Anschließend werden über die Maximierung der Kovarianz zwischen der Linearkombination von X und Y die Gewichte der X-Matrix bestimmt. Daraus berechnen sich nacheinander die Scorematrix der X- und Y-Matrix **T**, die Loading-Matrizen **P** und **Q**, die Loading-weight-Matrix **W** sowie die Restmatrizen **E** und **F**, so dass die ursprünglichen Daten schließlich die folgende Form annehmen:

$$X = T W (P^T W)^{-1} + E \quad (2.1.2.2.)$$

und
$$Y = T Q^T + F \quad (2.1.2.3.)$$

Die Korrelation zwischen X- und Y-Datensatz, d.h. der Regressionskoeffizient **B**, wird aus den Matrizen berechnet:

$$B = W(P^T W)^{-1} Q^T \quad (2.1.2.4.)$$

Durch Auflösen von Gleichung (2.1.2.2.) nach T und Einsetzen in Gleichung (2.1.2.3.) ergibt sich für die Vorhersage der folgende Zusammenhang zwischen X- und Y-Matrix:

$$Y = (W (P^T W)^{-1} Q^T) X \quad (2.1.2.5.)$$

Damit erhält man ein Modell, das es erlaubt, aus den X-Variablen (Spektren) die Y-Variablen zu berechnen, nachdem eine Kalibration mit den bestehenden Y-Variablen durchgeführt wurde. Man unterscheidet bei der PLS-Regression weiterhin zwischen PLS1 und PLS2, bei Ersterer wird nur eine Y-Variable (d.h., eine Prozessgröße) für das Modell herangezogen, während bei PLS2 mehrere Variablen gleichzeitig berücksichtigt werden.

Um die Güte des Modells zu überprüfen, können mehrere **Validierungsstrategien** herangezogen werden. Eine Validierung ist notwendig, da die Gefahr der Überanpassung (overfitting) besteht. Mit jeder zusätzlichen Hauptkomponente oder jedem zusätzlichen Faktor sinkt der Fehler der Kalibration, während der Fehler der Validierung und der Fehler der Vorhersage nach Erreichen der optimalen Anzahl an PCs wieder ansteigt. Mit Hilfe der Validierung wird versucht zu bestimmen, wie viele Faktoren notwendig sind, um den geringsten Fehler der Analyse zu erhalten.

Für die **Test-Set-Validierung** wird eine bestimmte Anzahl Objekte (Spektren und dazugehörige Y-Variablen) als Kalibrationsset bestimmt, mit Hilfe derer das Modell erstellt wird. Die übrigen Objekte dienen als Test-Set, werden anschließend durch das Modell vorhergesagt und mit den gemessenen Objekten verglichen. Eine Test-Set-Validierung bietet sich an, wenn sehr viele Offline-Messungen als Y-Variablen zur Verfügung stehen. Effizienter aber auch zeitaufwändiger ist die **Kreuzvalidierung**. Hierbei werden sämtliche Daten gleichzeitig zur Modellbildung und zum Testen verwendet. Der Datensatz wird sukzessive in verschiedene Kalibrations- und Testsets geteilt. Bei der Berechnung des Modells mit dem Kalibrationsset bleiben damit jeweils einzelne Objekte unberücksichtigt und werden anschließend durch das Modell vorhergesagt. Dies geschieht so lange, bis jedes Objekt einmal im Testset vorhanden war. Sehr schnell aber bei weitem nicht so präzise ist die **Leverage-Korrektion**. Der Leverage-Wert eines Objekts gibt die Distanz zum Mittelpunkt des Koordinatensystems an, ist zwischen Null und Eins normiert und ein Maß für den Einfluss des Objekts auf das Modell. Über diese Werte wird der Fehler der Kalibration sowie der Vorhersage berechnet. Die Leverage-Korrektion ist bezüglich der PLS-Regression nur eine Simulation ohne tatsächliche Vorhersage und liefert meist sehr gute Ergebnisse, die einer anderen Validierung nicht immer Stand halten [Esbensen, 2000].

3. Material und Methoden

3.1. 2D-Fluoreszenzspektroskopie

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Fluoreszenzspektrometer eingesetzt. Für Online-Messungen bei den Kultivierungen wird der BioView[®]-Sensor verwendet, Küvettenmessungen werden mit dem F-4500 (Hitachi, Japan) durchgeführt.

Der **BioView[®]-Sensor** (Abb. 3.1.1.) der Firma Delta Danish Electronics Light & Acoustics, Dänemark, ist ein robustes Fluoreszenzspektrometer und speziell für den industriellen Einsatz konzipiert [Lindemann, 1998]. Über zwei unabhängig voneinander rotierende Filterräder mit je 16 verschiedenen Filtern wird für jede Wellenlänge der Exzitation (ex) im Bereich von 270 nm bis 550 nm die jeweilige Emission (em) im Bereich von 310 nm bis 590 nm gemessen. Zusätzlich kann über zwei Neutraldichtfilter (exND und NDem) mit einer Transmission oberhalb von 450 nm das wellenlängenabhängige Streulicht aufgenommen werden. Die Schmalband-Interferenzfilter haben eine Bandbreite von 20 nm und wurden zur optimalen Nutzung des angegebenen Messbereichs so gewählt, dass alle 20 nm eine Messung möglich ist. Die Aufnahme eines kompletten Spektrums mit 150 Wellenlängenkombinationen dauert ca. 90 s, und über die mitgelieferte Software lassen sich unter Anderem die Filter individuell anwählen, die Intensitäten der gemessenen Fluoreszenz über den Photomultiplier-Gain steuern sowie die Anzahl der Messungen zur Mittelwertbildung festlegen. Im Anhang (10.2.) ist eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen gegeben.

Der BioView[®]-Sensor ist in einer Edelstahlbox vor Temperatureinflüssen, Feuchtigkeit und mechanischer Belastung geschützt (Bild siehe Anhang (10.2.)). Die Datenübertragung erfolgt optisch, um elektromagnetische Störungen zu unterbinden. Als Lichtquelle dient eine gepulste Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan), die bei langer Lebensdauer eine hohe Lichtintensität gewährleistet.

Die Fluoreszenzmessung findet nach dem "open-end"-Prinzip direkt im Reaktor (in-situ) statt, d.h., das Emissionslicht wird im Winkel von 180° zur Exzitation gemessen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Messung auch in sehr trüben Medien möglich ist. Der BioView[®] ist dabei über Flüssiglichtleiter mit dem Reaktor verbunden, der Sensorkopf wird an einen 25mm-Standardport gekoppelt, in dem ein speziell angefertigter Stutzen mit Quarzglasscheibe die Sterilität des Prozesses garantiert und eine nicht-invasive Prozessbeobachtung ermöglicht.

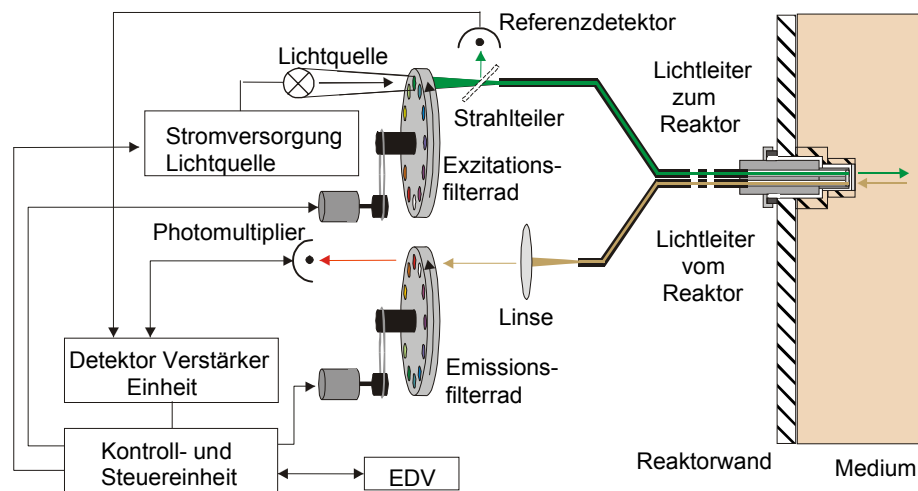


Abbildung 3.1.1.: Schematischer Aufbau des BioView®-Sensors [Schweder, 2001]

Durch die Aufnahme eines 2D-Fluoreszenzspektrums werden verschiedene Analyte simultan erfasst. Da die Fluoreszenzintensität nicht nur von der Konzentration sondern auch von physikalischen und chemischen Wechselwirkungen im Reaktor und gerätespezifischen Größen abhängig ist, werden mit dem BioView® lediglich relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) gemessen. Die Fluorophore werden anhand der Lage ihrer Absorptions- und Fluoreszenzmaxima charakterisiert, wobei im realen Medium zumeist leichte Abweichungen von den Literaturwerten gefunden werden. In Abbildung (3.1.2.) ist beispielhaft der Kontourplot des 2D-Spektrums einer Hefe-Kultivierung gezeigt, und Tabelle (3.1.1.) enthält die dazu gehörigen Literaturdaten der wichtigsten biogenen Fluorophore.

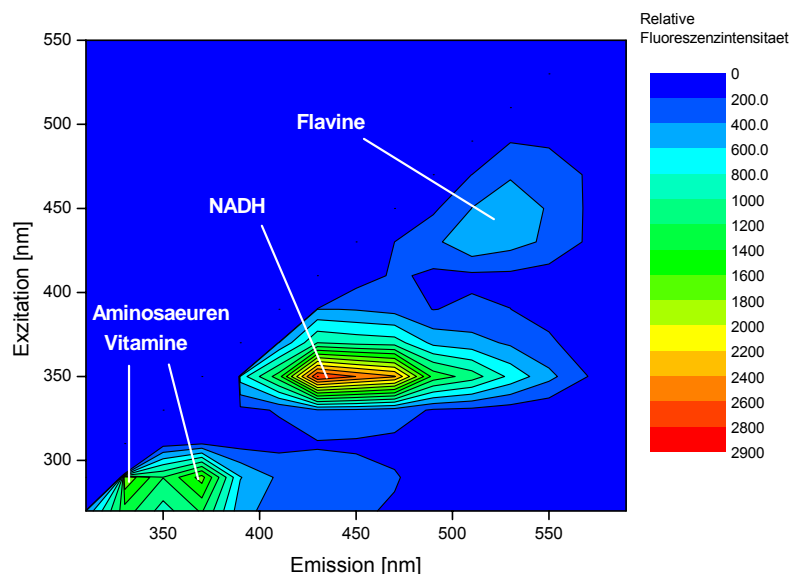


Abb. 3.1.2.: Exemplarischer Kontourplot des 2D-Spektrums einer Hefe-Kultivierung

Tab. 3.1.1.: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima biogener Fluorophore laut Literatur

Fluorophor	ex/em [nm]
NADH	340/460 [Guilbault, 1973]
Pyridoxin	324/390 [Fasman, 1976]
Tryptophan, Tyrosin	287/348 [Wolfbeis, 1985]
Flavine FAD	370/520
FMN	450/520 [Wolfbeis, 1985]

Im Vergleich zum BioView[®] ist das Fluoreszenz-Spektralphotometer **F-4500** (schematischer Aufbau siehe Abb. (3.1.3.)) ein Laborgerät und für den industriellen Einsatz nicht robust genug. Die Wellenlängen von Exzitation und Emission werden unabhängig voneinander mit Hilfe eines Gittermonochromators (Konkavgitter mit 900 Linien/mm) mit wählbarer Spaltbreite (2,5 nm; 5 nm; 10 nm oder 20 nm) eingestellt. Um Intensitätsschwankungen an der Lichtquelle auszugleichen, wird ein Teil des Anregungslichts auf einen Referenz-photomultiplier gelenkt, und ein Verschluss (shutter) sorgt dafür, dass die Probe nicht ständig angeregt wird.

Der Vorteil gegenüber dem BioView[®] besteht in der höheren Sensitivität. Zudem lassen sich die Wellenlängen beliebig wählen, so dass das F-4500 für grundlegende Untersuchungen zu bevorzugen ist.

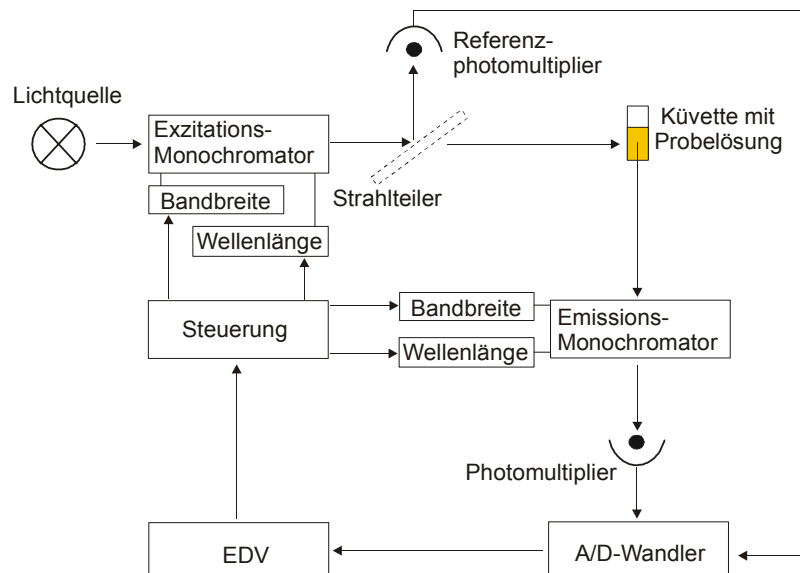


Abb. 3.1.3.: Funktionsschema des F-4500 (Hitachi, Japan)

3.2. Chemometrie

Die Auswertung der Spektren und die Erstellung der Modelle werden mit der Software The Unscrambler[®], v7.6 SR-1, der Firma CAMO ASA, Norwegen, durchgeführt. Die Fluoreszenzspektren werden durch PLS-Regression mit den Offline-Größen korreliert. Bei sämtlichen Kultivierungsexperimenten werden zu Beginn drei Nullspektren aufgenommen und deren Mittelwert von den Verlaufsspektren subtrahiert. Anschließend werden die Spektren aus je 150 Wellenlängenkombinationen entsprechend Abbildung (2.1.2.1.) (Kapitel (2.1.2.)) in einer Datenmatrix angeordnet und zusammen mit den Offline-Größen in den Unscrambler[®] eingelesen.

3.2.1. PLS-Modelle

Wie in Kapitel (2.1.2.) erläutert, werden bei der PLS-Regression die Y-Variablen als abhängige Antwortgrößen direkt bei der Dekomposition der X-Daten berücksichtigt. Der Unscrambler[®] arbeitet mit dem NIPALS-Algorithmus, als Validierung wird eine zufällige Kreuzvalidierung gewählt. Die Modelle werden nach PLS1 erstellt, d.h., es wird jeweils nur eine Prozessgröße berücksichtigt und die maximale Anzahl an zu berechnenden Hauptkomponenten wird auf 10 begrenzt. In Abbildung (3.2.1.1.) ist die Beziehung der Datenmatrizen noch einmal schematisch dargestellt.

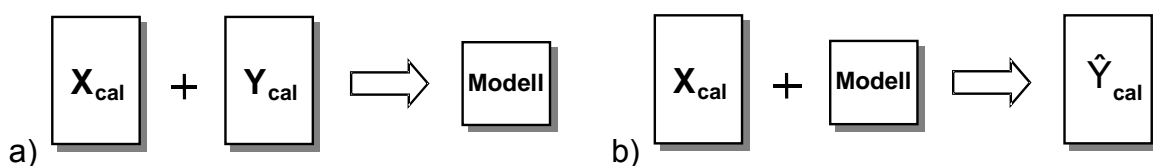


Abb. 3.2.1.1.: Schema der Erstellung eines PLS-Regressionsmodells

a) Erstellung des Modells aus X- und Y-Matrix

b) Vorhersage der Y-Daten aus X-Daten durch das Modell

Die Güte des Modells kann am einfachsten aus der Auftragung der gemessenen Y-Werte gegen die vorhergesagten Y-Werte und aus dem Bestimmtheitsmaß r^2 abgelesen werden, wobei $r^2 = 1$ eine totale Übereinstimmung bedeutet. Der Unscrambler[®] berechnet weitere Größen zur Beurteilung der Regression automatisch.

Die Residualwerte E oder F (Gleichung (3.2.1.1.)) geben Auskunft darüber, wie hoch der Anteil an Information für jedes X-Objekt (Spektrum) ist, der nicht zum Modell beiträgt, bzw. wie gut ein spezieller Y-Wert durch das Modell beschrieben wird.

$$E = X - X_{\text{modellled}} \quad \text{und} \quad F = Y - Y_{\text{predicted}} \quad (3.2.1.1.)$$

Ein Maß dafür, wie gut das Modell die Vorhersage bewerkstelligt, sind die durch die Hauptkomponenten erklärten sowie die übrig bleibenden Varianzen der Kalibration und der Vorhersage (**explained** und **residual variances**). Mit dem Unscrambler[®] lassen sich sowohl die explained variance als auch die residual variance für jede Hauptkomponente darstellen. Über diese Auftragung lässt sich bestimmen, wie viele Hauptkomponenten für das Modell benötigt werden. Diese Varianzen lassen sich für die X-Objekte und für die Y-Variablen berechnen. Je höher die erklärte bzw. je niedriger die verbleibende Varianz ist, desto genauer wird eine Variable durch das Modell beschrieben bzw. vorhergesagt.

Die Residualwerte werden als quadratische Mittel der Abweichungen vom Mittelwert berechnet und in verschiedenen Fehlerwerten zusammengefasst. Für n Y-Daten gilt für die Residualvarianz **ResVar** :

$$ResVar = \frac{\sum (\hat{Y}_{cal} - Y_{cal})^2}{n} \quad (3.2.1.2.)$$

Die Wurzel aus der Residualvarianz der Y-Daten wird als **RMSEC** (Root mean square error of calibration) bezeichnet. Er stellt den durchschnittlichen Modellfehler bei der Kalibration (*cal*) dar und wird in der Einheit der Y-Daten ausgedrückt.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, cal} - Y_{i, cal})^2}{n}} \quad (3.2.1.3.)$$

Der Fehler der Vorhersage, der durch die Validierung (*val*) bestimmt wird, ist der **RMSEP** (Root mean square error of prediction) und wird ebenfalls in der Einheit der Y-Daten ausgedrückt (Gleichung (3.2.1.4.)). Hierbei ist zu beachten, dass die berechneten und vorhergesagten Y-Werte im Klammerausdruck zum Testset gehören und nicht zur Erstellung des Modells verwendet wurden.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, val} - Y_{i, val})^2}{n}} \quad (3.2.1.4.)$$

Zwei weitere Fehlergrößen in Zusammenhang mit dem RMSEP sind **Bias** und **SEP** (Standard error of prediction). Der *Bias* repräsentiert die gemittelte Abweichung zwischen vorhergesagten und gemessenen Y-Werten im Validierungsset und gibt auch Auskunft darüber, ob eine systematische Abweichung zwischen Kalibrations- und Validierungsset besteht. Ist dies nicht der Fall, geht der *Bias* gegen Null.

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, val} - Y_{i, val})}{n} \quad (3.2.1.5.)$$

Der SEP beschreibt die Variation in der Vorhersagegüte über mehrere Messungen als Standardabweichung der Residualwerte korrigiert um den *Bias*:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, val} - Y_{i, val} - Bias)^2}{n-1}} \quad (3.2.1.6.)$$

Über die Beziehung

$$RMSEP^2 \approx SEP^2 + Bias^2 \quad (3.2.1.7.)$$

wird ersichtlich, dass bei guten Modellen ($bias \rightarrow 0$) der RMSEP dem SEP entspricht. Über den RMSEP können z.B. Datenausreißer (hoher SEP) sowie systematische Fehler in der Modellerstellung und Datenstruktur (Bias) erkannt werden.

3.2.2. Savitzky–Golay-Filter

Der Unscrambler[®] verwendet zur Glättung der spektroskopischen Daten verschiedene Filter. Eine effektive Möglichkeit, die in dieser Arbeit auch separat angewendet wird, ist der Savitzky-Golay-Filter. Er summiert jeden Punkt x eines Graphen mit den Punkten seiner Umgebung, wobei jeder Wert mit einem bestimmten Koeffizienten c gewichtet wird. Das Ergebnis wird anschließend durch die Summe der Koeffizienten geteilt.

$$x_k^* = \frac{1}{\sum c_i} \sum_{i=-m}^{i=m} c_i \cdot x_{k+i} \quad (3.2.2.1.)$$

Die Koeffizienten sind für verschiedene Filterbreiten tabelliert und im Anhang (10.11.) aufgeführt.

3.3. Cytometrie

Die Durchflusscytometrie ist ein optisches Analysenverfahren zur Messung suspendierter Partikel (z.B. Zellen). Durch die Detektion von Streulicht und Fluoreszenz können so verschiedene Parameter von Mikroorganismen bestimmt werden. Die Messungen werden von A. Burzlaff mit dem Cytometer Epics XL (Fa. Beckmann Coulter, USA) durchgeführt, dessen Aufbau schematisch in Abbildung (3.3.1.) gezeigt ist.

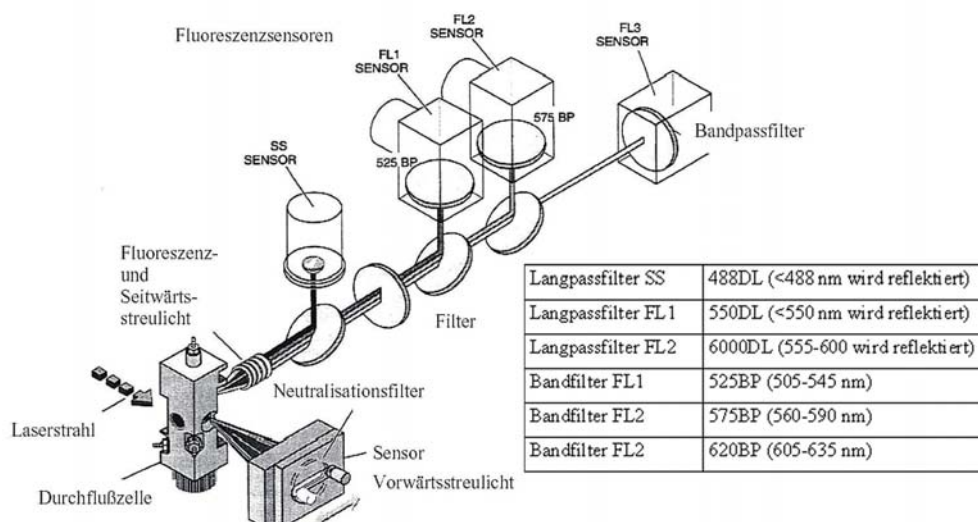


Abb. 3.3.1.: Schematischer Aufbau des Cytometers Coulter Epics XL [nach Coulter, 1996]

Die Zellsuspension wird in einem Hüllstrom aus Pufferlösung mit Überdruck in die Durchflusszelle gepresst. Durch die laminare Fokussierung gelangen die Zellen einzeln in den Analysenbereich, wo sie von einer orthogonal angeordneten Lichtquelle erfasst werden. Bei dem Coulter Epics XL wird hierzu ein Argon-Ionenlaser (Emission 488 nm) eingesetzt.

Durch die Messung des Streulichts können Größe, Größenverteilung und Morphologie der Zellen bestimmt werden. Über die Detektion des Vorwärtsstreulichts (Front scattered, FSC), das direkt in Einstrahlrichtung hinter der Durchflusszelle gemessen wird, kann nach Kalibration mit Partikeln bekannter Größe die Zellgröße bestimmt werden. Das Seitwärtsstreulicht (Side scattered, SSC) wird senkrecht zur Einstrahlrichtung detektiert; es ist abhängig von der Partikelstruktur und gibt Auskunft über die Morphologie [Rieseberg, 2000].

Ebenfalls senkrecht zur Einstrahlrichtung befinden sich die drei Fluoreszenzdetektoren. Durch Anfärbung der Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich Aussagen über Zellinhaltsstoffe, wie beispielsweise DNA, RNA, Proteine und Lipide, treffen. Die Auskopplung des emittierten Fluoreszenzlichts erfolgt über dichroitische Langpassfilter, die Detektion durch Photomultiplier. In der Regel erfolgt die Auswertung über die Peakhöhe. Durch Kombination geeigneter Farbstoffe ist entsprechend der Anzahl an Sensoren eine gleichzeitige Bestimmung mehrerer Parameter möglich. Durch die hohe Messrate von bis zu 4000 Zellen/s liefert die durchflusscytometrische Untersuchung einen schnellen Überblick über die statistische Verteilung der Messgrößen [Burzlaff, 2004].

In dieser Arbeit werden mit Proben von synchronen *S. cerevisiae*-Kulturen Zellzyklusanalysen durchgeführt sowie der Gesamtproteingehalt und die Neutrallipide bestimmt.

Die einzelnen Zellzyklusphasen können über die in den Zellen enthaltene DNA bestimmt werden, die während des Zellzyklus zunimmt. Dazu wird die DNA quantitativ mit Sytox Green angefärbt, einem selektiv bindenden DNA-Farbstoff. Dieser besitzt im Vergleich zu anderen DNA-Farbstoffen eine hohe Quantenausbeute und ist daher besonders für Organismen mit kleinem Genom, wie z.B. Hefen, geeignet. Vor der Färbung muss die RNA durch Zusatz von RNase zerstört werden, da Sytox Green auch an diese bindet.

Zur Markierung der Proteine wird Fluorescein-Isothiocyanat eingesetzt, das mit primären Aminen unter Bildung eines Thioharnstoff-Derivats reagiert. Da die Proteine nicht homogen angefärbt werden, ist keine quantitative Bestimmung möglich.

Neutrallipide (v.a. Triglyceride, Sterolester) sind Speicherstoffe der Zelle und Bestandteile der Zellmembran und Zellwand. Ihr Gehalt ist von der Zellzyklusphase abhängig. Zur Markierung wird der Farbstoff BODIPY 493/503 eingesetzt, der eine sehr hohe Selektivität bezüglich der unpolaren Lipide besitzt.

Die genauen Prozeduren zur Probenvorbereitung sind im Anhang (10.8.) aufgeführt. Nachfolgend ist in Tabelle (3.3.1.) eine Übersicht über die Stoffdaten der eingesetzten Fluorophore gegeben.

Tab. 3.3.1.: Stoffdaten der eingesetzten Fluorophore [Burzlaff, 2004]

	Sytox Green	FITC	Bodipy 493/503
Molekulargewicht [g/mol]	600	389,38	262,11
Lösungsmittel	DMSO	DMSO	DMSO
Exzitation [nm]	504	494	493
Emission [nm]	523	518	503
Quantenausbeute	0,53	0,9	0,9
Absorptionskoeffizient [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]	67000	68000	80000

3.4. In-situ Mikroskopie

Die In-situ Mikroskopie ermöglicht als bildgebendes Verfahren die Online-Bestimmung so wichtiger Parameter wie der Biomasse, der Zellzahldichte und der Zellmorphologie. Das verwendete In-situ Mikroskop mit Durchlicht-Hellfeld-Technik wurde 2000 von *Frerichs* am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelt und wird in dieser Arbeit bei den synchronen *S. cerevisiae*-Kultivierungen eingesetzt.

Das System besteht aus dem Mikroskop (Abbildung (3.4.1.)), einer Regeleinheit, einem PC zur Digitalisierung und Prozesskontrolle sowie der Bildauswertungssoftware [Brückerhoff et al., 2004].

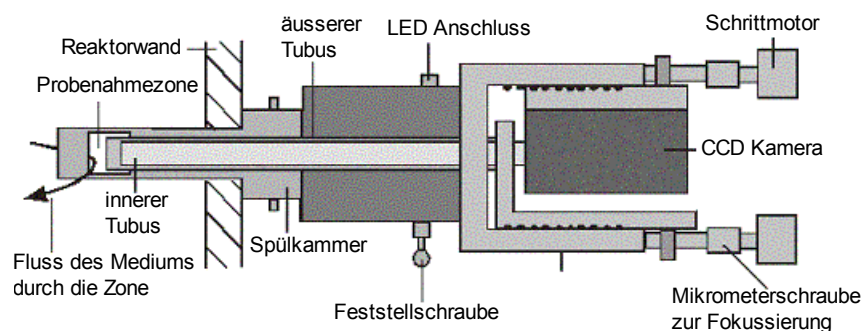


Abbildung 3.4.1.: Aufbau des In-situ Mikroskops [nach Brückerhoff, 2004]

Das In-situ Mikroskop wird über einen 25 mm Standardport in den Reaktor eingebaut und ist modular aufgebaut. Die sensiblen Optik- und Elektronikelemente sind durch einen robusten äußeren Edelmantel geschützt, so dass das

Mikroskop (ohne CCD Kamera und hinterer Optikeinheit) mit dem Reaktor autoklaviert werden kann.

Das Medium fließt während der Kultivierung kontinuierlich durch die Messzone (Sichtfeld 220 x 220 µm), wodurch die Messungen jederzeit repräsentativ für den Gesamtzustand der Kultur sind. Die passierenden Zellen werden bei 400facher Vergrößerung von der CCD Kamera erfasst und hinsichtlich Zellzahl, Einzel- und Doppelzellen ausgewertet. Die Höhe der Messzone und damit das Volumen werden entsprechend der Durchflussgeschwindigkeit (abhängig von der Rührerdrehzahl) des Mediums angepasst, um qualitativ gute Bilder zu erhalten. Pro Messung werden 20 Bilder aufgenommen, ausgewertet und die Resultate anschließend gemittelt. Die Messungen mit dem In-situ Mikroskop werden von *T. Brückerhoff* durchgeführt.

3.5. DNA-Chiptechnologie

Die DNA-Chiptechnologie, auch als DNA-*microarray*-Technologie bezeichnet, erlaubt die parallele und semiquantitative Expressionsanalyse einer Vielzahl von Genen bzw. ganzer Genome. In dieser Arbeit wird die zellzyklusabhängige Genexpression bei synchronen *S. cerevisiae*-Kulturen untersucht. *S. cerevisiae* war der erste vollständig durchsequenzierte Eukaryont und ist nach wie vor das primäre Modellsystem zur Untersuchung molekularbiologischer Mechanismen [Wilgenbus und Lichter, 1999].

Ein DNA-Chip besteht aus einem festen Träger (zumeist modifizierte Glasoberflächen), auf dem an exakten Positionen einzelsträngige DNA-Sequenzen, so genannte DNA-Sonden, entweder durch Licht gesteuerte Kupplungsreaktionen oder durch spezielle Micro-Arrayer aufgetragen werden. Als Sonden kommen cDNA-Fragmente, PCR-generierte Amplikons oder synthetische Oligonucleotide in Betracht. Letztere bieten mit einer Länge von 20 bis 70 Nucleotiden neben der Messung der Anwesenheit und der Menge von Transkripten auch die Möglichkeit der Detektion von Sequenzvarianten (Mutationen und Polymorphismen). Die zu untersuchende RNA wird während einer reversen Transkription fluoreszenzmarkiert und auf dem Chip hybridisiert. Mit einem speziellen Laserscanner werden die hybridisierten DNA-Chips anschließend in den den Fluorophoren entsprechenden Farbkanälen gelesen. Aus der gemessenen Intensität und Position der Spots lassen sich Rückschlüsse auf die Art und Aktivität der Gene in der Probe ziehen. Abbildung (3.5.1.) zeigt schematisch den Ablauf der Hybridisierung auf dem DNA-Chip.

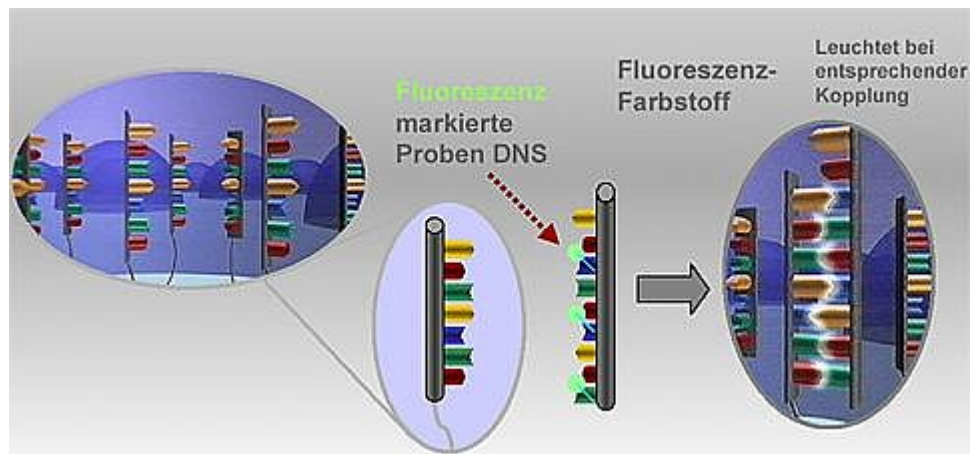


Abb. 3.5.1.: Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA auf einem DNA-Chip [Bioinformation, 2004]

Zur Vorbereitung des Chip-Experiments wird die RNA aus Zellproben unterschiedlicher Zellzyklusphasen (S und G2/M) isoliert und durch Reverse Transkription in cDNA überführt. Die Reverse Transkription wird mit OligodT-Primern initiiert. Gleichzeitig werden die Proben mit den Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffen FluoroLinkTM-Cy3-dCTP (Probe der S-Phase) und FluoroLinkTM-Cy5-dCTP (Probe der G2/M-Phase) markiert und vice versa (common reference design), zwei hoch fluoreszenten und wasserlöslichen Fluorophoren (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg). Cy3 zeigt Fluoreszenz im roten Bereich des sichtbaren Lichts (Emission bei 560 nm), Cy5 im blauen Bereich (Emission bei 670 nm). Zur Bestimmung des Expressionsprofils wird der Pan[®] Yeast Array-Chip der Firma MWG Biotech, Ebersberg, eingesetzt, der 6250 genspezifische Oligonukleotide umfasst, die das komplette Hefegenom repräsentieren.

Beide Proben werden gleichzeitig auf einem Chip hybridisiert. Die genauere Prozedur ist im Anhang (10.9.) aufgeführt. Der Chip wird mit dem Array Scanner 428TM (Affymetrix Inc., USA) unter Verwendung der Software Affymetrix JaguarTM Image Processing eingescannt. Die Isolierung der RNA und die Chiphybridisierung werden im Arbeitskreis von *S. Buchholz* und *Dr. F. Stahl* durchgeführt.

Das Expressionsmuster zeigt anhand der Intensität die Aktivität der entsprechenden Gene und anhand der Farbe bzw. Mischfarbe der Spots, welche Gene in welcher Zellzyklusphase exprimiert werden. Die Ergebnisse werden als Histogramm dargestellt, aus dem die Stärke der Regulation der einzelnen Gene nach Häufigkeit hervorgeht, sowie als Scatterplot, in dem die beiden Proben gegeneinander aufgetragen werden. Im Scatterplot lassen sich bestimmte Gene den einzelnen Zellzyklusphasen zuordnen.

3.6. Fließinjektionsanalyse

Die Glucosemessung bei den *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen erfolgt online durch ein Fließinjektionssystem. Das Grundprinzip der Fließinjektionsanalyse (FIA), die Mitte der siebziger Jahre von *Ruzicka* und *Hansen* vorgestellt wurde, beruht auf der Injektion eines definierten Probenvolumens in einen kontinuierlichen Trägerstrom. Dieser transportiert die Probe zur nachgeschalteten Reaktionszone und die Reaktionsprodukte weiter zu einem Detektorsystem. Ein FIA-System besteht im Wesentlichen aus einem Selektor, einer Peristaltikpumpe sowie einem Injektor, kann aber je nach Bedarf um verschiedene Bauteile beispielsweise zur Probenbearbeitung erweitert werden. Durch die Automatisierung lassen sich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Analyse erhöhen, weiterhin ist im Fließsystem keine Gleichgewichtseinstellung nötig, so dass bei nur geringen Probenmengen kurze Antwortzeiten resultieren [Weigel, 1995].

In dieser Arbeit wird ein FIA-System der Firma ANASYSCON Instrumentelle Analysetechnik, Hannover, verwendet (Injektor und Selektor (Knauer, Berlin; Pumpe (SciLog Masterflex, USA)). Sowohl zur Steuerung der Module als auch zur Datenerfassung und Auswertung dient die Software CAFCA (Computer Assisted Flow Control & Analysis) der Firma ANASYSCON Instrumentelle Analytik, Hannover. Der Aufbau der hier verwendeten FIA-Anlage ist schematisch in Abbildung (3.6.1.) dargestellt.

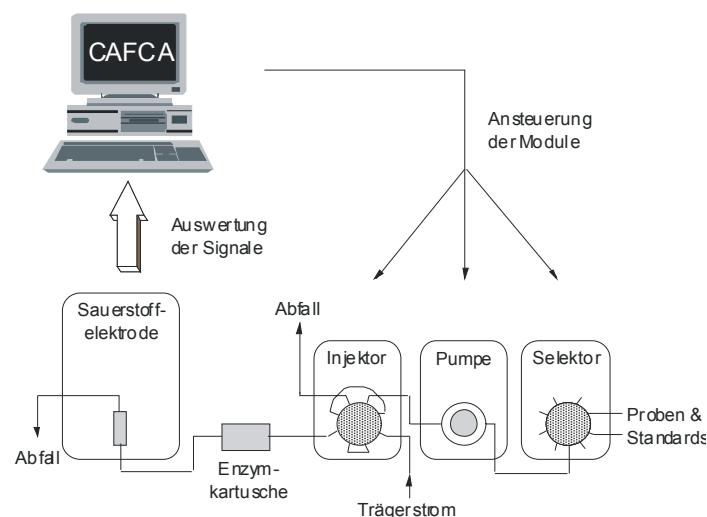


Abb. 3.6.1.: Schematischer Aufbau des Fließinjektionssystems zur Glucosebestimmung

Die zellfreie Probenahme wird durch ein Probenahmemodul (Modell FISP E19-01, Flownamics Analytical Instruments Inc., USA) gewährleistet, das in den Reaktordeckel eingebaut wird.

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgt durch Umsetzung mit 100 Units Glucoseoxidase (GOD), die in der Enzymkartusche auf einem Polymerträger immobilisiert wird. GOD dehydriert Glucose zum Gluconolacton, welches anschließend spontan zur Gluconsäure hydrolysiert:

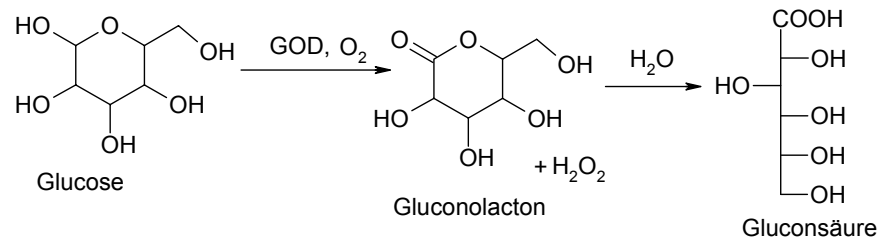


Abb. 3.6.2.: Enzymatischer Glucoseabbau mit Glucoseoxidase

Der bei dieser Reaktion auftretende Sauerstoffverbrauch ist proportional zur Glucosekonzentration und wird amperometrisch mit einer Clark-Elektrode gemessen. Aufgrund des Einflusses der variierenden Gelöstsauerstoffkonzentration im Kulturmedium und damit in der Probe wurde nach jeder dritten Glucosemessung ein Blindwert bestimmt und dieser anschließend von den Glucosemesswerten abgezogen [Hüll, 2002]. Während der Fedbatch-Kultivierungen werden alle 2 min Messwerte aufgezeichnet. Die Kalibration der FIA erfolgt mit Standards der Konzentration 0 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L und 125 mg/L. Die Zusammensetzung des FIA-Puffers, der zum Ansetzen der Standards und als Trägerstrom verwendet wird, ist in Anhang (10.6.5.) angegeben. Die FIA-Messungen werden von *D. Hüll* durchgeführt.

4. Synchroner *S. cerevisiae* – Kulturen

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist das wichtigste eukaryontische Modellsystem hinsichtlich der Aufklärung von Metabolismus und Biosynthese. Ein generelles Problem bei der Untersuchung zellzyklusabhängiger Mechanismen ist die Asynchronität einer Kultur. In Batch-Kulturen liegt eine Verteilung von Zellen verschiedenen Alters und verschiedener Größe vor, dementsprechend ist es hier zur Untersuchung des Zellzyklus notwendig, einzelne Subpopulationen der Kultur zu isolieren [Spellman und Sherlock, 2004]. Eine elegante Methode, dieses aufwendige Verfahren zu umgehen, basiert auf dem Phänomen, dass bei Hefen in kontinuierlicher Kultur synchrones Wachstum induziert werden kann, wodurch es möglich wird, die Kultur als Gesamtheit hinsichtlich zellzyklusabhängiger Vorgänge zu untersuchen. Der Zellzyklus und Stoffwechsel der in dieser Arbeit verwendeten Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Wildtyp H620 sowie vorgeschlagene Mechanismen des synchronen Wachstums werden im Folgenden erläutert, bevor die Ergebnisse der durchgeführten Experimente dargestellt werden.

4.1. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1. Zellzyklus

Hefezellen durchlaufen je nach Umweltbedingungen verschiedene Zellzyklen. Unter guten Bedingungen liegen diploide Zellen vor, die sich vegetativ durch Sprossung vermehren. Bei schlechten Bedingungen kann aber auch eine meiotische Teilung eingeleitet werden. Die diploiden Zellen formen in diesem Fall 4 haploide Ascosporen, die nach ihrer Freisetzung aus der Mutterzelle durch Zellteilung Einzelkolonien bilden. Jede Einzelzelle gehört einem der beiden Paarungstypen (eng. "*mating types*") a oder α an. Beim Übergang zum diploiden Zustand verschmelzen zwei Zellen unterschiedlicher Paarungstypen und bilden eine Zygote, die sich weiter vegetativ vermehrt. Sowohl der haploide als auch der diploide Zustand ist über längere Perioden überlebensfähig [Wickner, 1991].

Die Zellteilung durch Sprossung verläuft in mehreren Phasen. Der schematische Ablauf ist in Abbildung (4.1.1.1.) zu sehen.

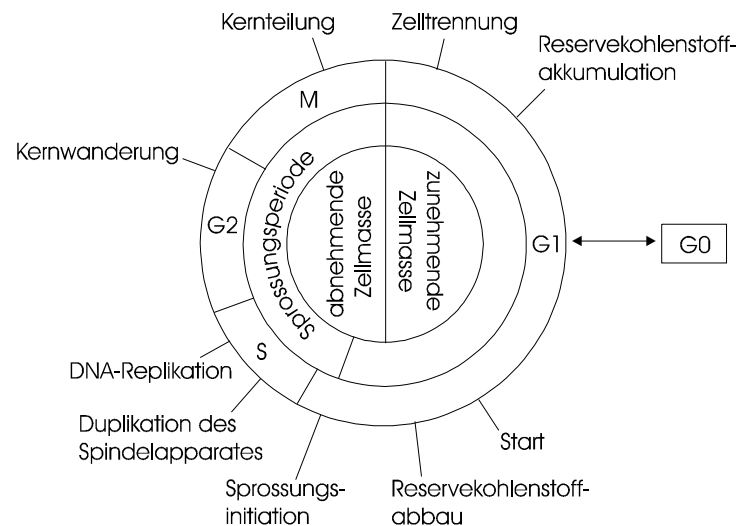


Abbildung 4.1.1.1.: Zellzyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Der Zellzyklus beginnt mit der G1-Phase (engl. "gap"), einer Phase hoher Stoffwechselaktivität, in der Reservekohlenstoffe akkumuliert werden und Zellwachstum stattfindet. Der Übergang zwischen den einzelnen Zyklusphasen ist durch Restriktionspunkte markiert, mit Überschreiten des *Start*-Punktes beginnt die Synthese (S-)-Phase. In dieser findet die Verdopplung der Chromosomen statt. Es folgt ein weiterer stoffwechselaktiver Abschnitt bis zur Zellteilung, die G2-Phase. Die DNA-Replikation ist abgeschlossen, und die Zelle tritt mit Übergang in die M-Phase in die Mitose ein. Nach der Kernteilung erfolgt die Trennung in Mutter- und Tochterzelle, und ein neuer Zyklus beginnt. Die Dauer der einzelnen Phasen ist in jedem Zyklus identisch, lediglich die Dauer der G1-Phase variiert, da hier die Umweltbedingungen (z.B. Nährstoffangebot) eine große Rolle spielen. Zellen, die sich längere Zeit nicht mehr teilen, befinden sich in der G0-Phase. Der Übergang zwischen G0 und G1 ist reversibel, erst mit Überschreiten des *Start*-Punktes ist die Zelle irreversibel auf die Beendigung des begonnenen Zyklus' festgelegt. Neben dem *Start*-Punkt befinden sich weitere Restriktionspunkte am Beginn und Ende der M-Phase. Die Überschreitung dieser Kontrollpunkte wird durch komplizierte Regulationsprozesse gesteuert. Dabei spielt eine Reihe von Enzymen eine wesentliche Rolle. Der Eintritt in die Synthesephase wird beispielsweise durch die Proteinkinase *cdc28* (*c*ell-*d*ivision *c*ycle) (in Verbindung mit Cyclin) gesteuert, deren Aktivität durch Phosphorylierung reguliert wird und die einen direkten Einfluss auf andere zellzyklusregulierende Proteine ausübt. An den Restriktionspunkten wird in jedem Zyklus sichergestellt, dass die vorhergehende Zellzyklusphase abgeschlossen ist und ausreichende Bedingungen für den Eintritt in die nächste Phase vorliegen [Hennig, 1998; Stryer, 1996].

4.1.2. Stoffwechsel

Saccharomyces cerevisiae ist ein fakultativer Organismus, der Kohlenstoffquellen sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen assimilieren kann. Das bevorzugte Substrat ist Glucose, die in der Glycolyse zu Brenztraubensäure (Pyruvat) umgewandelt wird. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat im Citratzyklus oxidativ weiter zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut. Die Elektronencarrier NAD^+ und FAD werden zu NADH und FADH_2 reduziert. In der sich anschließenden oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) werden die Carrier NAD^+ und FAD zurückgebildet. Die Ausbeute bei rein oxidativem Stoffwechsel liegt ca. bei 0,5 g Biotrockemasse pro Gramm Glucose [Matthews und Webb, 1991]. Unter anaeroben Bedingungen wird das gebildete Pyruvat fermentativ über Acetaldehyd zu Ethanol abgebaut (Gärung). Ethanol ist ein energiereiches Produkt, die Energieausbeute des aeroben Glucoseabbaus ist demnach höher als des anaeroben, die Ausbeute sinkt bei letzterem auf ca. 0,15 g Biotrockemasse pro Gramm Glucose [Woehrer und Roehr, 1981].

Fermentatives Wachstum tritt nur unter strikt anaeroben Bedingungen auf, doch auch unter aeroben Bedingungen wird unter bestimmten Bedingungen Ethanol produziert (oxidoreduktives Wachstum). Welcher Stoffwechselweg beschritten wird, hängt zum einen vom Sauerstoff- und Substratangebot ab, zum anderen von der begrenzten Atmungskapazität der Zellen [Sonnleitner und Käppeli, 1986].

Bei hohen Gelöstsauerstoff-Konzentrationen wird die Gärung aufgrund des *Pasteur-Effekts* inhibiert [Fiechter et al., 1981]. Der Pasteur-Effekt beruht auf der Hemmung der Phosphofruktokinase (Schrittmacherenzym der Glykolyse) durch Citrat und ATP. Der Kohlenstoffdurchsatz, der bei der Gärung deutlich höher ist als bei der Atmung wird dadurch drastisch gesenkt und das gebildete Pyruvat bevorzugt über den Citratzyklus abgebaut, wodurch die Energieausbeute maximiert wird [Dickinson, 1991].

Durch die begrenzte Atmungskapazität der Hefezellen wird andererseits oberhalb einer kritischen Glucosekonzentration Ethanol angereichert. Dieses Phänomen ist als *Crabtree-Effekt* bekannt und wurde bereits 1966 von *de Dekken* beschrieben. Glucose kann nur bis zu einer kritischen Glucoseaufnahme rate oxidativ verstoffwechselt werden, oberhalb dieser folgt die Umstellung auf oxidoreduktiven Stoffwechsel. Überschüssige Glucose wird reduktiv zu Ethanol abgebaut. Die kritische Glucoseaufnahme rate ist abhängig vom Stamm, der Mediumzusammensetzung und vom Sauerstoffangebot. Der Crabtree-Effekt, auch als Bottleneck-Prinzip oder Overflow-Metabolismus bezeichnet, beruht vermutlich darauf, dass durch hohe Glucosekonzentrationen die Transkription einer Reihe von Genen reprimiert wird, die Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklus codieren (Katabolitrepession) [Gancedo, 1998].

4.1.3. Synchrones Wachstum

Zellen in kontinuierlicher Kultur sind ein probates System zur Untersuchung von Stoffwechsel und Zellzyklus, da sie unter wohl definierten Wachstumsbedingungen im Chemostat-Betrieb unbeeinflusst reproduzierbare Zellzyklen durchlaufen. Eine Besonderheit kontinuierlicher *S. cerevisiae*-Kulturen ist die Fähigkeit zum synchronen Wachstum, d.h., ein Großteil der Zellen durchläuft den Zellzyklus gleichzeitig. Je nach Wachstumsmodus, der dem Verhältnis der Zyklusdauer der Mutterzellen zur Zyklusdauer der Tochterzellen entspricht, kann eine Synchronität von bis zu 61,8 % (Wachstumsmodus 1.2) erreicht werden [Beuse, 1997].

Synchrones Wachstum zeigt sich in Oszillationen fast sämtlicher Prozessvariablen (extra- und intrazellulär). Diese Oszillationen können über viele Generationen erhalten bleiben und enden gewöhnlich nur durch eine Störung des Systems bzw. bei Nährstoffmangel [Strässle et al., 1989]. Die Periodenlänge nimmt mit zunehmender Verdünnungsrate ab, dementsprechend erhöht sich die Frequenz [Biol et al., 2000]. Beobachtet werden solche Oszillationen bei Sauerstoffpartialdrücken von 0 bis 90 % und Verdünnungsraten zwischen 0,025 und 0,2 h⁻¹ [Parulekar et al., 1986; Martegani et al., 1990; Beuse, 1998].

Synchrones Wachstum tritt teilweise spontan auf, muss allerdings in vielen Fällen initiiert werden, beispielsweise durch einen Substratshift bzw. -puls. Als Substrat eignen sich diverse Kohlenstoffverbindungen, die von den Hefezellen assimiliert werden können (z.B. Glucose, Ethanol). In vielen Fällen kann sich eine vorausgehende Hungerphase positiv auf die Initiierung auswirken.

Obgleich oszillierende Hefen heutzutage vielfach untersucht worden sind, sind Mechanismus und Ursachen des synchronen Wachstums nach wie vor nicht bewiesen. Die Oszillationen werden zum Teil basierend auf segregierten Zellpopulationen als Folge des 'asynchronen Sprossungszyklus' der Hefen interpretiert [Bellgardt, 1994; Chen und McDonald, 1990; Hjortso, 1996].

Das Verständnis der Mechanismen, die Oszillationen hervorrufen bzw. verhindern, ist industriell gesehen wichtig hinsichtlich der Züchtung geeigneter Stämme und der Prozessoptimierung [Zhang et al, 1996; Patnaik, 2003]. Die Erstellung von Modellen zum synchronen Wachstum erweist sich als schwierig, da intrazelluläre Kinetiken in Kombination mit extra- und intrazellulären Transportprozessen erklärt werden müssen und das Wissen in diesem Bereich nach wie vor begrenzt ist. Quantitative Beschreibungen der Oszillationen beziehen sich vorrangig auf intrazelluläre Phänomene oder auf makroskopisch messbare Variablen wie Zellmasse, Substratkonzentration und Sprossungsverhalten. *Teusink et al.* (2000), *Wolf et al.* (2001) und *Reijenga et al.* (2002) erklären die Oszillationen basierend auf intrazellulären Kinetiken ohne extern gesteuerte Transportprozesse. Das

Modell von *Wolf et al.* beispielsweise beinhaltet die drei Stoffwechselwege Sulfat-Assimilation, Ethanol-Abbau und Atmung. Cystein wird hier als Regulator der Sulfat-Aufnahme beschrieben, und die Hinderung derselben als Hauptursache für die Oszillationen gesehen. Zusätzlich inhibiert die Diffusion von H_2S in der Zelle die Atmung, und der Ethanol-Stoffwechsel ist über Sulfit und Redox-Gleichgewichte abhängig von der Sulfat-Assimilation [Sohn et al., 2000]. Das resultierende Modell ist sehr komplex und erfordert viele vereinfachende Annahmen.

Eine zweite Klasse von Modellen bringt messbare Prozessvariablen in Verbindung mit intrazellulären Reaktionsfolgen. Ein Großteil dieser Erklärungsversuche basiert auf Feedback-Effekten als Ursache für die Oszillationen [Martegani et al., 1990; Parulekar et al., 1986; Porro et al., 1988]. Ist zu Beginn genügend Glucose im Medium vorhanden, findet oxidoreduktiver Stoffwechsel statt, und Ethanol reichert sich an. Die Glucosekonzentration sinkt solange, bis rein oxidativer Stoffwechsel stattfindet, Ethanol wird parallel verbraucht, wodurch die Glucosekonzentration wieder ansteigt und ein neuer Oszillationszyklus beginnt. Diese Theorie kann jedoch nicht erklären, dass Oszillationen auch in Abwesenheit von Glucose mit anderen Substraten auftreten [Keulers und Kuriyama, 1998].

Die Rolle der Synchronisation von Zellpopulationen bei der Entstehung von Oszillationen wird ebenfalls diskutiert. *Porro et al.* [1988] und *Martegani et al.* [1990] definieren zwei kritische Zellgrößen P für die Sprossung (P_s) und für die Zellteilung (P_m), deren Quotient P_m/P_s vom Substratangebot abhängt. Ethanol als Substrat bewirkt eine Zunahme der Wachstumsrate und einen Anstieg des Quotienten. Sprossende Zellen werden auf Grund der erhöhten Zellmindestgröße P_m in der S-Phase arretiert, gleichzeitig nimmt durch die erhöhte Wachstumsrate die Sprossungsaktivität zu. Die Folge ist eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase. Ist Ethanol vollständig abgebaut, entspricht die nun hohe Biomasse nicht mehr dem verminderten Nährstoffangebot. Die Konsequenz ist ein starker Rückgang der Wachstumsrate und damit der Sprossungsaktivität. Der fallende Quotient der kritischen Zellgrößen bedeutet eine Beschleunigung der Zellteilung, und Zellen in der G1-Phase sammeln sich an. Beide Effekte zusammen bewirken eine Polarisierung der Zellpopulation und damit die Synchronisation des Teilungsverhaltens in den nachfolgenden Zyklen.

Basierend auf Zellgrößen- und Zellalter-Verteilungen sind weitere Modelle entwickelt worden, die zunehmend komplexer werden, aber dennoch nicht alle Beobachtungen erklären können [Cazzador et al. 1990; Strässle et al. 1988; Beuse et al., 1998]

4.2. Zielsetzung der Experimente

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie soll bei synchronen Hefe-Kultivierungen unterschiedlicher Verdünnungsraten eingesetzt werden. Neben Standardgrößen wie Biotrockenmasse, Optischer Dichte und Ethanolgehalt werden offline im Speziellen durchflussscytometrische Analysen des Zellzyklus', des Proteingehalts sowie der Neutrallipid-Konzentration durchgeführt. Mit Hilfe der In-Situ-Mikroskopie wird die synchrone Population hinsichtlich ihrer morphologischen Zusammensetzung in den einzelnen Zellzyklusphasen untersucht. Durch Erstellung von PLS-Modellen sollen die Offline-Daten mit den Fluoreszenzspektren korreliert und durch die Modelle vorhergesagt werden. Die erstellten Modelle werden im Weiteren auf ihre Übertragbarkeit auf andere Kultivierungen hin geprüft. Zusätzlich soll bei einer synchronen Kultur die zellzyklusabhängige Genexpression untersucht werden.

4.3. Kultivierungsparameter und Durchführung

Es werden drei synchrone Hefe-Kultivierungen (H1 bis H3) näher betrachtet. Der kontinuierlichen Kultivierung geht jeweils eine Batch-Kultivierung voraus. Das synchrone Wachstum wird durch stufenweise Erhöhung der Verdünnungsrate nach einer zweistündigen Hungerphase initiiert. Der Versuchsaufbau und die Medienzusammensetzung sind im Anhang (10.3.) und (10.4.1.) zu finden, ebenso die Vorschriften zur Anzucht der Vorkultur (Anhang (10.5.1.)) sowie die Durchführungen der Analytik (Anhang (10.6.) – (10.9.)) Das Reaktorvolumen beträgt 2 Liter. In Tabelle (4.3.1.) sind die Parameter der einzelnen Kultivierungen zusammengestellt.

Tab. 4.3.1.: Kultivierungsparameter der synchronen Hefe-Kultivierungen

Kultivierung	H1	H2	H3
Verdünnungsrate D [h^{-1}]	0,16	0,14	0,15
pH	5,5		
Rührerdrehzahl [rpm]	1200		
Begasung (Pressluft) [vvm]	2		
BioView [®] -Messintervall [s]	180		

4.4. Die synchrone Kultur H1

Anhand der Kultivierung H1 sollen zunächst exemplarisch die Details des synchronen Wachstums beschrieben werden. Ebenso werden mit den Daten dieser Kultivierung die Modelle erstellt, die anschließend auf die beiden anderen Kultivierungen übertragen werden sollen. Die Genexpressionsanalyse erfolgt ebenfalls bei der Kultivierung H1.

4.4.1. Beobachtung des synchronen Wachstums

Bei der Hefe-Kultivierung H1, die bei einer Verdünnung von $D=0,16 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt wurde, konnten stabile Oszillationen über einen Zeitraum von 110 h beobachtet werden. Die Zykluslänge beträgt 3,5 h ($\pm 10 \text{ min}$). 2 Zyklen, die zwischen der 94. und 100. Stunde untersucht wurden, werden im Folgenden exemplarisch beschrieben. In Abbildung (4.4.1.1.) sind zunächst die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse in Kombination mit dem Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas dargestellt.

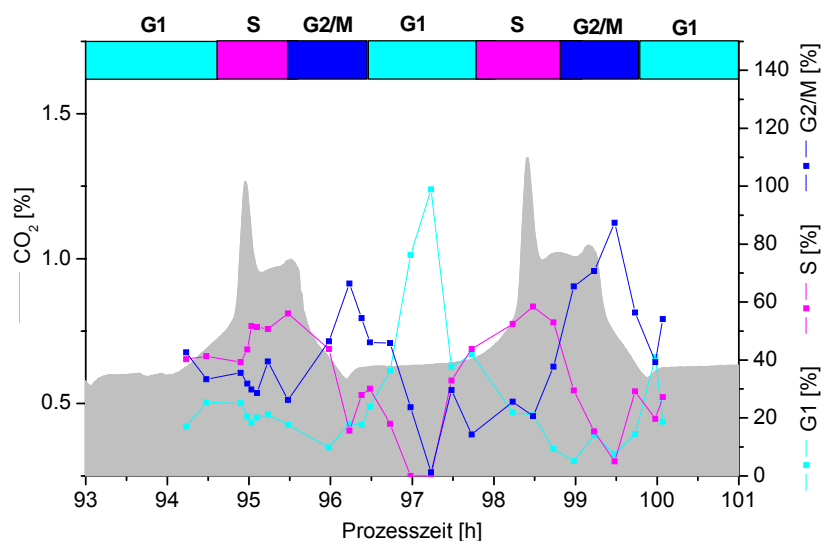


Abb. 4.1.1.1.: Verlauf der CO_2 -Produktion und Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, $D=0,16 \text{ h}^{-1}$, pH 5,5, $T=30^\circ\text{C}$, 1200 rpm, 2 vvm Luft

In der G1-Phase, in der Zellwachstum und Reservestoff-Akkumulation stattfinden, ist die CO_2 -Produktion als Maß für die Stoffwechselaktivität zunächst konstant, steigt mit Erreichen der S-Phase exponentiell an und bleibt dann auf konstant hohem Niveau, was auf den Energiebedarf für die DNA-Synthese zurückzuführen ist. Während der G2-Phase werden zur Vorbereitung auf die Zellteilung zusätzlich Reservestoffe mobilisiert [Beuse, 1997], wodurch die CO_2 -Produktion nochmals kurz ansteigt und mit Erreichen der M-Phase auf ein Minimum absinkt. Die Ergebnisse bestätigen deutlich die Kopplung der beobachteten Oszillationen mit

dem Zellzyklus, die Synchronität der Kultur ist mit maximal 58 % an Zellen in der S-Phase nahe dem Idealwert von 61,8 %, der dem Wachstumsmodus 1.2 entspricht.

Die beiden folgenden Abbildungen (4.4.1.2.) und (4.4.1.3.) zeigen den Verlauf der weiteren online sowie offline bestimmten Größen. Die Sauerstoffaufnahme rate durchläuft entsprechend des hohen Energiebedarfs ihr Maximum in der Synthese- und G2-Phase. Speicherstoffe wie Trehalose, Glykogen und Lipide werden durch Oxidation wieder verfügbar gemacht [Münch et al., 1992]. Anhand des Respiratorischen Qotienten (RQ), der das Verhältnis von Kohlendioxidproduktion und Sauerstoffaufnahme darstellt, lassen sich Rückschlüsse auf den Stoffwechselweg ziehen. Bei einem RQ über 1 übersteigt die CO₂-Produktionsrate, die dem Verlauf des CO₂ im Abgas entspricht, die Sauerstoffaufnahme rate. Glucose wird kurzzeitig oxidoreduktiv verstoffwechselt, und Ethanol reichert sich an. Der Crabtree-Effekt ist im Diagramm bei den Maxima der CO₂-Werte zu Beginn der Synthese-Phase zu erkennen. Nach Abschluss der Reservestoff-Akkumulation in der G1-Phase erhöht sich die verfügbare Menge an Glucose für die Zellen, zum einen ein Faktor für den Eintritt in die Synthese-Phase, zum anderen der Auslöser für die Stoffwechsellumstellung [Münch et al., 1992]. Ethanol dient in der S- und G2-Phase neben den mobilisierten Reservestoffen und Glucose als zusätzliches Substrat und wird dementsprechend schnell wieder abgebaut. Die spezifische Glucoseaufnahme rate ist in der Sprossungsphase am höchsten [Richard, 2003].

Die Biotrockenmasse und die Optische Dichte steigen in der G1-Phase entsprechend dem Wachstum der Zellen kontinuierlich an, das Minimum in der S-Phase ist damit begründet, dass bei vermindertem Wachstum aufgrund des oxidoreduktiven Stoffwechsels im kontinuierlichen Betrieb zusätzlich Zellen ausgewaschen werden. Die Auswertung der mit dem In-situ Mikroskop aufgenommenen Bilder zeigt ebenfalls einen Abfall der Anzahl an Einzellzellen während der S- und G2-Phase, der mit der Initiierung der Sprossung übereinstimmt. In der Teilungsphase wird ein Minimum registriert, danach steigt die Anzahl an Einzelzellen wieder an. Die Auszählung der Doppelzellen, die in der Sprossungsphase maximal sein sollte, liefert keine befriedigenden Ergebnisse. Der Grund hierfür liegt in der hohen Rührgeschwindigkeit, wodurch Doppelzellen in der Messzone des Mikroskops zum Teil nur schwer zu identifizieren sind. Bei geringerer Rührgeschwindigkeit tritt bei der Begasung mit Pressluft eine Sauerstofflimitierung auf. In Versuchen, den pO₂-Wert durch Zugasen von Sauerstoff zu erhöhen, konnten keine stabilen Oszillationen erreicht werden. Eine verbesserte Möglichkeit, um die Zellen zum Aufnehmen der Bilder abzubremsen,

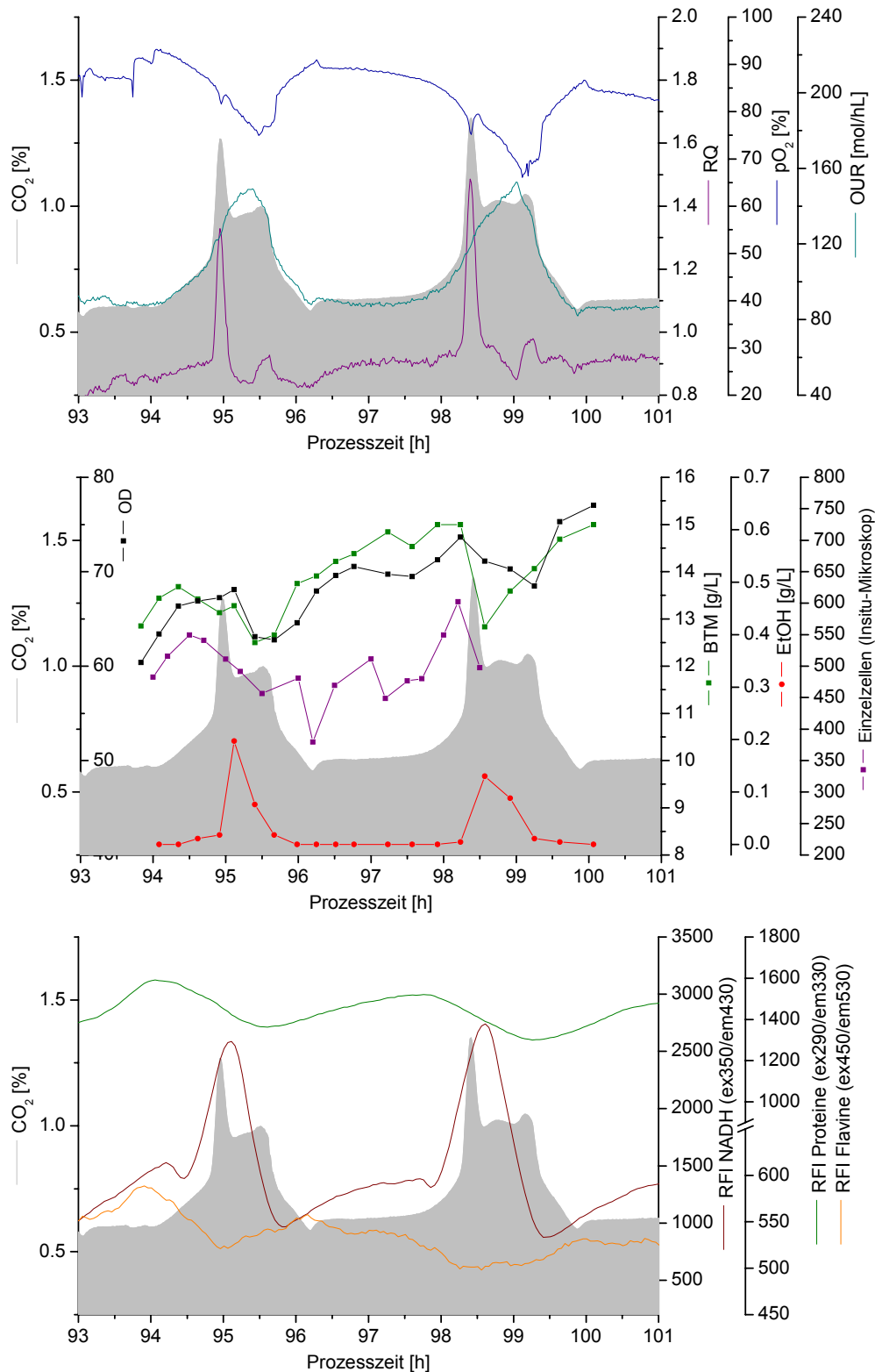


Abb. 4.1.1.2.: Verläufe der CO₂-Produktion, des Gelöstsauerstoffgehalts (pO₂), der Sauerstoffaufnahme (OUR), des respiratorischen Quotienten (RQ), der Biotrockenmasse (BTM), Optischen Dichte (OD), Ethanolkonzentration, Anzahl an Einzelzellen sowie die Verläufe der NADH-, Protein- und Flavinfluoreszenz der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, D=0,16 h⁻¹, pH 5,5, T=30°C, 1200 rpm, 2 vvm Luft

soll in Zukunft entwickelt werden [Brückerhoff, 2004]. Durchflusszytometrische Untersuchungen an einer anderen synchronen Kultur zeigten allerdings einen Anstieg des Sprossungsindex in der G2/M-Phase (Daten nicht gezeigt).

Die mit dem BioView[®]-Sensor online aufgenommenen Fluoreszenzverläufe in Abbildung (4.1.1.2.) sind zur besseren Darstellung durch einen 21-Punkte Savitzky-Golay-Filter geglättet. Die NADH-abhängige Fluoreszenz zeigt die größten periodischen Schwankungen. Während der G1-Phase ist entsprechend des Zellwachstums und zunehmender Biomasse ein Anstieg des NADH- und Proteingehalts zu beobachten. Der sprunghafte Anstieg der NADH-Fluoreszenz zu Beginn der Synthesephase beruht zum einen auf der steigenden Stoffwechselaktivität, zum anderen auf der Stoffwechselumstellung von oxidativ zu oxidoreduktiv [Schügerl et al., 1993]. NADH wird im letzten Schritt der Ethanol-Synthese benötigt. Um dieses NADH bereitzustellen, wird der Citratzyklus vermutlich kurzzeitig unterbrochen und somit die NADH-Menge erhöht. Aus demselben Grund ist ein entgegen gesetzter Verlauf der Flavin-Fluoreszenz zu beobachten. Die fluoreszierenden oxidierten Formen FAD und FMN werden in der Atmungskette und im Citratzyklus gebildet, bei Einsetzen der Gärung kommt es deshalb zu einer Konzentrationsabnahme.

Bezüglich der Proteinfluoreszenz wird diskutiert, ob die beobachteten periodischen Schwankungen tatsächlich Metabolismus-gekoppelt sind oder doch eher auf dem Zellwachstum beruhen [Marose, 1999]. Zur genaueren Betrachtung ist in Abbildung (4.1.1.3.) der Verlauf der Protein-Fluoreszenz im Vergleich zu dem durchflusszytometrisch bestimmten Gesamtprotein- und Neutrallipid-Gehalt der Zellen gezeigt, zusätzlich wurde der Gehalt an Neutrallipiden bestimmt.

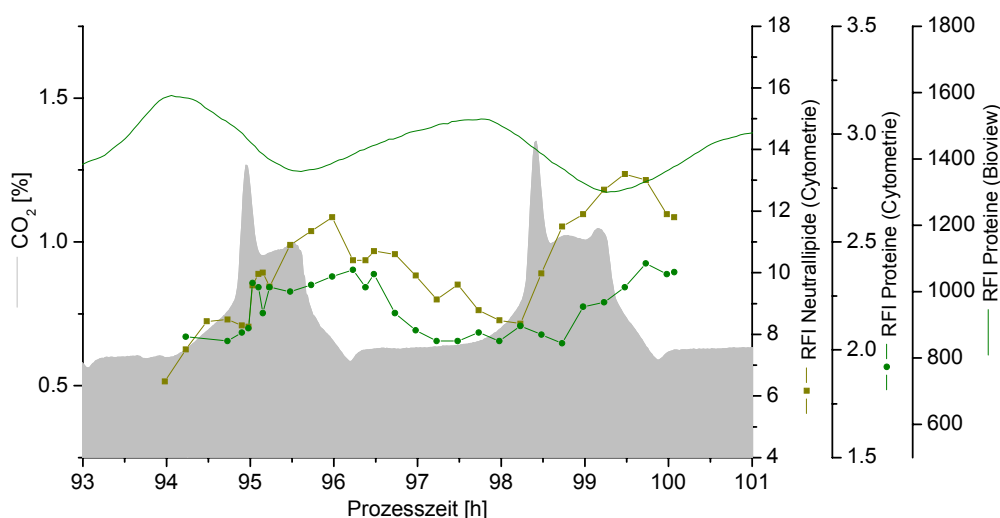


Abb. 4.1.1.3.: Verlauf der CO₂-Produktion, der Proteinfluoreszenz, des durchflusszytometrisch bestimmten Gesamtprotein- und Neutrallipid-Gehalts der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, D=0,16 h⁻¹, pH 5,5, T=30°C, 1200 rpm, 2 vvm Luft

Die Ergebnisse zeigen einen exakt gegensätzlichen Verlauf von Fluoreszenz und Gesamtproteingehalt. Der Gesamtproteingehalt der Zellen wird zum Ende der Synthesephase bzw. in der G2-Phase maximal. Untersuchungen von *Duboc et al.* (1996) haben ergeben, dass die Proteinsyntheserate in der ersten Hälfte der S-Phase niedrig ist und in der zweiten Hälfte deutlich ansteigt, was den hier gefundenen Verlauf bestätigt. Zudem ist die Stoffwechselaktivität hier auch sehr hoch, und für die Initiierung der Zellteilung müssen viele Proteine synthetisiert werden. Der mit dem BioView[®] gemessene Verlauf beruht allein auf der Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren und ist dementsprechend sehr unspezifisch. Die gefundenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Fluoreszenzintensität deutlich von der vorhandenen Biomasse beeinflusst ist, deren Verlauf er auch ähnelt, und nicht auf dem tatsächlichen Proteingehalt der Zellen beruht. Zum anderen ist es auch möglich, dass die Intensität der Aminosäurefluoreszenz durch deren Einbau in Proteine abgeschwächt wird (Quenching durch den Einbau in hydrophobe Taschen), was ebenfalls das Minimum zum Ende der Synthese-Phase erklären würde.

Der Gehalt an Neutrallipiden durchläuft das Maximum in der G2/M-Phase. Fette werden zum Aufbau der Zellmembran benötigt und sind Bestandteile der Zellwand. Zudem stellen sie die effizienteste Form der Energiespeicherung dar und können von Hefen neben den Kohlenhydratspeichern wie Glykogen und Trehalose in den Vakuolen eingelagert werden. Die Kohlenhydratspeicher werden mit Eintritt in die Synthese-Phase abgebaut und während der G1-Phase wieder angelegt [Silje et al., 1997; Jones und Kompala, 1999]. Der gefundene Verlauf des Lipid-Gehalts zeigt ein deutlich anderes Bild, während der G1-Phase ist sogar ein Absinken zu beobachten. Viel mehr ist der Verlauf auf die Fettsynthese zum Einbau in neue Zellmembranen und -wände während der Sprossungs- und Teilungsphase zurückzuführen. Unter den gegebenen Bedingungen findet womöglich keine Einlagerung von Lipiden als Reservestoff statt, oder der Effekt wird durch die höhere Konzentration an Lipiden, die als Bausteine dienen, überlagert.

4.4.2. Genexpressionsanalyse der synchronen Kultur H1

Die Synchronisation der Kultur im kontinuierlichen Betrieb bietet die Möglichkeit zur Untersuchung der zellzyklusabhängigen Genexpression. Die Identifikation der zellzyklusregulierten Gene und konsekutiv der Proteine ist ein wesentliches Ziel aktueller Untersuchungen [Zhao et al., 2001; de Lichtenberg et al., 2003]. Microarray-Techniken werden vermehrt angewandt, um periodisch fluktuierende Genexpressionen während des Zellzyklus von *S. cerevisiae* zu identifizieren, allerdings sind die bisher veröffentlichten Ergebnisse sehr unterschiedlich. *Cho et al.* [1998] fanden 416 zellzyklusabhängige Gene, *Spellman et al.* [1998] beschreiben sogar 800 Gene, die das Kriterium der Zellzyklusregulation erfüllen und die in Clustern vorkommen.

Zur Erfassung des Expressionsprofils werden während der synchronen Kultivierung H1 Proben während der in Kapitel (4.4.1.) beschriebenen zwei Zyklen genommen, aus denen zunächst die RNA isoliert wird. Die Konzentration der isolierten RNA ist in Abbildung (4.4.2.1.) in Verbindung mit den Zellzyklusdaten gezeigt.

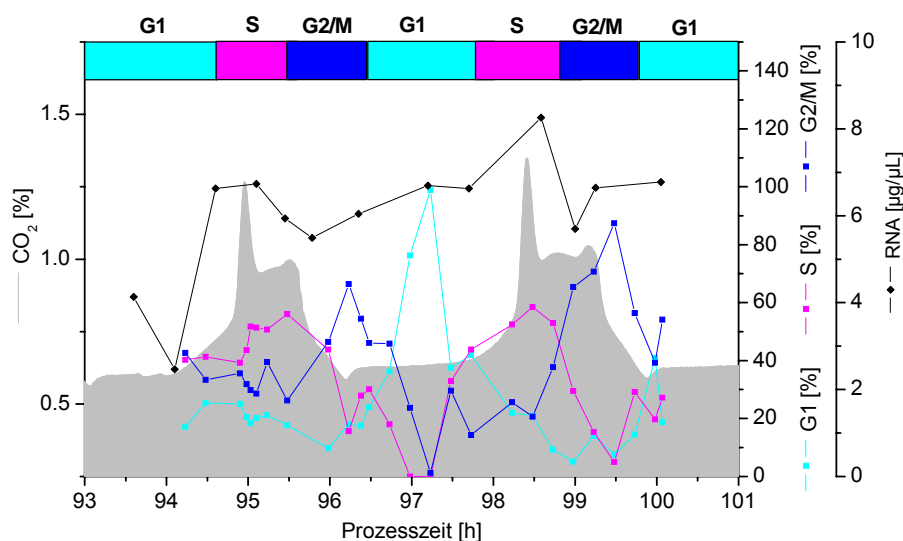


Abb. 4.4.2.1.: Verlauf der CO_2 -Produktion, der durchflusszytometrisch bestimmten Zellzyklusanteile und RNA-Konzentration der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, $D=0,16 \text{ h}^{-1}$, $\text{pH } 5,5$, $T=30^\circ\text{C}$, 1200 rpm, 2 vvm Luft

Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der RNA-Konzentration in der S-Phase. Die Transkription, die die Information der DNA für die Proteinsynthese zugänglich macht, ist im Vergleich zu den anderen Zellzyklusphasen verstärkt. Der Verlauf der RNA-Konzentration weist bereits darauf hin, dass in den einzelnen Zellzyklusphasen Gene unterschiedlich exprimiert und demzufolge Proteine synthetisiert werden. Periodische Oszillationen der mRNA in Hefen während des

Zellzyklus' wurden bereits 1981 von *Hereford et al.* entdeckt, was den Anfang der Erforschung zellzyklusregulierter Gene markiert.

Um erste Hinweise auf die in den einzelnen Zellzyklusphasen synthetisierten Proteine zu erhalten, wird zunächst ein Genexpressionsprofil aufgenommen. Dazu wird die isolierte RNA von zwei Proben, die erste während der S-Phase, die zweite während der G2/M-Phase des zweiten Zyklus aus Abbildung (4.4.2.1.) genommen, durch reverse Transkription in cDNA überführt. Die Proben werden fluoreszenzmarkiert und auf dem Pan[®] Yeast Array-Chip der Firma MWG Biotech, Ebersberg, hybridisiert, der 6250 genspezifische Oligonukleotide umfasst (siehe Anhang (10.9.)).

Zur Auswertung wird für jedes auf dem Chip befindliche Oligonukleotid, das ein Gen repräsentiert, der Quotient aus dem Signal der Probe aus der S-Phase (S_S) und dem Signal der Probe aus der G2/M-Phase ($S_{G2/M}$) gebildet. Ist der Quotient größer 1, ist das entsprechende Gen in der S-Phase aktiv, bei einem Quotienten kleiner 1 entsprechend in der G2/M-Phase. Abbildung (4.4.2.2.) zeigt das Häufigkeitshistogramm der regulierten Gene.

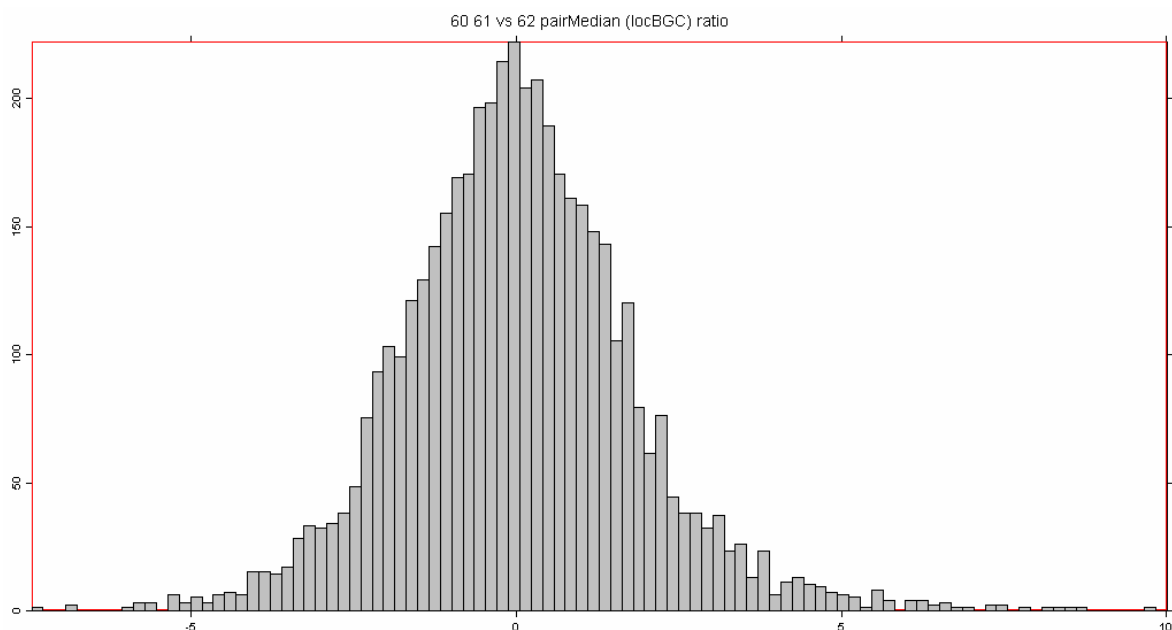


Abb. 4.4.2.2.: Häufigkeit (y-Achse) der um den Faktor $S_S/S_{G2/M}$ (x-Achse; logarithmisch) hoch bzw. runter regulierten Gene der S- und G2/M-Phase bei der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1

Das Histogramm zeigt, dass die Mehrzahl der Gene um den Faktor -10 bis +10, einige allerdings deutlich stärker reguliert sind. Die Auftragung der Signale der in der G2/M-Phase exprimierten Gene gegen die Signale der in der S-Phase im Scatterplot (Abbildung (4.4.2.3.)) gibt ein anschaulicheres Bild.

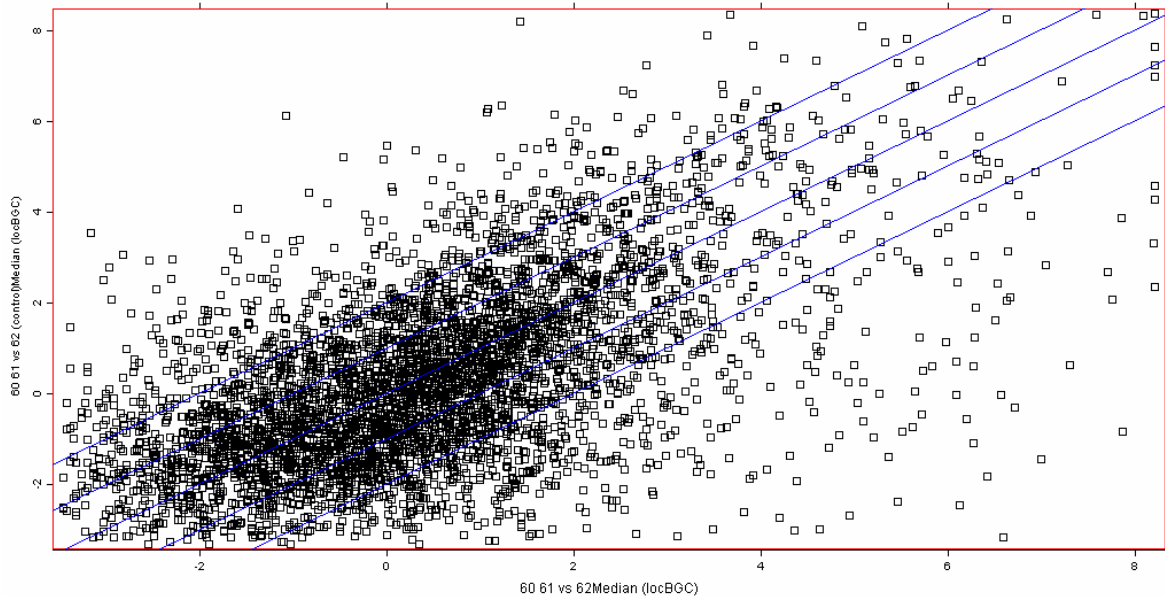


Abb. 4.4.2.3.: Scatterplot der Genexpressionsanalyse der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, Logarithmische Auftragung der Signale der exprimierten Gene in der G2/M-Phase gegen die Signale der exprimierten Gene in der S-Phase

Die Gene auf der mittleren Diagonalen (Quotient $S_S/S_{G2/M} = 1$) sind nicht reguliert, die innerhalb der beiden Diagonalen wenig ($-10 < \text{Quotient } S_S/S_{G2/M} < 10$ bzw. $-100 < \text{Quotient } S_S/S_{G2/M} < 100$). Interessant für die Untersuchung der zellzyklus-abhängigen Genexpression sind vor allem die Gene, die um einen Faktor < -2 bzw. > 2 reguliert sind, auch weil die Messgenauigkeit bei kleineren Faktoren keine zuverlässigen Werte liefert.

Es werden in diesem Experiment 690 Gene identifiziert, die in den beiden untersuchten Zellzyklusphasen unterschiedlich reguliert sind. Im Anhang (10.10.) ist die Beschreibung aller identifizierten Gene angegeben, die mindestens um den Faktorbetrag 100 reguliert sind. Tabelle (4.4.2.1.) zeigt die am stärksten regulierten und einige ausgewählte Gene der beiden Zyklusphasen. Einige stark regulierte Gene, deren Genprodukt nicht eindeutig identifiziert ist, wurden nicht berücksichtigt. In der S-Phase sind Gene aktiv, deren Genprodukte die DNA-Replikation steuern, für Reparatur und Protektion sorgen. Eines der am höchsten regulierten Gene codiert ein *DNA mismatch repair Protein*. Die Sprossung wird ebenfalls über Genexpression in der S-Phase eingeleitet und reguliert. Dabei spielen Glykosilierung und Zellwand- und -membranaufbau eine entscheidende Rolle. Beispielsweise wird ein Chitin-Biosynthese-Protein gebildet. Chitin bildet nach der Zellteilung die Sprossungsnarbe der Mutterzelle. Weiterhin werden diverse Gene exprimiert, die die Proteinsynthese und den Transport regeln.

Tab. 4.2.2.1.: Beschreibung und Faktoren ausgewählter regulierter Gene in der S- und G2/M-Phase der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1;
 runter reguliert (G2/M-Phase), hoch reguliert (S-Phase)

Nr.	Gen Name	Gen Beschreibung	Quotient $S_S/S_{G2/M}$
1	HOR7	hyperosmolarity-responsive protein	-4476
2	YEF3	translation elongation factor eEF3	-2718
3	HKR1	Hansenula MrakII k9 killer toxin-resistance protein	-2301
4	DIT2	cytochrome P450 56	-1231
5	CCR4	transcriptional regulator	-1015
6	ALD4	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	-863
7	ARO8	aromatic amino acid aminotransferase I	-750
8	POR1	mitochondrial outer membrane porin	-740
9	CDC19	pyruvate kinase	-560
10	TDH4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4	-507
11	HXT13	high-affinity hexose transporter	-262
12	CLB5	cyclin, B-type	-261
13	SEC1	protein transport protein	-213
14	CWP1	cell wall mannoprotein	-208
15	KEM1	multifunctional nuclease	-202
16	MSH3	DNA mismatch repair protein	-198
17	SUA5	translation initiation protein	-190
18	KAR2	nuclear fusion protein	-176
19	ANP1	required for protein glycosylation in the golgi	-157
20	GAR1	nucleolar rRNA processing protein	-140
21	SNQ2	multidrug resistance protein	-140
22	SKN7	transcription factor with similarity to HSF1P	-136
23	MCD4	sporulation protein	-121
24	YKU80	component of DNA end-joining repair pathway	100
25	CHS6	chitin biosynthesis protein	109
26	RAD7	nucleotide excision repair protein	114
27	ANP2	required for protein glycosylation in the golgi	119
28	SSF1	mating protein	123
29	ECM29	involved in cell wall biogenesis and architecture	180
30	VID27	protein involved in regulation of fructose-1,6-bisphosphatase	200
31	SPS4	sporulation-specific protein	265
32	SRN2	suppressor of RNA1-1 mutation	279
33	UBI5	ubiquitin	291
34	IPP1	inorganic pyrophosphatase, cytoplasmic	294
35	RPL12B	60S large subunit ribosomal protein L12.e	294
36	SIP18	osmotic stress protein	294
37	RPL40B	ubiquitin	639
38	CUP1-1	metallothionein	707
39	OLE1	stearoyl-CoA desaturase	830
40	ILV1	anabolic serine and threonine dehydratase precursor	857
41	CWP2	cell wall mannoprotein	857
42	RPS10B	ribosomal protein	1033
43	GUT2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	1055
44	DDR2	heat shock protein DDRA2	1368
45	MTR4	involved in nucleocytoplasmic transport of mRNA	1427
46	ADH2	alcohol dehydrogenase II	1700
47	HSP104	heat shock protein	2208
48	TDH3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	3285
49	MSH6	DNA mismatch repair protein	4426

Das Hitzeschockprotein (Nr. 47) wird unter anderem auch bei Anwesenheit von Ethanol oder anderen Stressfaktoren benötigt [CYGD, 2004]. Die Ethanolproduktion setzt bei der synchronen Kultur in der S-Phase ein, gleichzeitig wird auch das Gen für die Alkohol-Dehydrogenase II (Nr. 46) sehr stark exprimiert, welche Acetaldehyd zu Ethanol reduziert.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 3 (GAPDH 3, Nr.48) ist der Katalysator im ersten Schritt des zweiten Glykolyseabschnitts. Zudem reduziert sie das bei der Ethanolbildung entstehende NAD^+ wieder zum NADH. Die Rolle der GAPDH 3 in Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor (Gen GTS1) wird in der Literatur besonders in Hinblick auf Oszillationen der Hefe *S. cerevisiae* diskutiert. Das GTS1-Gen wird mit einem Faktor von 15 ebenfalls in der S-Phase exprimiert. Mehrere Untersuchungen ergaben, dass der Transkriptionsfaktor, neben der Beeinflussung des Zeitpunkts der Sprossung und der Zellgröße, über die Regelung des Energiestoffwechsels Oszillationen stabilisiert bzw., dass in GTS1-defizienten Mutanten keine stabilen Oszillationen beobachtet werden konnten [Liu et al., 2002; Akiyama und Tsurugi, 2003]

In der G2/M-Phase werden Genprodukte gebildet, die die Zellteilung steuern. Bezüglich der Proteinsynthese codieren die exprimierten Gene hier mehr Translationsfaktoren, während in der S-Phase die Transkription reguliert wird. Eines der am stärksten regulierten Gene in der G2/M-Phase codiert Cytochrom P450 56, ein Protein, das die Reifung der Sprosszellwand bewirkt [Briza et al., 1990]. Das Resistenz-Protein (Nr. 3) schützt die Zelle vor dem Einfluss eines Toxins, das die Synthese von β -Glucan inhibiert, dem Hauptbestandteil der Zellwand [CYGD, 2004]. Am stärksten wird das HOR7-Gen exprimiert, dessen Produkt ein Protein der Plasmamembran liefert. Das Hyperosmolarität-Antwortprotein dient zur Stressabwehr und nimmt Einfluss auf die Struktur der Zellwand [Kapteyn et al., 2001].

Ebenfalls in der G2/M-Phase wird Cyclin B (Nr. 12) reguliert. Der Eintritt der Zellen in die Mitose wird von dem Zusammenspiel des Cyclins und einer Proteinkinase kontrolliert. Cyclin aktiviert nach Beendigung der DNA-Synthese die Proteinkinase, die wiederum durch Phosphorylierung mehrerer Proteine die Mitose auslöst.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind die ersten Experimente im Arbeitskreis zur Erfassung der zellzyklusabhängigen Genexpression in *S. cerevisiae*. In Zukunft sollen weitere Analysen an synchronen Kulturen durchgeführt werden, um diese ersten Ergebnisse zu bestätigen und im Weiteren sämtliche Zellzyklusphasen zu untersuchen. Es soll auch versucht werden, die Zellen der einzelnen Zyklusphasen vor der Analyse zu separieren, um eventuelle Fehler durch die nicht vollständige Synchronisation der Population auszuschließen.

Über die Genexpressionsanalyse der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur konnten 690 zellzyklusregulierte Gene identifiziert werden. Einige Genprodukte sind dabei vermutlich direkt für die Aufrechterhaltung der Oszillationen verantwortlich.

Die detaillierte Beobachtung des synchronen Wachstums von *S. cerevisiae* in Kapitel (4.4.1.) hat gezeigt, dass sämtliche bestimmte Größen periodische Änderungen zeigen. Die Kulturfluoreszenz liefert wichtige Informationen bezüglich Stoffwechsel, Zellwachstum und Zellzyklus. Einige der beobachteten Verläufe, wie z.B. die Ethanolproduktion, lassen sich direkt mit den Fluoreszenzverläufen der mit dem BioView[®]-Sensor gemessenen biogenen Fluorophore in Verbindung bringen. Es soll nun gezeigt werden, dass es möglich ist, weitere Größen mit der Kulturfluoreszenz zu korrelieren und durch Modelle vorherzusagen.

4.5. Chemometrische Datenauswertung der synchronen Kultur H1

Die Fluoreszenzspektren sollen mittels PLS-Regression mit den Offline-Größen korreliert werden. Wie in Kapitel (2.1.2.) beschrieben, beinhaltet die Regression eine Komprimierung der Fluoreszenzdaten durch Festlegen neuer Koordinaten, die die maximale Varianz der Daten beschreiben. Um sich einen Überblick zu verschaffen, in welchen Bereichen der Spektren die meiste Information enthalten ist, d.h., um die Bereiche großer Varianz zu identifizieren, wird zunächst eine Hauptkomponentenanalyse mit den Spektren durchgeführt. Hierbei werden die Offline-Größen noch nicht berücksichtigt; es können aber auf diesem Weg bereits Charakteristika der synchronen Kultur aufgezeigt werden.

4.5.1. Hauptkomponentenanalyse

Bei der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1 wurden im Zeitraum der stabilen Oszillationen zwischen der 40. und der 150. Kultivierungsstunde 2200 Spektren aufgenommen. Zur übersichtlichen Darstellung wird die Hauptkomponentenanalyse nur mit den 200 Spektren während 4 Zyklen zwischen der 93. und 107. Kultivierungsstunde durchgeführt. Da hier auch die Offline-Proben genommen wurden, ist die Untersuchung der Kultur zu diesem Zeitpunkt sinnvoll. Die mit dem Unscrambler[®] durchgeführte Analyse berechnet 3 Hauptkomponenten, die zusammen 99 % der Varianz beschreiben (PC 1: 95%, PC 2: 3%, PC 3: 1%). Im Scoreplot (Abbildung (4.5.1.1.)) ist die Lage der Spektren bezüglich der ersten und zweiten Hauptkomponente dargestellt.

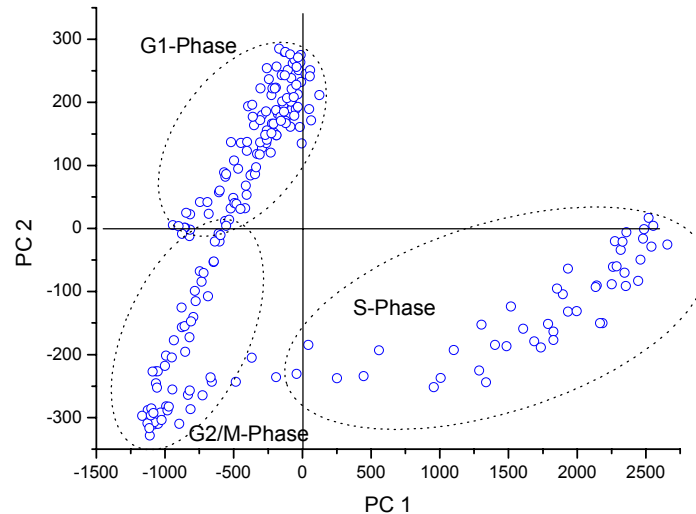


Abb. 4.5.1.1.: Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse von 200 Spektren der synchronen *S. cerevisiae*-Kultivierung H1, Gruppierung und Zuordnung zu den Zellzyklusphasen

Der Scoreplot der ersten Hauptkomponente gegen die zweite beinhaltet nahezu die gesamte Information, die in den Spektren enthalten ist, da die ersten beiden Hauptkomponenten zusammen 98 % der Varianz beschreiben. Im Scoreplot sind drei Gruppen von Spektren zu erkennen. Je ähnlicher die Score-Werte, desto ähnlicher sind auch die zugehörigen Spektren. Die drei Gruppen entsprechen den Spektren in den einzelnen Zellzyklusphasen, die zeitliche Abfolge der Spektren im Scoreplot zeigt einen zyklischen Verlauf (aus Gründen der Übersicht wurden die Spektren nicht einzeln beschriftet). Die Homogenität der einzelnen Gruppen lässt auf eine stabile Oszillation in dem betrachteten Zeitraum schließen. Datenausreißer ließen sich leicht identifizieren. Der Scoreplot dieser Kultivierung erlaubt es weiterhin, auch Spektren anderer Kultivierungen anhand ihrer Score-Werte der entsprechenden Zellzyklusphase zuzuordnen. Spektren mit geringen Score-Werten, die also nahe dem Ursprung der entsprechenden Koordinate liegen, entsprechen eher dem Durchschnitt, wie in diesem Beispiel die Spektren der G1- und G2/M-Phase. Die Spektren der S-Phase besitzen größere Score-Werte, d.h., ihre Varianz ist am größten. Ein Vergleich mit Abbildung (4.1.1.2.) lässt erkennen, dass während der S-Phase tatsächlich große Veränderungen in den Fluoreszenzverläufen vor allem der NADH-Fluoreszenz auftreten. Dieser Befund wird durch die Loading-Werte der ersten drei Hauptkomponenten, die in Abbildung (4.5.1.2.) dargestellt sind, bestätigt.

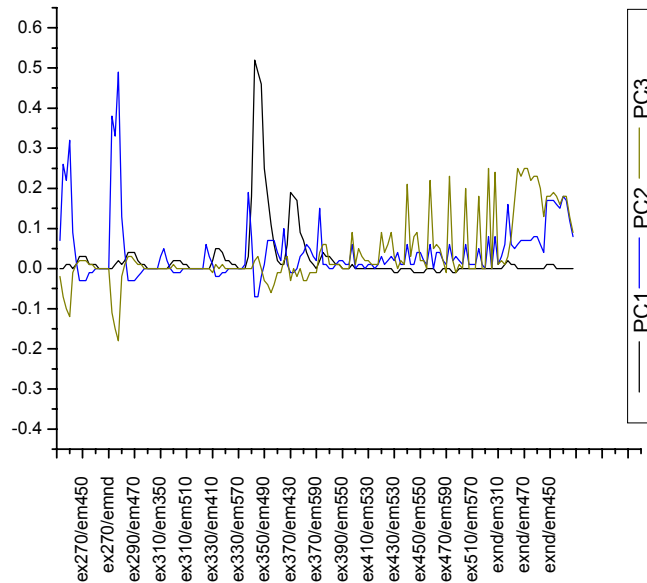


Abb. 4.5.1.2.: Loadings der ersten bis dritten Hauptkomponente, berechnet aus 200 Spektren der synchronen *S. cerevisiae*-Kultivierung H1

Die Größe der Loadings gibt den Einfluss der Variable auf die Komposition der Hauptkomponente an. Aus Abbildung (4.5.1.2.) ist ersichtlich, dass die erste Hauptkomponente fast ausschließlich von der Varianz der NADH-abhängigen Fluoreszenz bestimmt wird. Die zweite Hauptkomponente ist abhängig vom Protein-abhängigen Fluoreszenzbereich sowie vom wellenlängenabhängigen Streulicht. Die Streulichtmessung ergibt ebenfalls periodische Schwankungen, die dem Verlauf der Proteinfluoreszenz entsprechen und mit dem Verlauf der Biomasse korrelieren. Daher ist es nachvollziehbar, dass die Varianz des Streulichts ebenfalls einen Einfluss auf die Komposition der Hauptkomponente ausübt. Die dritte Hauptkomponente schließlich, die nur noch 1 % der Varianz beschreibt, wird von der geringeren Varianz im Flavinbereich bestimmt.

Durch die durchgeführte Hauptkomponentenanalyse wurde bei den Fluoreszenzdaten der synchronen *S. cerevisiae*-Kultivierung H1 eine deutliche Reduktion der Variablenzahl erreicht. Durch drei Hauptkomponenten lassen sich 99 % der in den Spektren enthaltenen Varianz beschreiben. Anhand des Scoreplots können Datengruppen erkannt und den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Für eine auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie basierende Prozessbeobachtung und -regelung ist es nun wichtig zu untersuchen, inwieweit die Fluoreszenzspektren Auskunft über den biologischen Zellzustand geben können. Dazu sollen nun die Verläufe der offline gewonnenen Prozessvariablen durch PLS-Regression aus den Fluoreszenzspektren bestimmt werden.

4.5.2. PLS-Modelle

Für die synchrone *S. cerevisiae*-Kultur H1 werden mit dem Unscrambler® 7 PLS1-Modelle entsprechend der Beschreibungen in Kapitel (2.1.2.) und (3.2.1.) zur Vorhersage der Offline-Größen BTM, Ethanolkonzentration, Zellzyklusanteile, Lipid- sowie Proteingehalt entwickelt. Als Validierung wird eine zufällige Kreuzvalidierung gewählt. Die Modelle werden mit den Offline-Proben, die während der zwei Zyklen zwischen der 94. und 100. Kultivierungsstunde genommen wurden, und den dazugehörigen 2D-Fluoreszenzspektren erstellt. Offensichtliche Datenausreißer wurden dabei nicht berücksichtigt. Neben den berechneten Größen zur Beurteilung der Regression (Bestimmtheitsmaß und RMSEP) kann die Güte der Modelle anhand der Vorhersage der Offline-Größen eines dritten Zyklus, der zwischen der 118. und 121. Kultivierungsstunde derselben Kultivierung untersucht wurde, anschaulich dargestellt werden.

- Modelle zur Vorhersage der Biotrockenmasse und Ethanolkonzentration

Das Modell zur Beschreibung der Biotrockenmasse nutzt 7 Hauptkomponenten, von denen die ersten vier 97 % der Y-Varianz beschreiben. Die erste Hauptkomponente, die von der Varianz der NADH-Fluoreszenz dominiert wird, beschreibt 33 % der Varianz mit einem RMSEP von 0,7 g/L, die zweite (hauptsächlich abhängig vom Streulicht) 22 % mit einem RMSEP von 0,6 g/L. Die dritte Hauptkomponente ist abhängig von der Protein-Fluoreszenz und beschreibt noch einmal 27 % der Varianz (RMSEP 0,5 g/L). Die Anzahl der benötigten Hauptkomponenten in diesem Modell ist verhältnismäßig hoch, der Vorhersagefehler dafür mit durchschnittlich 5 % niedrig. Das Bestimmtheitsmaß r^2 beträgt 0,998 für die Kalibration und 0,895 für die Validierung.

Zur Vorhersage der Ethanolkonzentration wird ein Modell mit 3 Hauptkomponenten berechnet, die zusammen 98 % der Y-Varianz erfassen (1. PC (NADH-Bereich): 81 %; 2. PC (Flavinbereich): 12 %; 3. PC (Proteinbereich und Streulicht): 5 %)). Der mittlere Fehler der Vorhersage liegt für die Ethanolkonzentration beim Maximum bei 0,012 g/L Ethanol (6 %). Das Bestimmtheitsmaß r^2 wird zu 0,999 für die Kalibration und 0,982 für die Validierung berechnet. Die über die PLS1-Regression vorhergesagten Verläufe für die Biotrockenmasse und die Ethanolkonzentration sind in Abbildung (4.5.2.1.) dargestellt.

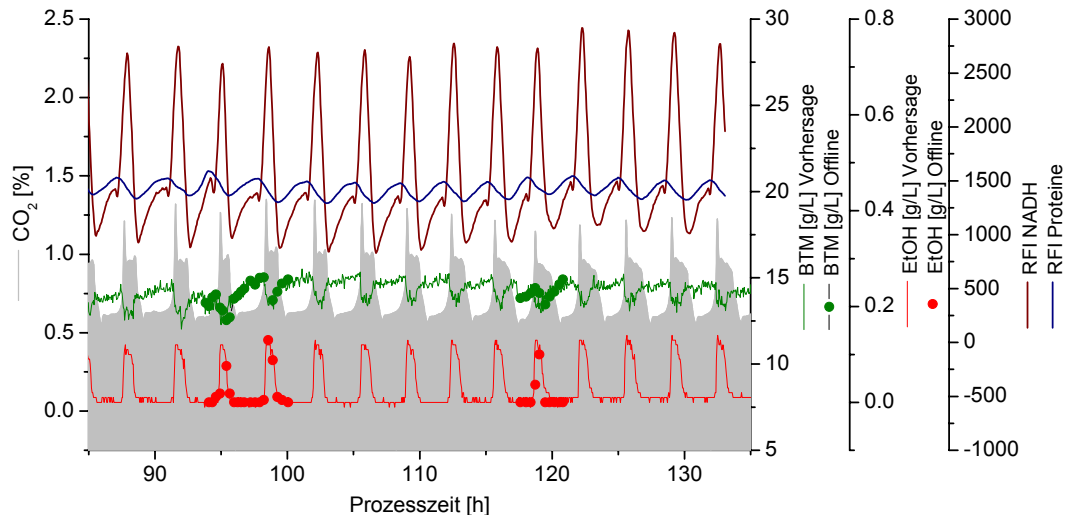


Abb. 4.5.2.1.: Ergebnis des PLS-Regressionsmodells zur Vorhersage der Biotrockenmasse und Ethanolkonzentration bei der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, $D=0,16 \text{ h}^{-1}$; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO_2 -Produktion, der NADH- und Proteinfluoreszenz

Aus der Abbildung (4.5.2.1.) ist die Übereinstimmung der vorhergesagten und offline gemessenen Prozessgrößen gut zu erkennen. Das Modell beschreibt auch die Daten des dritten Zyklus' mit großer Genauigkeit. Die Darstellung der NADH- und Proteinfluoreszenz macht noch einmal die Abhängigkeiten der vorhergesagten Verläufe deutlich. Der Verlauf der Biotrockenmasse korreliert mit der Proteinfluoreszenz (2. PC des Modells), der der Ethanolkonzentration korreliert sehr stark mit der NADH-Fluoreszenz (1. PC des Modells).

- Modelle zur Vorhersage der Zellzyklusanteile

Die Cytometrie-Daten der Zellzyklusanteile sind teilweise stark fehlerbehaftet, da das Peakmaximum bei der verwendeten Software manuell festgelegt werden muss und nicht immer eindeutig bestimmt werden kann. Um den Einfluss der Fehler zu minimieren und die Datendichte im betrachteten Zeitraum zwischen der 94. und 100. Kultivierungsstunde zu erhöhen, werden die Verläufe der einzelnen Zellzyklusphasen durch Trendfunktionen beschrieben (G1-Phase: Polynom 4. Grades; S- und G2/M-Phase: Polynom 5. Grades), die somit für die Modell-erstellung als Y-Datensatz dienen.

Die drei auf dieser Basis für die Zellzyklusphasen erstellten Modelle enthalten je 3 Hauptkomponenten, die zusammen 90 % (G1-Phase), 86 % (S-Phase) und 97 % (G2/M-Phase) der Y-Varianz beschreiben. Die PCs mit den größten Anteilen sind

dabei im G1-Modell von der Fluoreszenz im Proteinbereich und im S- und G2/M-Modell von der Fluoreszenz im NADH-Bereich abhängig. Die Bestimmtheitsmaße und RMSEPs der drei Modelle sind in Tabelle (4.5.2.1.) zusammengefasst.

Tab. 4.5.2.1.: Anzahl der Hauptkomponenten, Bestimmtheitsmaß r^2 und RMSEP für die PLS-Regressionsmodelle zur Vorhersage der Zellzyklusanteile der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1; $D=0,16 \text{ h}^{-1}$

Modell	G1	S	G2/M
PCs	3	3	3
Bestimmtheitsmaß r^2			
Kalibration	0,945	0,921	0,983
Validierung	0,923	0,886	0,978
RMSEP _{Mittel} [%]	8,8	9,4	8,1

Obwohl der Fehler der Vorhersage mit 8,1 bis 9,4 % relativ hoch ist, geben die Modelle, die wie beschrieben auf Trendfunktionen für die prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen beruhen, die tatsächlich gemessenen Offline-Werte für alle drei Zyklusphasen gut wieder (siehe Abbildung (4.5.2.2.)). Es ist weiterhin zu erkennen, dass die Vorhersage der Werte des dritten Zyklus zwischen der 118. und 121. Kultivierungsstunde mit den erstellten Modellen ebenfalls gelingt. Die Kurven der Vorhersage sind zur besseren Darstellung und Eliminierung des Rauschens durch Anwendung eines 21-Punkte Savitzky-Golay-Filters geglättet. Die Summe der einzelnen Zyklusphasen in der Vorhersage beträgt zu allen Zeiten 100 % ($\pm 5\%$).

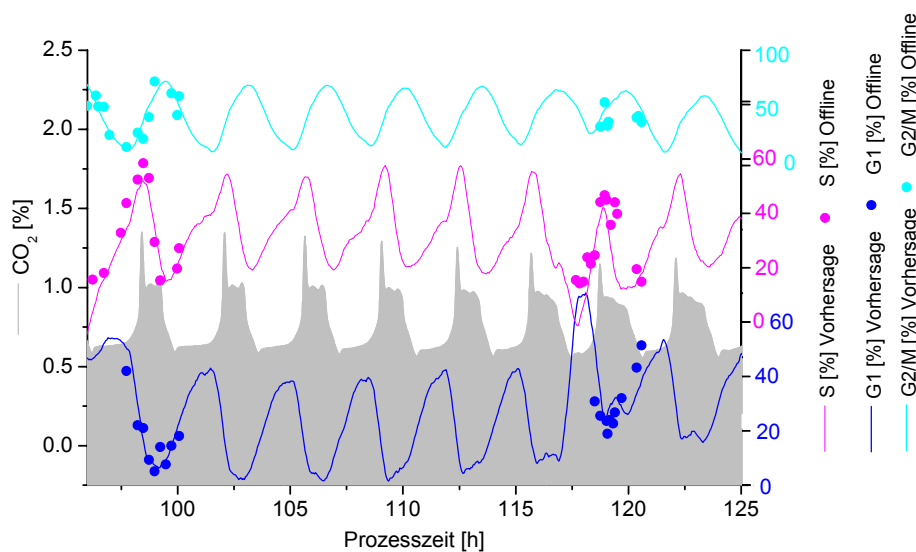


Abb. 4.5.2.2.: Ergebnis des PLS-Regressionsmodells zur Vorhersage der Zellzyklusphasen bei der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, $D=0,16 \text{ h}^{-1}$; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO_2 -Produktion

- Modelle zur Vorhersage des Neutrallipid- und Proteingehalts

Das Modell zur Vorhersage des Neutrallipidgehalts benötigt 3 Hauptkomponenten, die zusammen 98 % der Y-Varianz beschreiben. Das Bestimmtheitsmaß r^2 beträgt 0,990 für die Kalibration und 0,989 für die Validierung, der mittlere RMSEP liegt bei 0,7 RFI.

Das Modell zur Vorhersage des Gesamtproteingehalts enthält ebenfalls 3 Hauptkomponenten. Damit werden 88 % der Y-Varianz erfasst. Das Bestimmtheitsmaß r^2 wird zu 0,936 für die Kalibration und zu 0,929 für die Validierung berechnet, bei einem mittleren RMSEP von 0,3 RFI. Auch bei diesen Modellen werden die Offline-Daten des dritten Zyklus sehr gut vorhergesagt (siehe Abbildung (4.5.2.3.)).

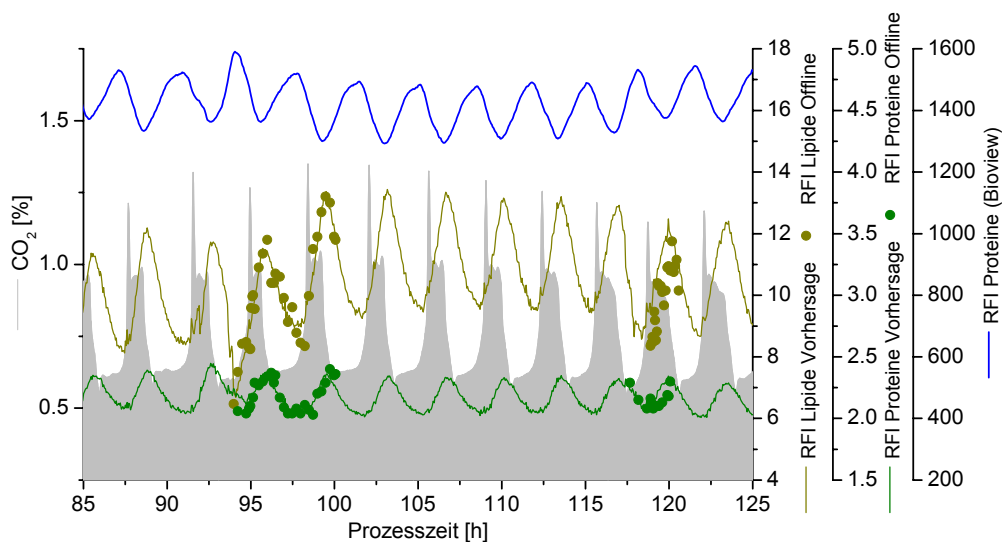


Abb. 4.5.2.3.: Ergebnis des PLS-Regressionsmodells zur Vorhersage des Neutrallipid- und Gesamtproteingehalts bei der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1, $D=0,16 \text{ h}^{-1}$; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO_2 -Produktion und der Proteinfluoreszenz

Gut zu erkennen ist hier auch wiederum der gegensätzliche Verlauf von tatsächlichem Proteingehalt und der mit dem BioView[®] detektierten Proteinfluoreszenz, dessen Ursache bereits in Kapitel (4.4.1.) diskutiert wurde.

Im betrachteten Zeitraum ist sowohl im Verlauf der CO_2 -Produktion als auch der Kulturfluoreszenz eine allmähliche Abnahme der Amplitude zu beobachten, was auf eine sinkende Synchronität der Kultur hindeutet. Dieser Verlauf wird auch in den Offline-Werten gefunden und durch sämtliche Modelle sehr gut vorhergesagt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Erstellung von PLS-Modellen alle in diesem Versuch bestimmten Offline-Größen mit tolerierbaren Fehlern aus den Fluoreszenzspektren vorhergesagt werden können. Damit ist die Möglichkeit gegeben, zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung einen Schätzwert der entsprechenden Variable zu erhalten und nicht auf eine Offline-Messung zurückgreifen zu müssen. Veränderungen in dem dynamischen System der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1 werden mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz zeitnah und nicht-invasiv erfasst, eine effektive Prozessbeobachtung wird somit möglich.

Für eine effektive Prozessregelung, die auf Modellen zur Vorhersage wichtiger Prozessgrößen basiert, ist die Übertragbarkeit eines Modells auf weitere Kultivierungen wesentlich. Im folgenden Schritt soll untersucht werden, ob diese Übertragung auch bei dem komplexen System der synchronen Kultur möglich ist, d.h., ob die aus den Fluoreszenzspektren und Offline-Größen der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1 erstellten Modelle in der Lage sind, die Offline-Größen anderer Kultivierungen aus deren Fluoreszenzspektren korrekt vorherzusagen.

4.6. Übertragbarkeit der Modelle

Die aus den Daten der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1 erstellten PLS-Modelle sollen zur Vorhersage der Offline-Größen bei zwei weiteren synchronen Kultivierungen herangezogen werden.

Die synchrone *S. cerevisiae*-Kultur H2 wurde bei einer Verdünnungsrate von $D=0,14 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Die Zyklusdauer beträgt 4 h ($\pm 10 \text{ min}$), und die Offline-Werte wurden während zweier Zyklen zwischen der 186. und 194. Kultivierungsstunde bestimmt.

Aus den Fluoreszenzspektren der Kultivierung H2 werden mit den entsprechenden Modellen der Kultivierung H1 die Offline-Größen Biotrockenmasse und Ethanolkonzentration, Lipid- und Proteingehalt sowie die Zellzyklusphasenanteile vorhergesagt. Es zeigt sich dabei zunächst, dass die Grundlinien der Fluoreszenz bei der Kultivierung H2 trotz identischer Prozessparameter deutlich niedriger liegen als bei der Kultivierung H1. Da die Modelle die Y-Daten auf der Basis von Absolutwerten voraussagen, wirken sich Änderungen in den relativen Fluoreszenzintensitäten auf den Betrag der Vorhersage aus. Die lineare Verschiebung der Vorhersage entlang der y-Achse ergibt das in Abbildung (4.6.1.) dargestellte Ergebnis für die Kultivierung H2.

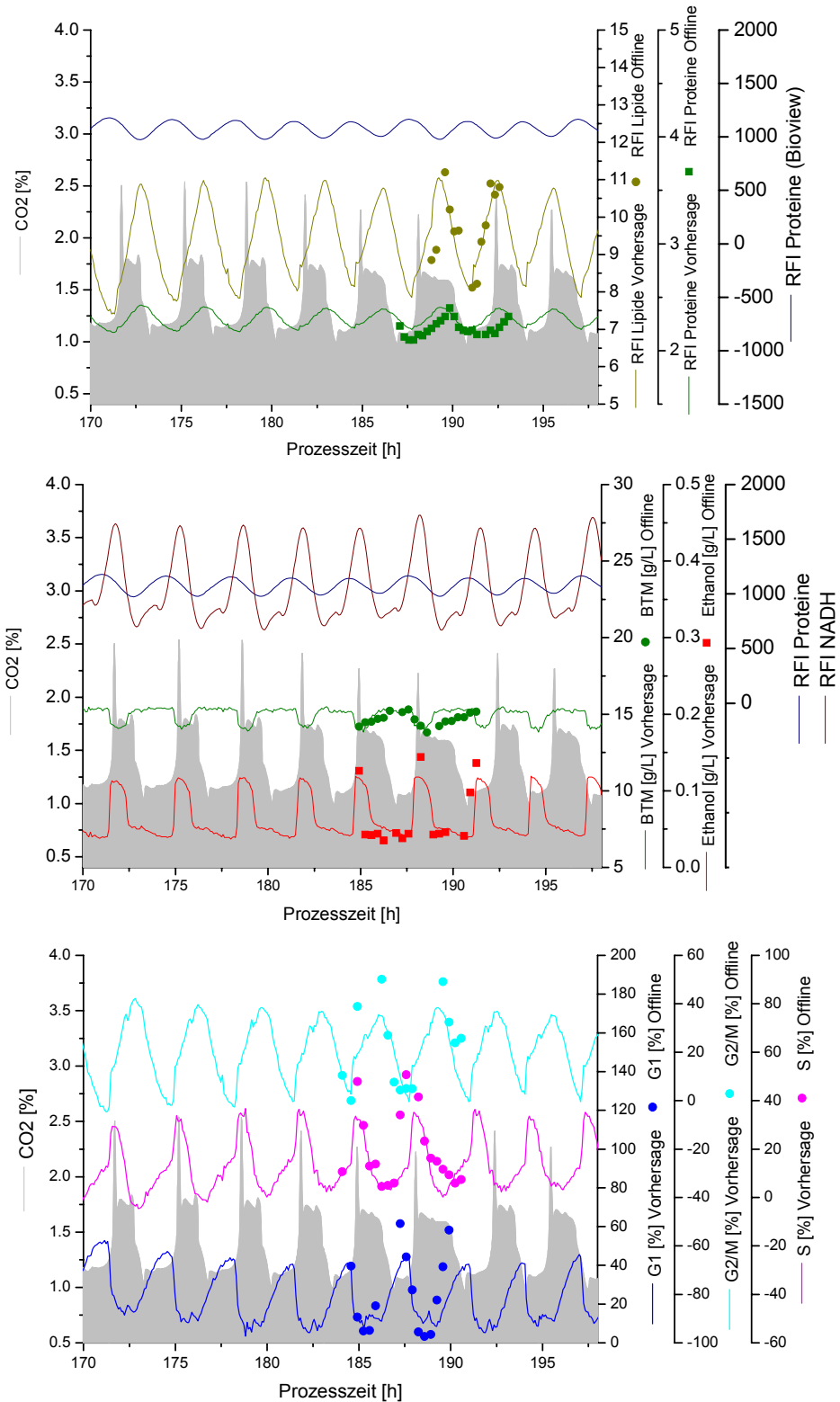


Abb. 4.6.1.: Vorhersage der Offline-Größen Biotrockenmasse, Ethanolkonzentration, Lipid- und Proteingehalt sowie Zellzyklusphasenanteile für die synchrone *S. cerevisiae*-Kultur H2, $D=0,14 \text{ h}^{-1}$, über PLS-Modelle der Kultivierung H1; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO₂-Produktion, der NADH- und der Proteinfluoreszenz der Kultivierung H2

Die Verläufe der Vorhersage stimmen mit den gemessenen Offline-Werten insofern gut überein, als dass Minima und Maxima richtig zugeordnet werden. Die Abhängigkeiten der Y-Daten von den einzelnen Fluoreszenzbereichen, die in der Komposition der Hauptkomponenten ausgedrückt ist, wird also bestätigt. Allerdings wird sowohl bei den Ethanolwerten als auch den Zellzyklusphasen eine zu geringe Amplitude vorhergesagt. Die Ursache hierfür ist hauptsächlich eine Verschiebung des NADH-Peaks in den Spektren der Kultivierung H2. Das Peakmaximum der NADH-Fluoreszenz liegt bei der Kultivierung H1 bei ex 350 nm/em 430 nm, bei der Kultivierung H2 bei ex 330 nm/em 450 nm. Die Varianz der Wellenlängenkombination ex 350 nm/em 430 nm, die in den Hauptkomponenten des PLS-Modells ausgedrückt wird, ist damit bei der Kultivierung H2 geringer. Demzufolge werden die Y-Variablen, deren Vorhersage auf den NADH-abhängigen PCs beruht, nämlich Ethanol und Zellzyklusphasenanteile, für die Kultivierung H2 zu niedrig vorhergesagt. Die Amplitude des Protein- und Lipidgehalts sowie der Biotrockenmasse wird dagegen richtig beschrieben. Die Proteinfluoreszenz, deren Varianz hierbei für die Vorhersage entscheidend ist, weist bei der Kultivierung H2 im Vergleich zu der Kultivierung H1 keine Verschiebung im Spektrum auf.

Das Ergebnis der Übertragung der PLS-Modelle auf die synchrone *S. cerevisiae*-Kultur H3 ist in Abbildung (4.6.2.) dargestellt. Die Kultivierung H3 wurde bei einer Verdünnungsrate von $D=0,15 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Die Zyklusdauer beträgt 3,75 h ($\pm 10 \text{ min}$), die Offline-Werte wurden während eines Zyklus' zwischen der 44. und 84. Kultivierungsstunde bestimmt.

Ebenso wie bei der Übertragung der PLS-Modelle der Kultivierung H1 auf die Kultivierung H2 ist auch hier eine lineare Verschiebung der Vorhersage entlang der y-Achse notwendig, um unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten der beiden Kultivierungen H1 und H3 auszugleichen. Im Vergleich zu der Kultivierung H2 tritt hier keine Peakverschiebung in den Spektren auf, die Amplitude der Offline-Größen wird korrekt vorhergesagt. Lediglich die Vorhersage der S-Phasenanteile liefert keine befriedigenden Ergebnisse. Weiterhin ist bei der Kultivierung H3 eine Drift in den Fluoreszenzverläufen zu erkennen, die sich in den Vorhersagen widerspiegelt. Betroffen ist vor allem die Vorhersage der Offline-Größen, deren meiste Varianz durch eine Hauptkomponente beschrieben wird, die nur von einem Fluoreszenzbereich beeinflusst ist. Eine Ursache für diese Grundliniendrift ist nicht eindeutig zu bestimmen. Es wurden keine äußeren Eingriffe in das System vorgenommen. Zu vermuten ist, dass physikalische Einflüsse (z.B. Ablagerungen von Zellmaterial am Sichtfenster, zunehmende Trübung) den Verlauf der Fluoreszenz beeinflusst haben.

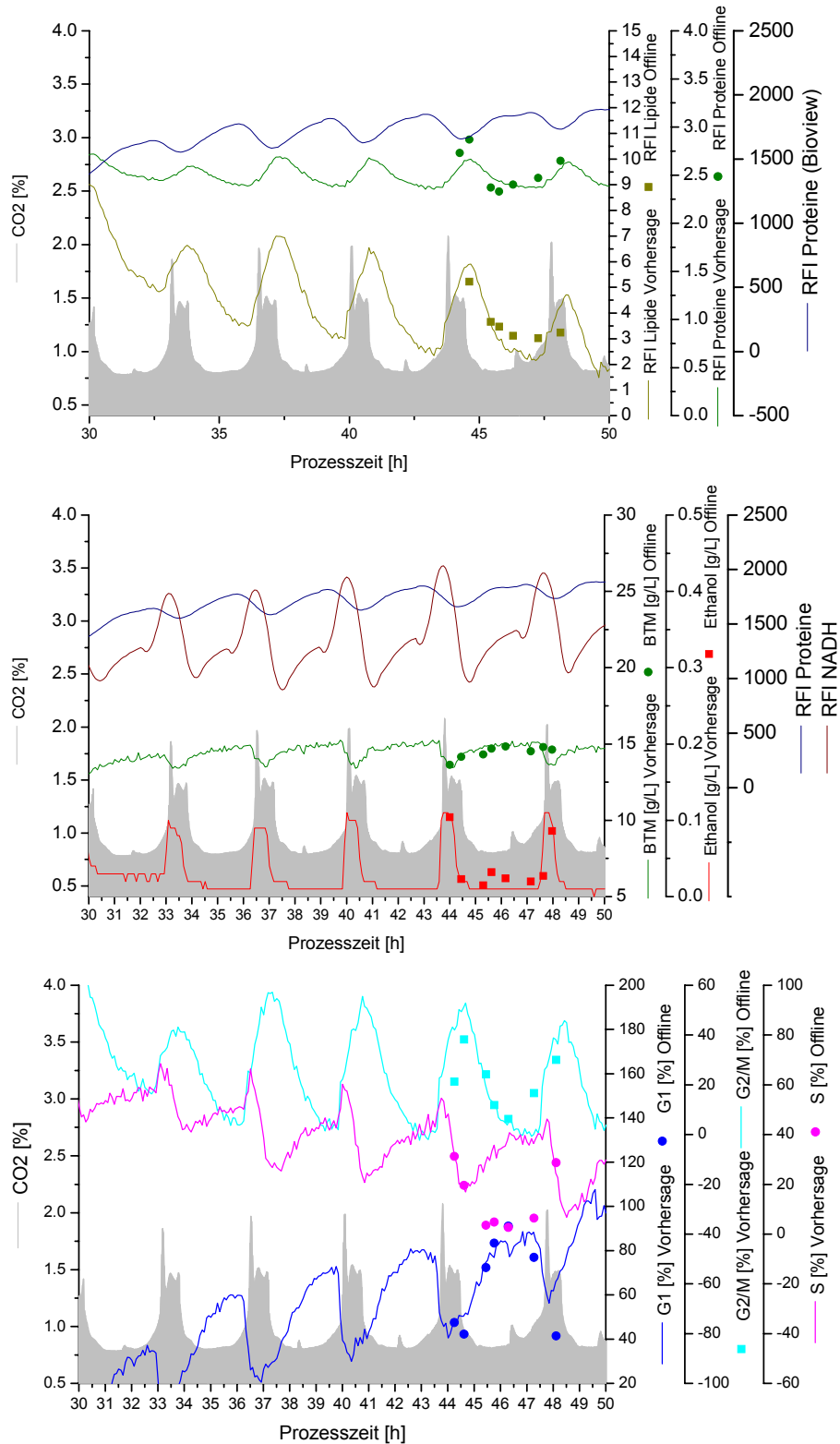


Abb. 4.6.2.: Vorhersage der Offline-Größen Biotrockenmasse, Ethanolkonzentration, Lipid- und Proteingehalt sowie Zellzyklusphasenanteile für die synchrone *S. cerevisiae*-Kultur H3, $D=0,15 \text{ h}^{-1}$, über PLS-Modelle der Kultivierung H1; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO_2 -Produktion, der NADH- und der Proteinfluoreszenz der Kultivierung H3

Bei der Beurteilung der Übertragbarkeit der PLS-Modelle der synchronen *S. cerevisiae*-Kultur H1 auf die Kultivierungen H2 und H3 ist zu beachten, dass die Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei den beiden letztgenannten Kultivierungen deutlich niedriger liegen als bei der Kultivierung H1. So durchlaufen bei der Kultivierung H2 maximal 50 % der Zellen gleichzeitig die S-Phase, bei der Kultivierung H3 sogar nur 31 %. Das bedeutet, die Synchronität der beiden Kultivierungen H2 und H3 ist deutlich geringer als die der Kultivierung H1. Der geänderte Wachstumsmodus beeinflusst die Fluoreszenzverläufe, was ebenfalls die Ursache für die niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten bei den beiden Kultivierungen H2 und H3 sein kann. Eventuell ist auch die unkorrekte Vorhersage des S-Phasenanteile bei der Kultivierung H3, die die geringste Synchronität aufweist, darauf zurückzuführen.

Alles in allem betrachtet, ist die Möglichkeit der Übertragung der Vorhersage auf weitere Kultivierungen durchaus gegeben. Nicht-biologische Einflüsse auf die Fluoreszenzintensität lassen sich beispielsweise durch den Zusatz eines internen Standards eliminieren. Verschiebungen und Drifts in der Grundlinie können durch simple mathematische Korrekturen ausgeglichen werden. Die Übertragung der Modelle wird lediglich durch die unterschiedliche Synchronität der verschiedenen Kultivierungen erschwert. Kontinuierliche Kultivierungen und synchrone Kulturen insbesondere sind vielfältigen Einflüssen ausgesetzt, die bei einfacheren Systemen wie Batch und Fedbatch-Kultivierungen auch wegen der im Allgemeinen kürzeren Kultivierungsdauer nicht so gravierend sind.

4.7. Zusammenfassung

Die Untersuchung des synchronen Wachstums von *S. cerevisiae* hat das Potenzial der 2D-Fluoreszenzspektroskopie hinsichtlich einer automatisierten, zeitnahen und nicht-invasiven Bioprozessbeobachtung aufgezeigt.

Synchrone *S. cerevisiae*-Kulturen zeigen über einen langen Zeitraum periodische Veränderungen biologischer, chemischer und physikalischer Prozessgrößen, die über komplexe Wechselwirkungen miteinander in Beziehung stehen. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist in der Lage, diese hoch dynamischen Veränderungen zu erfassen.

Bei der synchronen Kultur H1 konnten bei einer Verdünnungsrate von $D=0,16 \text{ h}^{-1}$ stabile Oszillationen über einen Zeitraum von 110 h beobachtet werden. Die mit dem BioView[®]-Sensor im 3-Minutentakt aufgenommenen Fluoreszenzverläufe zeigen ebenfalls periodische Änderungen. Über eine Hauptkomponentenanalyse wurde eine erhebliche Reduktion der Fluoreszenzdaten erreicht. Die Hauptkomponenten werden durch die Varianz der NADH-, Protein- und Flavin-abhängigen Fluoreszenz bestimmt. Im Scoreplot ist dabei ein zyklischer Verlauf zu erkennen, die auftretenden Gruppen von Spektren lassen sich den Zellzyklusphasen zuordnen. Die Untersuchung der zellzyklusabhängigen Genexpression ergab 690 Gene, die in S- und G2/M-Phase unterschiedlich reguliert sind und die zellzyklusrelevanten Funktionen zugeordnet werden konnten.

Über die Fluoreszenzmessung können auch Informationen über nicht-fluoreszierende Prozessvariablen zugänglich gemacht werden, wie z.B. Substratkonzentration und Zellinhaltsstoffe. Durch die Erstellung von PLS1-Modellen konnten bei der Kultivierung H1 aus den Fluoreszenzspektren für jeden Zeitpunkt der Kultivierung wichtige Offline-Größen vorhergesagt werden. Der Fehler der Vorhersage liegt für die Biotrockenmasse bei 5 %, für die Ethanolkonzentration bei 6 %, für die Zellzyklusphasenanteile bei 8 - 9,4 %, für den Lipidgehalt bei 6 % und für den Proteingehalt bei 8 %. Bei gleicher Verdünnungsrate wurden diese Offline-Größen auch für folgende Zyklen korrekt berechnet.

Die Übertragung der PLS-Modelle zur Vorhersage relevanter Prozessvariablen auf zwei weitere synchrone Kulturen (H2 und H3) mit unterschiedlicher Verdünnungsrate wurde mit kleinen Einschränkungen erreicht. In beiden Fällen war auf Grund veränderter Fluoreszenzniveaus eine Verschiebung der Grundlinie nötig. Trotz geringerer Synchronität der Kultivierungen H2 und H3 wurden die Abhängigkeiten und Verläufe durch die mit der synchronen Kultur H1 erstellten Modelle richtig beschrieben.

5. Fedbatch-Kultivierungen von *S. cerevisiae*

Aerobe Hefe Fedbatch - Kultivierungen mit einer geregelten Substratversorgung (Glucose) sind die vorherrschende Technik zur industriellen Produktion von *S. cerevisiae* als Backhefe und zur Produktion rekombinanter Proteine [Copella et al., 1990]. Gewöhnlich wird zur Substratregelung zunächst ein exponentielles Fütterungs- (Feed)-profil gefahren, das zu oxidoreduktivem Wachstum mit einer spezifischen Wachstumsrate entsprechend dem Exponenten der Feedrate führt. Aufgrund des Crabtree-Effekts wird dabei Ethanol gebildet, welches in einer anschließenden Phase mit konstanter Feedrate wieder abgebaut wird. In dieser quasi-stationären Phase mit gleichbleibend geringer Glucosekonzentration sinkt die spezifische Wachstumsrate [Pham et al., 1998]. Wie bereits in Kapitel (4.1.2.) beschrieben, verringert die Ethanolproduktion die Ausbeute an Biomasse. Die benötigte Substratmenge stellt einen entscheidenden Kostenfaktor bei industriellen Prozessen dar. Aus ökonomischen Gründen werden daher meist glucose-limitierte Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt, um die Ethanolproduktion zu begrenzen [van Hoek et al., 1999]. Grundlage der Optimierung eines Bioprozesses ist eine zeitnahe Prozessbeobachtung, die in der Praxis zumeist an dem Fehlen zuverlässiger Messsysteme zum Online-Monitoring scheitert [Harms et al., 2002]. In Kapitel (4) wurde die 2D-Fluoreszenzspektroskopie als modernes In-situ-Verfahren zur effektiven Bioprozessbeobachtung vorgestellt. Im Folgenden soll unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine Glucoseregulung für *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen realisiert werden, die eine maximale Biomassenausbeute bei minimaler Ethanolproduktion gewährleistet. Über eine vorgeschaltete Fedbatch-Kultivierung, bei der mit Hilfe einer FIA-Anlage zur schnellen Glucosemessung ein Sollwertprofil eingestellt wird, sollen mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie Änderungen im Stoffwechsel erfasst werden. Aus den Spektren soll in Zusammenarbeit mit *M. Kollecker* anschließend ein Regelungsmodell erstellt werden, das es erlaubt, den Prozess rein oxidativ bis zur höchsten Feedrate zu fahren und eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute zu erreichen.

5.1. Grundlagen zur fluoreszenzbasierten Glucoseregulung

Die begrenzte Atmungskapazität der Hefe *S. cerevisiae* führt oberhalb einer kritischen Glucosekonzentration trotz aerober Bedingungen zur Produktion von Ethanol (Crabtree-Effekt). Die Stoffwechsellumstellung von oxidativ zu oxidoreduktiv ist unmittelbar mit einer Konzentrationsänderung biogener Fluorophore verbunden. Bei rein oxidativem Wachstum steigt die Konzentration an

den Elektronencarriern NADH und den Coenzymen FAD und FMN entsprechend des Zellwachstums kontinuierlich an. Dementsprechend wird ein stetiger Anstieg der Fluoreszenzintensitäten gemessen. Zur Produktion von Ethanol wird zusätzlich NADH benötigt, welches die Elektronen auf Acetaldehyd überträgt und dieses zu Ethanol reduziert. Für die Bereitstellung des Reduktionsmittels wird der Citratzyklus kurzfristig unterbrochen, die Konzentration an reduzierten Redoxäquivalenten (wie NADH, FADH₂ und FMNH₂) steigt dabei in der Zelle stark an. Gleichzeitig sinkt die Konzentration der fluoreszierenden oxidierten Formen FAD und FMN (siehe auch Kapitel (4.4.1.)). Diese starken Konzentrationsänderungen können über die Fluoreszenzmessung detektiert werden und dienen als Signal für die bevorstehende Umstellung des Stoffwechsels [Schügerl et al., 1993]. Abbildung (5.1.1.) zeigt das 2D-Fluoreszenz-Differenzspektrum einer *S. cerevisiae*-Kultur bei oxidativem und oxidoreduktivem Wachstum.

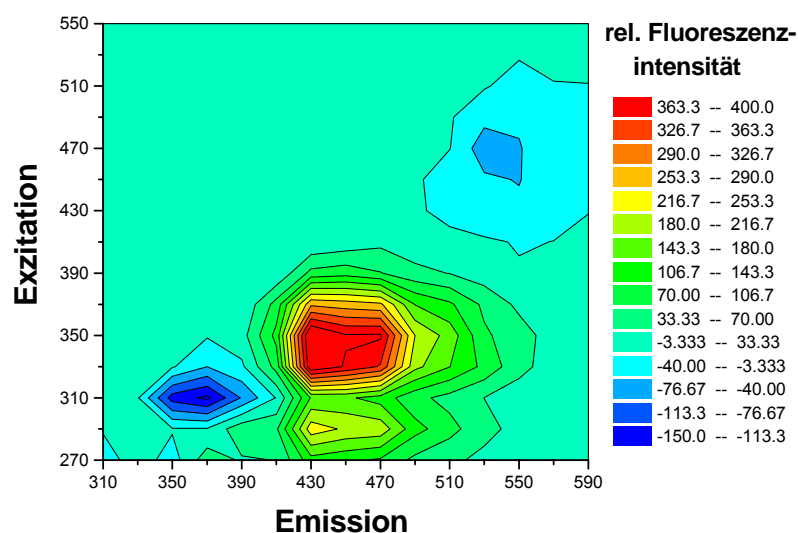


Abb. 5.1.1.: 2D-Fluoreszenz-Differenzspektrum einer *S. cerevisiae*-Kultur nach dem Übergang von oxidativem zu oxidoreduktivem Stoffwechsel

Deutlich zu erkennen ist der starke Anstieg der Fluoreszenzintensität im NADH-Bereich (ex350/em450) sowie die geringere Fluoreszenzintensität im Flavinbereich (ex470/em510) des Spektrums.

Die kritische Glucosekonzentration, oberhalb derer der Crabtree-Effekt einsetzt, liegt je nach Versuchsbedingungen bei ungefähr 0,04 g/L [Pham et al., 1998]. In einer ersten Fedbatch-Kultivierung soll die kritische Glucosekonzentration durch eine Regelung basierend auf FIA-Messwerten auf verschiedene Sollwerte eingestellt werden, um die Stoffwechselumstellung zu erzwingen und mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zu erfassen. Darauf aufbauend wird anschließend ein

Modell zur fluoreszenzbasierten Regelung der Glucosekonzentration entwickelt und dieses an zwei weiteren Fedbatch-Kultivierungen getestet.

5.2. Kultivierungsparameter und Durchführung

Es werden drei Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt (FB1-FB3). Zur Produktion von ausreichend Biomasse wird vor jeder Fedbatch-Kultivierung eine Batch-Kultivierung mit einer Substratkonzentration von 15 g/L Glucose durchgeführt. Nach einer zweistündigen Hungerphase, um definierte Startbedingungen zu erhalten, wird die Fedbatch-Kultivierung gestartet. Versuchsaufbau und Medienzusammensetzung sind im Anhang (10.3.) und (10.4.1.) aufgeführt. Bei den Kultivierungen FB1 und FB2 wird die Glucosemessung über eine FIA-Anlage durchgeführt (siehe Kapitel (3.6.)) [Hüll, 2002]. Die Glucosemessung bei der Kultivierung FB3 erfolgt in Offline-Proben reflektometrisch mit Reflectoquant[®]-Messstreifen (Anhang (10.7.4.)). Die Tabelle (5.2.1.) gibt eine Übersicht über die Parameter der drei durchgeführten *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen.

Tab. 5.2.1.: Parameter der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen FB1 - FB3

Kultivierung	FB1	FB2	FB3
Prozesskontrolle	Glucose-FIA	2D-Fluoreszenzspektroskopie	
Reaktor-Startvolumen [L]	1,2	1,0	1,7
pH	5,5		
Rührerdrehzahl [rpm]	1200		
Begasung (Pressluft) [L/min]	5		
Glucosekonzentration Feed [g/L]	75	50	50
BioView [®] -Messintervall [s]	90		

Die zur Förderung der Feed-Lösung eingesetzte Pumpe (Modell ACCU CP10, SciLog, USA) wird von einem Prozessleitreechner gesteuert, der bei der Kultivierung FB1 über eine serielle Schnittstelle mit der FIA-Anlage verbunden ist, und bei den Kultivierungen FB2 und FB3 mit dem Messrechner des BioView[®]-Sensors.

5.3. FIA-basierte Glucoseregulation der Fedbatch-Kultivierung FB1

Ausgehend von einem Startvolumen von 1,2 L und einer Start-Biotrockenmasse von 4,5 g/L wurde über 14 h eine Glucose-geregelte Fedbatch-Kultivierung durchgeführt (Abbildung (5.3.1.)) In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die kritische Glucosekonzentration für den hier verwendeten *S. cerevisiae*-Stamm H620 unter den gegebenen Bedingungen bei 0,05 g/L Glucose liegt. Davon ausgehend wurde der Sollwert im Laufe der Kultivierung fünf Mal um verschiedene Beträge erhöht, um die Umstellung des Stoffwechsels von oxidativ zu oxidoreduktiv zu bewirken.

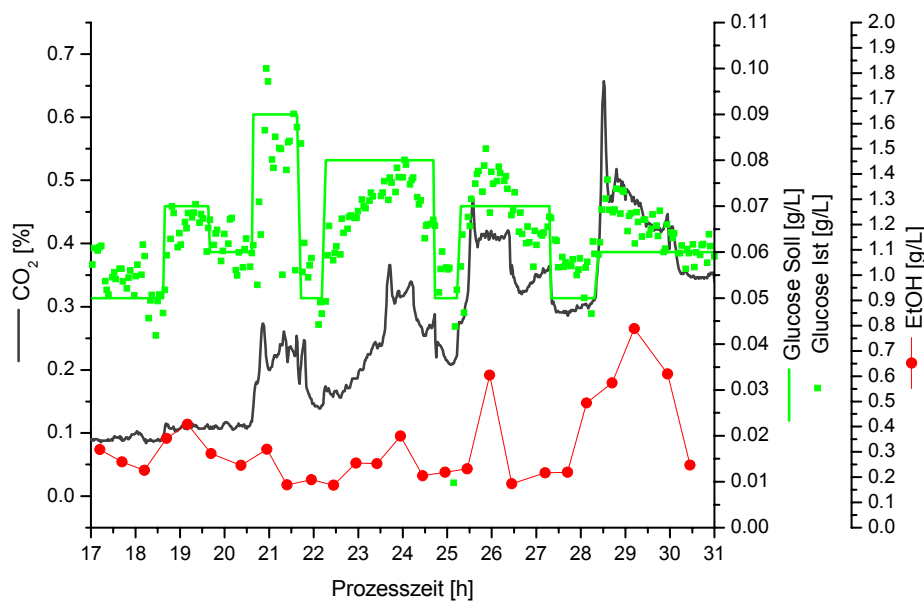


Abb. 5.3.1.: Verlauf der CO₂-Produktion, der Glucosekonzentration und der Ethanolkonzentration während verschiedener Glucose-Sollwerte bei der FIA-basierten Glucoseregulation der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierung FB1; T=30°C, pH 5,5, 1200 rpm, 5 L/min Pressluft

Wie in der Abbildung (5.3.1.) zu erkennen ist, werden die manuell eingestellten Glucose-Sollwerte in der Kulturbrühe teilweise mit Verzögerung und nicht präzise erreicht. Ursache hierfür ist die zeitverzögerte FIA-Messung durch die Verzögerungszeit des Probenahmemoduls ($t_{90} \cong 4$ min, [Hüll, 2002]). Das System reagiert jedoch sehr gut auf die tatsächliche Glucosekonzentration. In den Phasen niedriger Konzentration ist keine verstärkte Ethanolproduktion zu erkennen. Überschreitet die Glucosekonzentration einen kritischen Wert, setzt der oxidoreduktive Stoffwechsel ein und Ethanol wird vermehrt produziert (in Abb. (5.3.1.) bei ca. 21 h, 24 h, 26 h und 28,5 h). Die Stoffwechselumstellung ist

ebenfalls anhand der sprunghaft ansteigenden CO_2 -Produktion zu erkennen. Der RQ steigt in diesen Phasen deutlich über 1 (nicht dargestellt).

Die überdurchschnittlich hohe Ethanolproduktion zum Ende der Kultivierung ist auf die zunehmende Sauerstofflimitierung zurückzuführen. Bei Sättigungswerten von weniger als 30 % Gelöstsauerstoff ist rein oxidativer Stoffwechsel ohnehin erschwert und die Ethanolproduktion nicht mehr allein von der Glucosekonzentration abhängig. Die Kultivierung wurde aus diesem Grund nach der 31. Stunde beendet. Der Verlauf des Gelöstsauerstoff-Gehalts und die mit dem BioView® aufgenommenen Fluoreszenzverläufe im NADH- und Flavinbereich sind in Abbildung (5.3.2.) gezeigt.

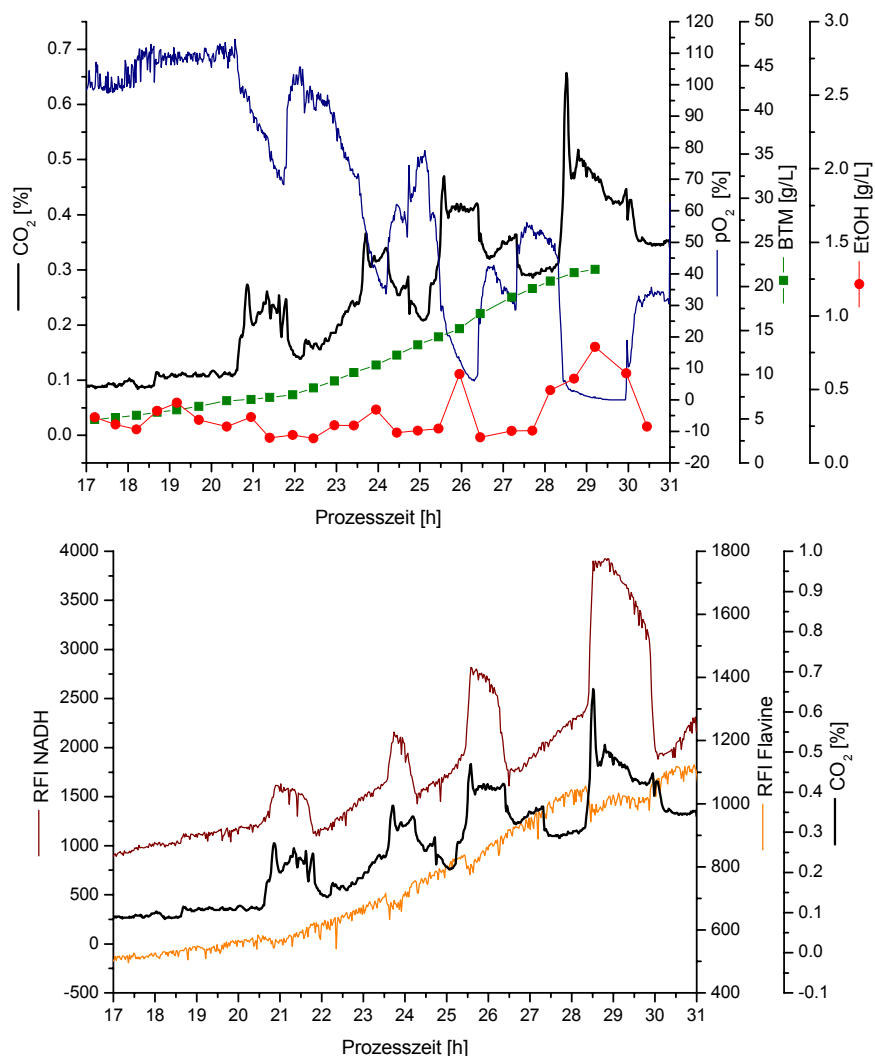


Abb. 5.3.2.: Verlauf der CO_2 -Produktion, des Gelöstsauerstoff-Gehalts, der Biotrockenmasse, der Ethanolkonzentration sowie die Verläufe der NADH- und Flavinfluoreszenz während verschiedener Glucose-Sollwerte bei der FIA-basierten Glucoseregulierung der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierung FB1; $T=30^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,5$, 1200 rpm, 5 L/min Pressluft

Die Fluoreszenzverläufe zeigen sehr schön den auf der Stoffwechsellumstellung begründeten Verlauf. Während die Intensität der NADH-Fluoreszenz sprunghaft ansteigt, sinken die Fluoreszenzintensitäten im Flavinbereich. Die Informationen, die in den Fluoreszenzspektren enthalten sind, sollen im Folgenden zur Entwicklung eines Modells genutzt werden, das die Regelung der Glucosekonzentration auf deren Basis erlaubt.

5.4. Modell zur fluoreszenzbasierten Glucoseregulation bei Fedbatch-Kultivierungen

Zur Modellerstellung wird zunächst ein Ethanolproduktions- (EP)-Wert definiert, der die Werte Null (keine Ethanolproduktion) und Eins (Ethanolproduktion) annimmt. Jedem Spektrum der Kultivierung FB1 wird ein EP-Wert zugeordnet. Anschließend wird mit der Software The Unscrambler[®] ein PLS-Modell erstellt, um die EP-Werte mit den Spektren zu korrelieren [Kollecker, 2004]. Das Modell nutzt drei Hauptkomponenten, die nahezu die gesamte Varianz der EP-Werte beschreiben und hauptsächlich von der NADH-Fluoreszenz abhängen. Durch die Vorhersage des EP-Wertes und Festlegung eines Schwellenwerts wäre es bei der Kultivierung FB1 theoretisch bereits möglich, die Stoffwechsellumstellung von oxidativ zu oxidoreduktiv aus den Spektren vorherzusagen. Aufgrund der bereits in Kapitel (4.6.) beschriebenen Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensitäten von den Kultivierungsbedingungen ist so allerdings eine Übertragung des Modells auf andere Kultivierungen nicht möglich. Durch Verschiebung der Grundlinien der Fluoreszenzverläufe wird ein jeweils abweichender EP-Wert berechnet, ein allgemeingültiger Schwellenwert ist somit nicht festzusetzen.

Zur Kompensation der Grundlinienverschiebung wird daher für die Prozessregelung die zeitliche Änderung des EP-Werts verwendet, die sich aus der Ableitung der EP-Funktion unter Verwendung eines Savitzky-Golay-Filters ergibt [Kollecker, 2004]:

$$EP'_n = \frac{-2EP_{n-4} - EP_{n-3} + EP_{n-1} + 2EP_n}{10\Delta t} + \frac{4EP_{n-4} - 2EP_{n-3} - 4EP_{n-2} - 2EP_{n-1} + 4EP_n}{7\Delta t} \quad (5.4.1.)$$

In dieser Gleichung ist n der Index der Messung und $\Delta t=0,027$ h das Messintervall des BioView[®]-Sensors.

Aus der Ableitung der EP-Werte wird mit Hilfe eines rekursiven Filters mit nachlassendem Gedächtnis das Rauschen reduziert und der **Metabolische (MB-) Wert** nach folgender Gleichung berechnet:

$$MB_n = EP'_n \cdot A + EP'_{n-1} \cdot (1 - A) \quad ; A=0,25 \quad (5.4.2.)$$

Über die Berechnung des MB-Werts aus den 2D-Fluoreszenzspektren ist die Möglichkeit gegeben, bei verschiedenen Kultivierungen den metabolischen Zustand der Kultur vorherzusagen und somit den Übergang zu oxidoreduktivem Stoffwechsel bei *S. cerevisiae* zu detektieren. In Abbildung (5.4.1.) sind die berechneten MB-Werte zusammen mit dem Verlauf der CO₂-Produktion und der NADH-Fluoreszenz bei der Fedbatch-Kultivierung FB1 dargestellt. Bei einem MB-Wert größer 1 findet oxidoreduktiver Stoffwechsel statt.

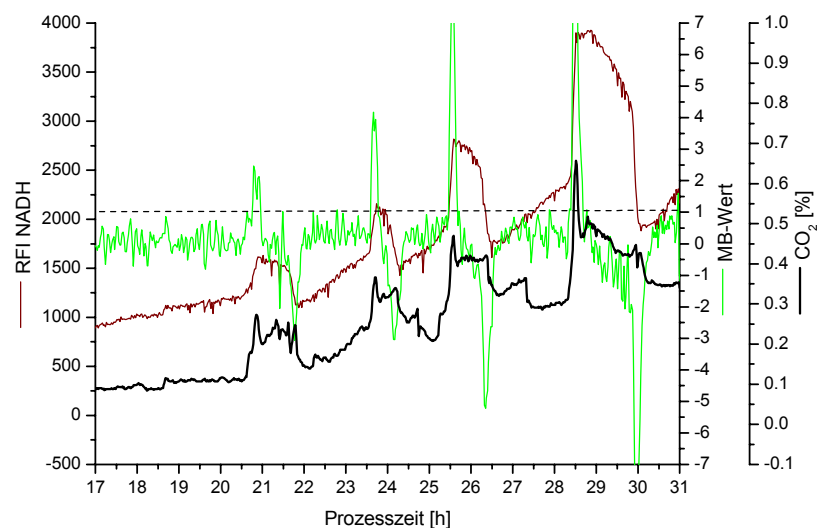


Abb. 5.4.1.: Berechnete MB-Werte, Verlauf der CO₂-Produktion und NADH-Fluoreszenz während verschiedener Glucose-Sollwerte bei der FIA-basierten Glucoseregulation der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierung FB1; T=30°C, pH 5,5, 1200 rpm, 5 L/min Pressluft

Zur Steuerung der Feedpumpe wird ein Programm in Borland Pascal 7.0 geschrieben, das ein einfaches dynamisches Zustandsmodell mit exponentiellem Wachstum verwendet [Kollecker, 2004]. Als Zustandsvariablen dienen darin die Biotrockenmasse, die Glucosekonzentration sowie das Reaktorvolumen. Das Modell wird über die Lösung folgender Differenzialgleichungen mit Hilfe eines Runge-Kutta-Verfahrens erstellt:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{Modell} \cdot X(t) - (\dot{V}_{Feed}(t) - \dot{V}_{Probe}) \cdot \frac{X(t)}{V(t)} \quad (5.4.3.)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{Modell} \cdot X(t)}{Y} + \frac{\dot{V}_{Feed}(t)}{V(t)} \cdot (S_0 - S(t)) \quad (5.4.4.)$$

$$\frac{dV}{dt} = \dot{V}_{Feed}(t) - \dot{V}_{Probe} \quad (5.4.5.)$$

mit:

$X(t)$ = Biotrockenmasse

μ_{Modell} = spezifische Wachstumsrate des Modells

$\dot{V}_{Feed}(t)$ = Pumprate der Feedpumpe

\dot{V}_{Probe} = Pumprate des Probenstromes der FIA

Y = Ausbeutekoeffizient ($Y = 0,5 \text{ g}_{BTM}/\text{g}_{Glucose}$)

$V(t)$ = Reaktorvolumen

$S(t)$ = Glucosekonzentration

S_0 = Glucosekonzentration der Feed-Lösung

t = Zeit

Die Pumprate $\dot{V}_{Feed}(t)$ berechnet sich auf Basis des Modells damit zu

$$\dot{V}_{Feed}(t) = \frac{\mu \cdot X(t) \cdot V(t)}{Y \cdot (S_0 - S(t))} \quad (5.4.6.)$$

Die spezifische Wachstumsrate des Modells ist etwas größer als die reale spezifische Wachstumsrate der Zellen, so dass kontinuierlich mehr Glucose zugefüttert als tatsächlich umgesetzt wird. Die dadurch ansteigende Glucosekonzentration im Reaktor führt letztlich zum Erreichen einer Schwellenkonzentration, bei der die kritische Glucoseaufnahme überschritten wird und oxidoreduktiver Stoffwechsel einsetzt. Durch die ständige Berechnung des MB-Werts aus den 2D-Fluoreszenzspektren wird diese Änderung vom Regelsystem erkannt. Die Pumprate wird zunächst drastisch reduziert und statt des exponentiellen Fütterungsprofils wird während der nächsten 0,15 h ein besonderes Profil gefahren, um die Zellen die im Überschuss vorhandene Glucose abbauen zu lassen. Die während dieser Zeit berechneten MB-Werte werden bei der Regelung nicht berücksichtigt, da die geänderten Bedingungen eine Anpassungsphase erfordern. Die Biomasse des Zustandsmodells wird um 5 % reduziert, bevor die automatische Zufütterung fortgesetzt wird [Kollecker, 2004]. Basierend auf den eben beschriebenen Algorithmen soll im Folgenden eine fluoreszenzbasierte Glucoseregulation bei *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt werden.

5.5. Fluoreszenzbasierte Glucoseregulation bei *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen

5.5.1. *S. cerevisiae*-Kultivierung FB2

Die erste fluoreszenzbasierte Glucoseregulation bei der Kultivierung FB2 wird über einen Zeitraum von 6 h durchgeführt. Während dieser Zeit werden alle 90 s vollständige 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen. Aus jedem Spektrum wird mit Hilfe des Modells umgehend der MB-Wert berechnet. Der kritische MB-Wert, oberhalb dessen der oxidoreduktive Stoffwechsel einsetzt, liegt bei 1. In Abbildung (5.5.1.1.) sind die Verläufe der wesentlichen Variablen während der Kultivierung FB2 dargestellt.

Während des Prozesses wird die Pumprate 6-mal automatisch reduziert, weil eine Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahme erfolgt und ein MB-Wert größer 1 berechnet wird (im Diagramm durch Pfeile markiert). Bei der ersten Überschreitung wird dennoch eine geringe Menge Ethanol produziert, die dann im weiteren Verlauf aber auf konstantem Niveau bleibt. Diese gleich bleibend vorhandene Ethanolmenge schließt zudem eine mögliche Glucoselimitierung aus. Im Vergleich zu der Kultivierung FB1 tritt hier keine Sauerstofflimitierung auf.

In den 6 h werden insgesamt 16,5 g Glucose zugefüttert, währenddessen nimmt die Biotrockenmasse stetig von 7,1 g/L auf 15,7 g/L zu. Die Ausbeute über den betrachteten Zeitraum liegt bei 0,53 g BTM/g Glucose, was auf einen rein oxidativen Stoffwechsel schließen lässt. Ausbeuten, die bei oxidoreduktivem Stoffwechsel erreicht werden, liegen deutlich niedriger bei ca. 0,3 g BTM/g Glucose. Bei der Berechnung der Ausbeute wird der Verlust an Biomasse durch die Offline-Proben berücksichtigt.

Die Glucosekonzentration im Reaktor, die online über eine FIA gemessen wird, liegt konstant im Bereich der kritischen Konzentration von 0,04-0,05 g/L, d.h., die gesamte Glucose wird sofort verstoffwechselt. Bei jedem Regelungseingriff ist das kurzfristige Absinken der Glucosekonzentration aufgrund der reduzierten Pumprate zu erkennen.

Die beginnende Stoffwechsellumstellung ist sowohl im Verlauf der CO₂-Produktion als auch in der NADH-Fluoreszenz zu beobachten. Im Flavinderbereich sind die Änderungen der relativen Fluoreszenzintensitäten bei dieser Kultivierung auch aufgrund des Rauschens nicht so gut zu erkennen. Der Verlauf der Protein-Fluoreszenz korrespondiert mit der Entwicklung der Biomasse, was bereits in Kapitel (4.4.1.) bei der Beobachtung des synchronen Wachstums von *S. cerevisiae* beobachtet wurde.

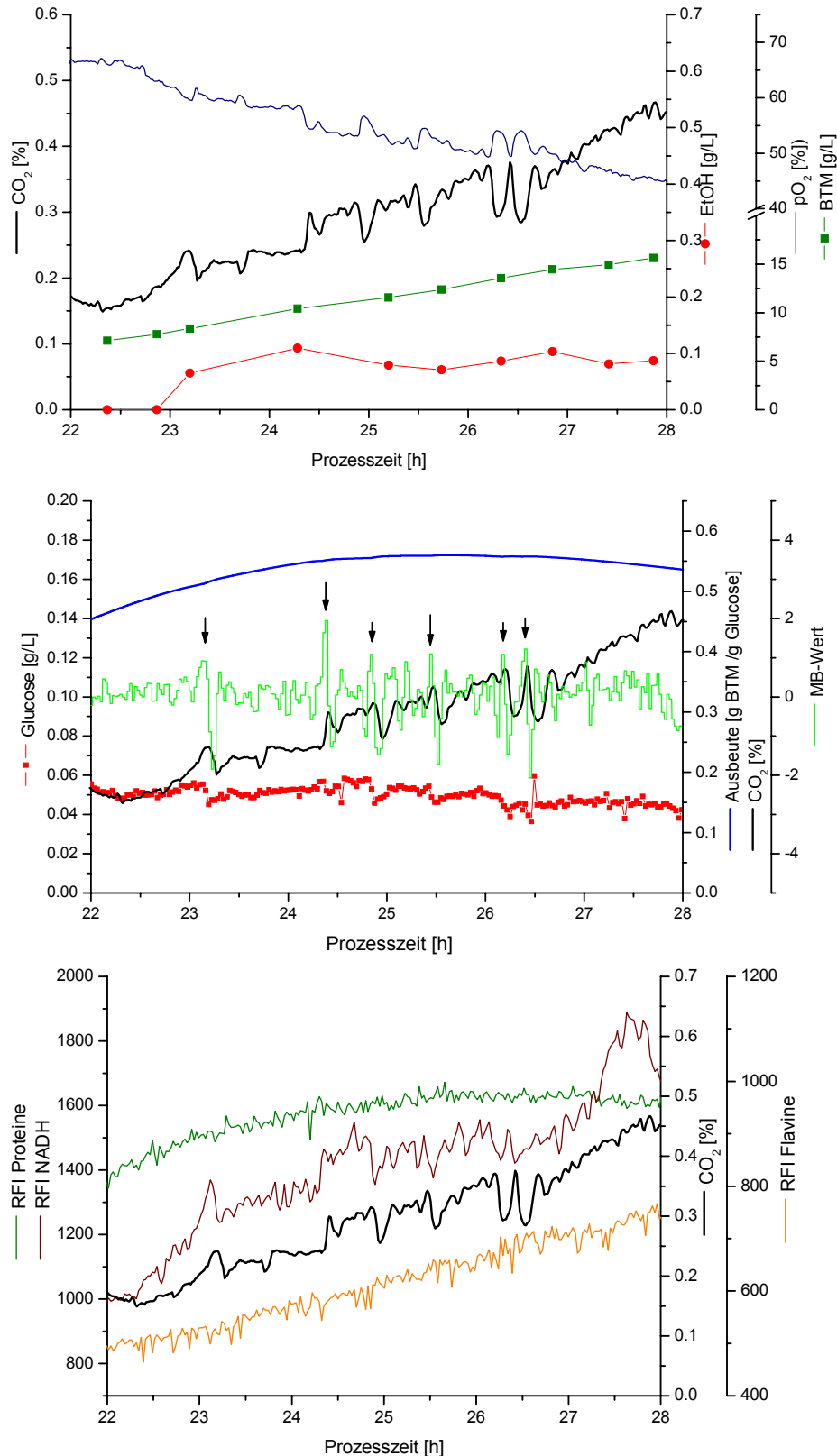


Abb. 5.5.1.1.: Verlauf der CO_2 -Produktion, des Gelöstsauerstoff-Gehalts, der Biotrockenmasse, der Ethanolkonzentration, der Glucosekonzentration; Verlauf des MB-Werts und des Ausbeutekoeffizienten sowie Verläufe der NADH-, Protein- und Flavinfluoreszenz während der fluoreszenzbasierten Glucoseregulation der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierung FB2; T=30°C, pH 5,5, 1200 rpm, 5 L/min Pressluft

Die Ergebnisse der Kultivierung FB2 zeigen, dass das in Kapitel (5.4.) beschriebene Zustandsmodell und die darauf basierende Prozesssteuerung in Kombination mit den aus den 2D-Fluoreszenzspektren berechneten MB-Werten die Überwachung des metabolischen Zustands der Kultur und die rein oxidative Prozessführung grundsätzlich möglich macht. Die zu Beginn auftretende Ethanolproduktion basiert auf dem grundlegenden Problem, dass die Zellen nach der vorausgegangenen Hungerphase nach der Batch-Kultur nicht sofort exponentiell wachsen, sondern eine kurze lag-Phase durchlaufen wird. In der nächsten Kultivierung FB3 wird daher das Anfahrprofil zu Beginn der Fütterung dieser Adaptionsphase angepasst [Kollecker, 2004].

5.5.2. *S. cerevisiae*-Kultivierung FB3

Die Durchführung und Regelung entspricht bis auf das geänderte Anfahrprofil der Kultivierung FB2.

Bei der zweiten fluoreszenzbasierten Glucoseregulation FB3 (Abbildung (5.5.2.1.)) werden über 11 h 63 g Glucose zugefüttert. Die Biotrockenmasse steigt von 4,5 g/L auf 15,1 g/L.

Im betrachteten Zeitraum werden 5 Regelungseingriffe automatisch durchgeführt. Obwohl die kritische Glucoseaufnahme rate mehrmals erreicht wird, wird die Produktion von Ethanol durch die rechtzeitige Reduzierung der Pumprate bei dieser Kultivierung auch in der Anfangsphase komplett unterdrückt. Die Ausbeute über den betrachteten Bereich liegt sehr hoch bei 0,58 g BTM/g Glucose. Auch hier werden zur Berechnung die Volumenzunahme durch die Fütterung und der Verlust an Biomasse durch die Offline-Proben berücksichtigt. Ebenso wie bei der Kultivierung FB2 tritt keine Sauerstofflimitierung auf, und die offline bestimmten Glucosekonzentrationen liegen im Bereich der kritischen Konzentration um 0,04 g/L. Im Verlauf der Fluoreszenzintensität von NADH und der CO₂-Produktion ist auch hier wieder die beginnende Stoffwechsellumstellung gut zu erkennen.

Durch die Anpassung des Anfahrprofils konnte bei der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierung FB3 eine optimale Fütterung bei hoher Ausbeute und rein oxidativem Stoffwechsel erreicht werden. Dieses Ergebnis konnte bei weiteren Fedbatch-Kultivierungen bestätigt werden.

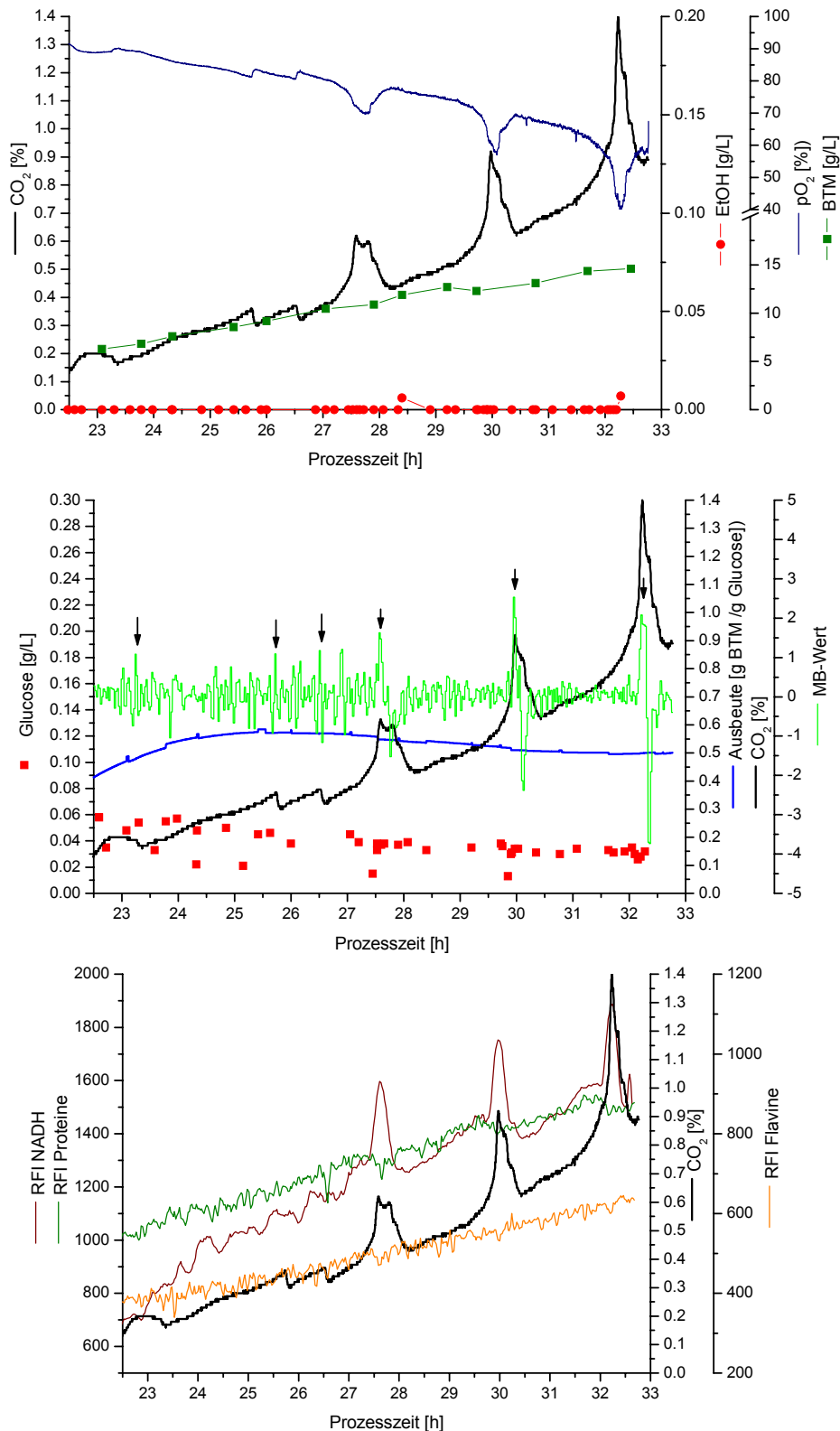


Abb. 5.5.2.1.: Verlauf der CO_2 -Produktion, des Gelöstsauerstoff-Gehalts, der Biotrockenmasse, der Ethanolkonzentration, der Glucosekonzentration; Verlauf des MB-Werts und des Ausbeutekoeffizienten sowie Verläufe der NADH-, Protein- und Flavinfluoreszenz während der fluoreszenzbasierten Glucoseregulation der *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierung FB3; T=30°C, pH 5,5, 1200 rpm, 5 L/min Pressluft

5.6. Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ein ausgezeichnetes Verfahren zur Regelung von Bioprozessen darstellt.

Anhand von *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen wurde eine Prozessregelung entwickelt, die eine optimale Glucosezufütterung garantiert. Hefen produzieren aufgrund des Carbtrees-Effekts trotz aerober Bedingungen oberhalb einer kritischen Glucosekonzentration Ethanol, wodurch die Ausbeute an Biomasse herabgesetzt wird.

Bei der FIA-basierten Glucoseregulation der Kultivierung FB1 wurde die Stoffwechsellumstellung von oxidativ zu oxidoreduktiv durch Sollwertänderungen der Glucosekonzentration definiert hervorgerufen und konnte über die Änderungen der Fluoreszenzintensität vor allem im NADH- und Flavinbereich frühzeitig detektiert werden.

Zur fluoreszenzbasierten Prozessregelung wurde aus den Daten der Kultivierung FB1 ein übertragbares Modell erstellt, das es erlaubt, einen Metabolischen Wert aus den Fluoreszenzspektren zu berechnen, der Auskunft über den unmittelbaren Stoffwechselzustand der Kultur gibt. In Kombination mit einem auf einem einfachen Zustandsmodell basierenden Feedprofil konnte bei der Kultivierung FB2 bereits eine sehr gute Ausbeute von 0,53 g BTM/g Glucose bei minimaler Ethanolproduktion erreicht werden.

Die Optimierung des Anfahrprofils führte bei der Kultivierung FB3 zu einer optimalen Glucosefütterung. Bei einer Ausbeute von 0,58 g BTM/g Glucose wurde kein Ethanol produziert. Die gemessenen Glucosekonzentrationen bestätigen, dass der Prozess rein oxidativ nahe der kritischen Glucoseaufnahme der Hefe *S. cerevisiae* geführt wurde.

Die Online-Messung der Fluoreszenz liefert im Minutentakt wertvolle Informationen über den aktuellen biologischen Zustand einer Kultur. Änderungen können sofort erfasst und über geeignete Regelsysteme ausgeglichen werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen eine Optimierung erster Ansätze zur fluoreszenzbasierten Glucoseregulation dar. In früheren Arbeiten auf diesem Gebiet wurde ein wesentlich komplizierteres PLS-Modell mit 8 Hauptkomponenten zur Berechnung des MB-Werts verwendet, womit keine vollständige Unterdrückung der Ethanolproduktion erreicht werden konnte. Zudem wurde die Pumprate bei Überschreiten der kritischen Glucosekonzentration auf Null gesetzt und nicht nur reduziert, was einer optimalen Raum-Zeit-Ausbeute im Wege steht [Stärk, 2002].

6. Hochzelldichte *E. coli*-Kultivierungen

E. coli ist aufgrund seiner gut untersuchten Genetik und Physiologie der meistgenutzte Organismus zur Produktion rekombinanter Proteine. Ein primäres Ziel von Fermentationen ist die kosteneffiziente Produktion der gewünschten Produkte. Da die meisten Proteine in rekombinanten *E. coli* intrazellulär akkumuliert werden, ist die Produktivität proportional zur erreichten Zelldichte und der spezifischen Produktivität [Makrides, 1996]. Im Laufe der Jahre wurden Hochzelldichte-Techniken für verschiedene Organismen entwickelt, um die Produktivität zu verbessern und ebenso die Vorteile geringerer Kulturvolumina, beschleunigten Downstream-Processings und geringerer Kosten zu nutzen [Riesenberg und Guthke, 1999]. Hochzelldichte-Kultivierungen (High cell density cultivations, HCDC) werden gewöhnlich im Fedbatch-Betrieb durchgeführt, wobei neben der Medienzusammensetzung vor allem der Fütterungsstrategie eine entscheidende Rolle zukommt [Yee und Blanch, 1992].

In Kooperation mit der TU Hamburg-Harburg sollen in dieser Arbeit Ansätze zur Steigerung der Produktausbeute bei einem Hochzelldichte-Prozess von *E. coli* zur Produktion von Penicillin Amidase entwickelt werden. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, die sich bei *S. cerevisiae*-Kultivierungen als ausgezeichnetes Verfahren zum Online-Monitoring von Bioprozessen erwiesen hat, soll zunächst zur Prozessbeobachtung und schließlich zur Entwicklung einer effizienten Fütterungsstrategie für einen rekombinanten *E. coli*-Stamm eingesetzt werden.

6.1. Penicillin Amidase-Produktion in rekombinanten *E. coli*

Das Enzym Penicillin Amidase (PA) spielt eine entscheidende Rolle bei der kommerziellen Produktion semisynthetischer β -Lactam Antibiotika. PA ist ein periplasmatisches Enzym, das als Prä-Pro-Enzym (ppPA) synthetisiert wird und während seiner Reifung zur aktiven PA einer komplexen post-translationalen Prozessierung unterliegt.

Die Ausbeute an nativem Enzym wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel intrazellulärer Proteolyse [Enfors, 1992] und der Anwesenheit von Ionen oder Molekülen, die als Cofaktoren zur Reifung und biologischen Funktion des Proteins benötigt werden. Die intrazelluläre Proteolyse kann dabei durch die Auswahl geeigneter Peptidase-defizienter Stämme und Medien unterdrückt werden [Ignatova et al., 2003]. In dieser Arbeit wird *E. coli* BL21(DE3) zur Produktion von Penicillin Amidase eingesetzt. Hinsichtlich der Anwesenheit von Cofaktoren haben Untersuchungen der 3D-Struktur der PA ergeben, dass

bereits im Prä-Pro-Enzym ein fest gebundenes Ca^{2+} -Ion vorhanden ist, welches zur Reifung und zum Transport der aktiven PA durch die Membran benötigt wird [Kasche et al., 1999]. Die Translokation der PA vom Cyto- ins Periplasma erfolgt in *E. coli* über den Tat-Transportweg [Ignatova et al., 2002], wobei das Enzym beim Transport bereits vollständig gefaltet vorliegt [Teter und Klionsky, 1999]. Die Ausbeute an nativem Enzym wird entscheidend von der Ca^{2+} -Konzentration im Medium beeinflusst [Kasche et al., 2003]. Bei zu niedrigen Konzentrationen findet eine Akkumulation des Prä-Pro-Enzyms im Cytoplasma statt. Über die Optimierung des Ca^{2+} -Gehalts im Medium konnte die Ausbeute an PA für den Stamm BL21(DE3) von 900 auf 42 000 U/L gesteigert werden [Ernst, 2004].

Bei der Prozessführung kann die Akkumulation zusätzlich durch eine Temperatursenkung auf unter 30°C verhindert werden, um so die Proteinsyntheserate zu erniedrigen [Strandberg und Enfors, 1991]. Die Fütterung der Zellen im Fedbatch-Betrieb kann prinzipiell auf drei Arten erfolgen: mit konstanter Feedrate, exponentieller Feedrate oder auch durch Einstellung einer konstanten Substrat-(Glucose-)konzentration. Für den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten von 3000 U/g Trockensubstanz bei konstanter Feedrate erreicht, die höchste Raum-Zeit-Ausbeute bei exponentieller Fütterung. Die Enzymanteile an der Trockensubstanz konnten auf 4 % gesteigert werden [Ernst, 2004].

Unabhängig vom Fütterungsprofil werden die Fedbatch-Kultivierungen substratlimitiert gefahren, da *E. coli* bei hohen Glucosekonzentrationen Nebenprodukte bildet, die inhibierend auf das Zellwachstum wirken. Analog zu den Hefen wurde bei rekombinanten *E. coli* eine begrenzte respiratorische Kapazität gefunden, die bei überschüssiger Glucose in aeroben Kultivierungen zur Produktion von Acetat führt [Andersen und von Meyenburg, 1980; Paalme et al., 1990]. Die Acetatbildung bedeutet nicht nur eine geringere Biomasseausbeute, sondern beeinflusst auch signifikant die Produktion rekombinanter Proteine [Nakano et al., 1997]. In den letzten Jahren wurden für hochzelldichte *E. coli*-Kultivierungen mehrere optimierte Feedprofile entwickelt, um die Produktion von Acetat zu unterdrücken [Yoon et al., 1994; Konstantinov et al., 1990; Sakamoto et al., 1994]. Die erzielten Biomassen konnten bei den Verfahren bis auf 150 g/L gesteigert werden [Korz et al., 1995; Horn et al., 1996].

6.2. Zielsetzung der Experimente

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) soll in einer Batch-Kultivierung zunächst hinsichtlich seines Wachstums und Stoffwechselerhaltens in dem hier verwendeten Reaktorsystem untersucht werden. Dabei sollen durch den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Prozessbeobachtung grundlegende Verläufe und Beziehungen zwischen Fluoreszenz und wesentlichen Prozessvariablen geklärt werden. Im Anschluss soll versucht werden, unterschiedliche Prozessphasen während einer glucosegeregelter Fedbatch-Kultivierung mit Induktion über die Fluoreszenzverläufe zu identifizieren und auch hier einzelne Prozessvariablen mit der Fluoreszenz zu korrelieren. Zur Entwicklung einer fluoreszenzbasierten Prozessregelung werden Fedbatch-Kultivierungen mit exponentieller Feedrate durchgeführt, bei denen durch Glucosepulse oxidoreduktives Wachstum induziert wird. Dabei soll untersucht werden, ob die mit einer Acetatproduktion verbundene Stoffwechsellumstellung analog zu den *S. cerevisiae*-Kultivierungen in den Fluoreszenzspektren detektiert werden kann.

6.3. Batch-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)

6.3.1. Kultivierungsparameter und Durchführung

Die Kultivierungsparameter der Batch-Kultivierung sind in Tabelle (6.3.1.1.) zusammengefasst. Der Versuchsaufbau und die Medienzusammensetzung sind in Anhang (10.3.) und (10.4.2.) angegeben.

Zur Anzucht der Vorkultur werden 100 mL LB-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen autoklaviert und anschließend 80 µL Chloramphenicol aus einer Stammlösung in Ethanol (34 mg/mL) zugegeben. Der Kolben wird mit einem aufgetauten Aliquot einer bei -80°C aufbewahrten Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C und 175 rpm in einem Schüttelschrank inkubiert. Dabei wird regelmäßig die Optische Dichte bestimmt, bei einer OD₆₀₀ von 1 wird der Reaktor mit 20 mL der Vorkultur angeimpft.

Die Durchführungen der Analytik sind im Anhang (10.6.) und (10.7.) angegeben.

Tab. 6.3.1.1.: Kultivierungsparameter der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung

Kultivierung	Batch BL21(DE3)
Reaktorvolumen [L]	1,5
Start Glucose [g/L]	25
Temperatur [°C]	28
pH	7,0
pH-Regelung	NH ₃ (25 %ig)
Rührerdrehzahl [rpm]	1000
Begasung (Pressluft) [L/min]	60
BioView [®] -Messintervall [s]	90

6.3.2. Beobachtung der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung

Die Kultivierung wird über 22 h beobachtet. Als Offline-Größen werden die Biotrockenmasse, die OD₆₀₀, die Glucose- und Acetatkonzentration bestimmt. In Abbildung (6.3.2.1.) ist der Verlauf der Batch-Kultivierung ab der 7. Kultivierungsstunde gezeigt.

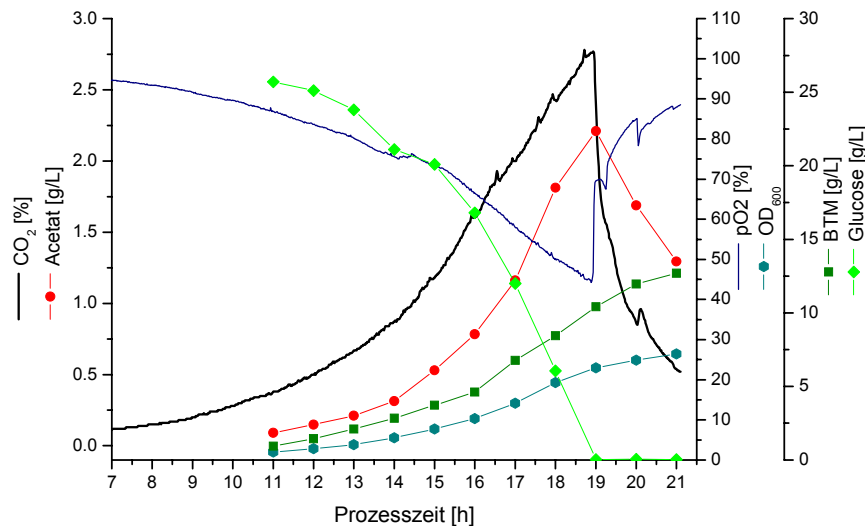


Abb. 6.3.2.1.: Verläufe der CO₂-Produktion, des gelösten Sauerstoffgehalts (pO₂), der Biotrockenmasse (BTM), Optischen Dichte (OD), Glucose- und Acetatkonzentration der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/min Luft

Die *lag*-Phase der *E. coli*-Kultur dauert ca. 9 h und ist nicht komplett dargestellt. Ab der 9. Stunde gehen die Zellen in exponentielles Wachstum über, erkennbar an dem exponentiellen Verlauf der CO₂-Produktion, dem Verlauf der OD₆₀₀ und der Biotrockenmasse. Bei dem unlimitierten Wachstum wird die vorhandene Glucose schnell oxidoreduktiv verbraucht, als Sekundärmetabolit entsteht Acetat.

Der RQ liegt in diesem Bereich konstant bei ca. 1 (nicht dargestellt). Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} ist mit $0,38 \text{ h}^{-1}$ bei 14,5 h erreicht. Ab dem Zeitpunkt bei 16,5 h wachsen die Zellen nicht mehr exponentiell, die CO_2 -Produktion nimmt linear zu, und die Wachstumsrate sinkt, was auch in dem weniger steilen Anstieg der Optischen Dichte und der Biotrockenmasse deutlich wird. Offensichtlich ist entweder in der Zusammensetzung des Mediums oder durch andere äußere Einflüsse ein limitierender Faktor vorhanden, der hier allerdings nicht näher untersucht wurde. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Glucose komplett verbraucht ist (bei 19 h), fällt die CO_2 -Produktion stark ab und der RQ fällt unter 1 (nicht dargestellt). Die maximale Acetatkonzentration beträgt zu diesem Zeitpunkt 2,2 g. Im Folgenden wird das angereicherte Acetat oxidativ verstoffwechselt, was zu einer sehr geringen Wachstumsrate von $0,08 \text{ h}^{-1}$ und dementsprechend einem noch geringeren Anstieg der Biotrockenmasse führt. Die Gesamtausbeute über den betrachteten Zeitraum liegt bei 0,46 g BTM/g Glucose bei einer mittleren Wachstumsrate von $0,26 \text{ h}^{-1}$.

Während der Kultivierung werden mit dem BioView[®]-Sensor alle 90 s vollständige 2D-Fluoreszenzspektren detektiert. In Abbildung (6.3.2.2.) ist beispielhaft ein 2D-Spektrum aus der 18. Kultivierungsstunde dargestellt.

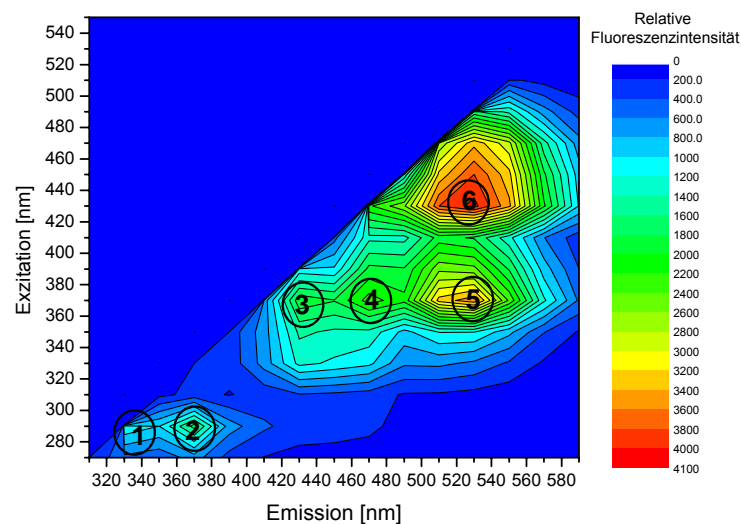


Abb. 6.3.2.2.: 2D-Fluoreszenzspektrum nach 18,0 h der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/min Luft; Lage verschiedener Fluoreszenzbereiche

Im Spektrum fallen sechs Bereiche hoher relativer Fluoreszenzintensität auf. Die Peaks können biogenen Fluorophoren zugeordnet werden, die in Tabelle (6.3.2.1.) mit den entsprechenden Wellenlängenkombinationen angegeben sind.

Tab. 6.3.2.1.: Fluorophore und Wellenlängenkombinationen der Peaks im 2D-Fluoreszenzspektrum nach 18,0 h der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung, Vergleich mit Literaturwerten *[Schulmann, 1985]

Bereich	ex / em [nm]	Fluorophor	Literaturwert* ex / em [nm]
1	290/330	Tyrosin	280/300
2	290/370	Tryptophan	290/350
3	370/430	NADH	340/460
4	370/470	NADH	340/460
5	370/530	Riboflavin	365/520
6	430/530	FMN, FAD	450/530

Neben der Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan (Proteinbereich) sowie des NADH fällt in den Spektren vor allem die intensive Flavinfrauoreszenz auf. Riboflavin (Vitamin B2) ist eine Vorstufe des FAD und Bestandteil der Coenzyme FAD und FMN. Der Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten der ausgewählten Bereiche während der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung ist in Abbildung (6.3.2.3.) dargestellt.

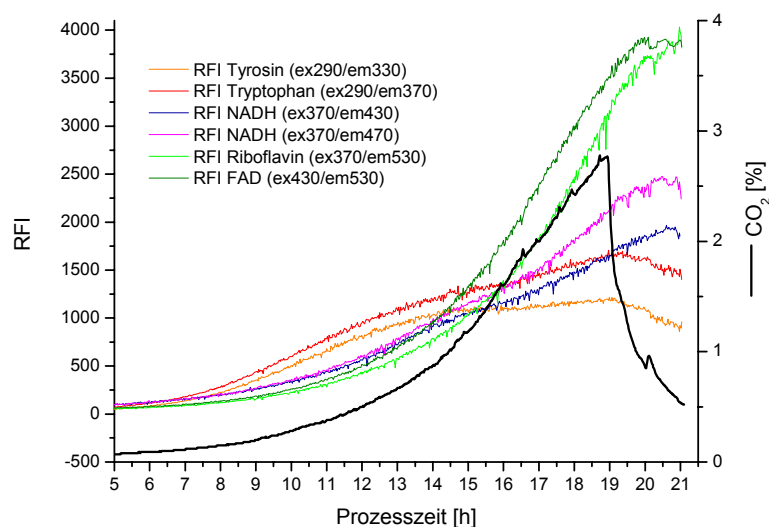


Abb. 6.3.2.3.: Verlauf der CO₂-Produktion sowie der RFI in den Bereichen höchster Fluoreszenzintensität während der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/min Luft

Sämtliche Fluoreszenzverläufe zeigen zunächst einen ansteigenden Verlauf. Beim Übergang von exponentiellem zu linearem Wachstum (nach 16,5 h) flachen die Kurven im Protein- und NADH-Bereich deutlich ab. Die Fluoreszenzintensität im Proteinbereich zeigt nach dem Verbrauch der Glucose nach 19 h einen fallenden Verlauf, alle weiteren RFI steigen weiter und flachen erst zum Ende des beobachteten Zeitraums mit deutlich gesunkener Wachstumsrate ab.

Ein Zusammenhang zwischen den Fluoreszenzverläufen in Abbildung (6.3.2.3.) und den offline bestimmten Prozessvariablen aus Abbildung (6.3.2.1.) kann dem Verlauf nach bezüglich der Biotrockenmasse und der Acetatproduktion festgestellt werden. Um zu untersuchen, inwieweit tatsächlich Informationen über die Prozessvariablen in den Fluoreszenzspektren enthalten sind, werden die 2D-Spektren chemometrisch ausgewertet.

6.3.3. Hauptkomponentenanalyse

Zur Reduktion der Variablenzahl wird mit den 880 2D-Fluoreszenzspektren der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die PCA ergibt 2 Hauptkomponenten, die zusammen nahezu 100 % der Varianz der Spektren beschreiben (1. PC: ca. 98 %; 2.PC: ca. 2 %).

Der Loadingplot (Abbildung (6.3.3.1.)) zeigt den Einfluss der Fluoreszenz bei den verschiedenen Wellenlängenkombinationen auf die Komposition der Hauptkomponenten.

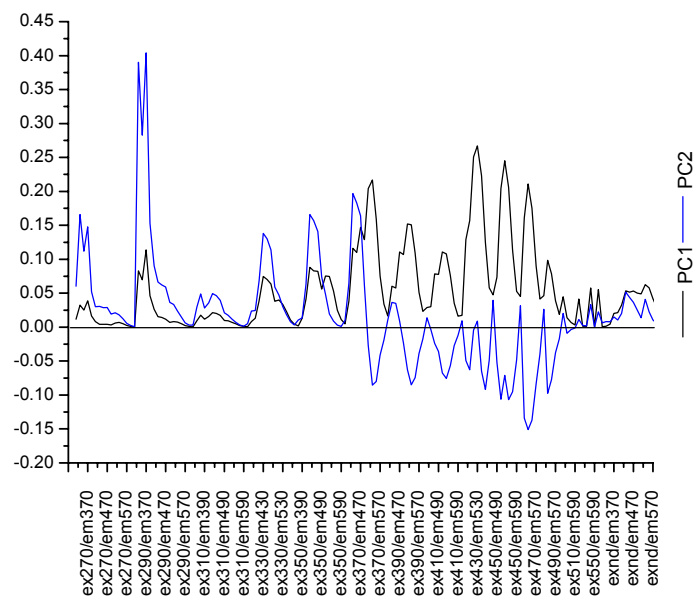


Abb. 6.3.3.1.: Loadings der ersten und zweiten Hauptkomponente, berechnet aus 880 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/min Luft

Die erste Hauptkomponente ist im Wesentlichen abhängig von der Varianz im Flavinbereich der Spektren, daneben zu geringeren Anteilen von der Varianz im Protein- und NADH-Bereich. Letztere beeinflussen die Komposition der zweiten Hauptkomponente am stärksten.

Über die Scoredarstellung in Abbildung (6.3.3.2.) kann der Prozessverlauf nachvollzogen werden.

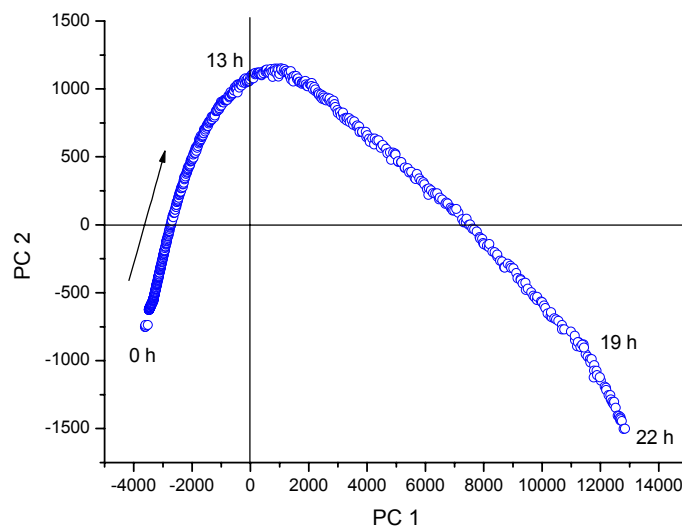


Abb. 6.3.3.2.: Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse von 880 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung; pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/min Luft

Die Score-Werte der Spektren entlang der ersten Hauptkomponente nehmen von Prozessbeginn an kontinuierlich zu und überschreiten bei 13 h den Nullpunkt. In der Phase des exponentiellen Wachstums ab der 9. Kultivierungsstunde nehmen die Score-Werte der Spektren deutlich stärker zu als während der *lag*-Phase, d.h., auch in den zugehörigen Spektren sind hier stärkere Veränderungen zu finden. Auffallend ist, dass die Score-Werte entlang der zweiten Hauptkomponente ab der 13. Kultivierungsstunde eine Art Plateau erreichen. Das Maximum der Kurve fällt mit dem Erreichen der maximalen Wachstumsrate zusammen. Das Abknicken der Kurve bei 19 h entspricht dem Zeitpunkt, ab dem Wachstum auf Acetat stattfindet, nachdem die Glucose komplett verbraucht ist.

Im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse von 880 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung sind bereits grundlegende Trends im Prozessverlauf zu erkennen. Im Folgenden sollen aus den 2D-Fluoreszenzspektren PLS-Modelle zur Korrelation der Fluoreszenzverläufe mit den Offline-Größen Biotrockenmasse, Glucose- und Acetatkonzentration erstellt werden.

6.3.4. PLS-Modelle

Für die *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung werden mit dem Unscrambler® 3 PLS1-Modelle entsprechend der Beschreibungen in Kapitel (2.1.2.) und (3.2.1.) zur Vorhersage der Offline-Größen BTM, Glucose- und Acetatkonzentration entwickelt. Als Validierung wird eine zufällige Kreuzvalidierung gewählt. Die Modelle werden mit den Offline-Proben und den dazugehörigen 2D-Fluoreszenzspektren erstellt.

Die Modelle zur Vorhersage der Biotrockenmasse und der Glucosekonzentration nutzen jeweils nur eine Hauptkomponente, die nahezu 100 % der in den Y-Daten enthaltenen Varianz beschreiben. Die Abhängigkeiten von den Fluoreszenzverläufen sind in beiden Fällen identisch, allerdings sind die Regressionskoeffizienten der Wellenlängenkombinationen der PC im Fall des Glucose-Modells negativ. Der RMSEP der BTM-Vorhersage beträgt 0,159 g/L, der der Glucose-Konzentrationsvorhersage 0,790 g/L. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibration wird zu $r^2 = 0,999$ (BTM) und $r^2 = 0,998$ (Glucose), das der Validierung zu $r^2 = 0,999$ (BTM) und $r^2 = 0,996$ (Glucose) berechnet.

Das Modell zur Vorhersage der Acetatkonzentration über den gesamten Zeitraum liefert keine befriedigenden Ergebnisse. Offensichtlich ist in den Fluoreszenzverläufen keine Information vorhanden, die den Verlauf des Acetatabbaus widerspiegelt. Es ist allerdings möglich, ein Modell zur Vorhersage der Acetatproduktion zu erstellen, das zwei Hauptkomponenten verwendet. Die erste PC beschreibt hierbei ca. 99 % der Y-Varianz, die zweite PC noch ca. 1 %. Der Fehler der Vorhersage beträgt 0,1 g/L bei einem Bestimmtheitsmaß r^2 von 0,994 für die Kalibration und 0,990 für die Validierung.

Für *S. cerevisiae* Batch-Kultivierungen konnte ein Modell zur Vorhersage der Konzentration des Sekundärmetaboliten (Ethanol) erstellt werden, das auch den Abbau gut beschreibt [Stärk, 2002]. Und auch bei den synchronen Kulturen (Kapitel (4)) wurde der Verlauf der Ethanolkonzentration richtig vorhergesagt. In beiden Fällen basierte die entscheidende Hauptkomponente des PLS-Modells auf den Änderungen in der NADH-Fluoreszenz. Allerdings sind schon in den Fluoreszenzverläufen der hier durchgeführten *E. coli*-Batch-Kultivierung keine wesentlichen Änderungen zum Zeitpunkt der Umstellung bei 19 h zu beobachten (Abb. (6.3.2.3.)). Anscheinend sind die Fluoreszenzverläufe beim Wachstum des rekombinanten *E. coli*-Stamms BL21(DE3) noch anderen Einflüssen unterlegen bzw. führen Acetatproduktion und -abbau in Hinsicht auf die Stoffwechselforgänge zu weniger signifikanten Änderungen als Ethanolproduktion und -abbau.

Die über die hier erstellten PLS-Modelle vorhergesagten Verläufe für die BTM, die Glucosekonzentration und die Acetatproduktion sind in Abbildung (6.3.4.1.) dargestellt.

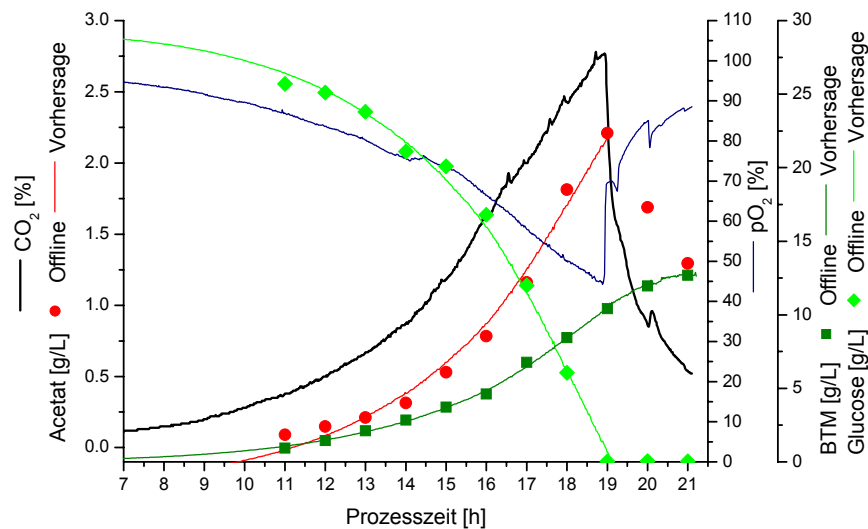


Abb. 6.3.4.1.: Ergebnis der PLS-Regressionsmodelle zur Vorhersage der Biotrockenmasse, der Glucosekonzentration und der Acetatproduktion bei der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO₂-Produktion und des Gelöstsauerstoffgehalts

Die Prozessbeobachtung der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie hat gezeigt, dass in den Fluoreszenzspektren grundlegende Informationen bezüglich des Prozessverlaufs enthalten sind. Im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse aus den 880 2D-Spektren der Kultivierung können charakteristische Punkte der Kultivierung erkannt werden. Die Reduktion der Variablenzahl führt zu zwei Hauptkomponenten, die nahezu die gesamte in den Spektren enthaltene Varianz beschreiben. Bei der *E. coli*-Kultivierung spielen neben den Fluoreszenzintensitäten im Protein- und NADH-Bereich dabei vor allem die Fluoreszenzintensitäten des Flavinbereichs eine entscheidende Rolle. Wesentliche Prozessvariablen wie die Biotrockenmasse und die Substrat-(Glucose-)Konzentration können durch die Erstellung von PLS-Modellen mit sehr hoher Genauigkeit vorhergesagt werden. Die Produktion des Sekundärmetaboliten Acetat wird ebenfalls sehr gut beschrieben, allerdings liefern die 2D-Fluoreszenzspektren im Gegensatz zu *S. cerevisiae*-Kulturen bei *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kulturen keine Anhaltspunkte zur Beschreibung des Acetatabbaus.

6.5. Fedbatch-Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3) mit Induktion

Im Folgenden sollen nun *E. coli*-Fedbatch-Kultivierungen, bei denen die Produktion von Penicillin Amidase induziert wird, unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie hinsichtlich des Prozessverlaufs untersucht werden.

Die *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierungen mit Induktion wurden von B. Ernst an der TU Hamburg-Harburg durchgeführt.

6.5.1. Kultivierungsparameter und Durchführung

Zunächst soll eine Fedbatch-Kultivierung mit geregelter Substratkonzentration untersucht werden. Die Kultivierung wird in einem 2 L-VSF Folienreaktor (Bioengineering, Schweiz) durchgeführt. Die Medienzusammensetzung für Vorkultur, Hauptkultur und Feedlösung entspricht der im Anhang (10.4.2.) angegebenen, wobei die Feedlösung 159 g/L Glucose enthält. Der Reaktor wird mit 35 mL einer Vorkultur der $OD_{600}=1$ angeimpft. Die Startkonzentration an Glucose beträgt 1 g/L. Mit Beginn der Fütterung bei einer OD_{600} von 4 wird der Sollwert auf 0,5 g/L Glucose gesetzt. Die Feedrate wird anhand der online mit einer Process Trace (Trace Biotech, Braunschweig) gemessenen Glucosekonzentration so geregelt, dass die Substrat-Konzentration konstant bleibt. Der Gelöstsauerstoffgehalt wird auf 70 % Sättigung geregelt, indem die zugeführte Pressluft schrittweise mit reinem Sauerstoff angereichert wird. Bei einer OD_{600} von 25 wird die Genexpression zur Produktion von Penicillin Amidase durch Zugabe von 0,6 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert.

Die Biotrockenmasse wird über Differenzwägung nach Filtration und Trocknung auf Cellulose-Acetat-Filtern (0,2 μ m; Sartorius AG, Göttingen) bestimmt. Die Glucosekonzentration wird zusätzlich offline (YSI 2700 Select; Yellow Springs Instruments, USA), die Acetatkonzentration gaschromatographisch gemessen (Varian 3900, Varian Inc., USA). Die Bestimmung der PA-Aktivität erfolgt spektrophotometrisch durch Umsetzung mit 6-Nitro-3-phenylacetamido-benzoesäure (NIPAB) über die Änderung der Absorption pro Minute bei 380 nm [Kasche et al., 1987]. NIPAB ist ein Hilfssubstrat zur Bestimmung der Penicillin Amidase-Aktivität. Die gemessenen Aktivitäten werden nachfolgend auf den Umsatz des Basissubstrats Benzylpenicillin umgerechnet und in der Einheit [BPU] (Benzylpenicillin-Units) angegeben.

Während der Kultivierung werden mit dem BioView[®]-Sensor alle 90 s komplette 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Tabelle (6.5.1.1.) gibt eine Übersicht über die Parameter der durchgeführten Fedbatch-Kultivierung.

Tab. 6.5.1.1.: Kultivierungsparameter der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung mit Induktion

Kultivierung	Glucosegeregelte Fedbatch BL21(DE3)
Reaktorvolumen [L]	1,5
Start Glucose [g/L]	1
Temperatur [°C]	28
pH	7,0
pH-Regelung	NH ₃ (25 %ig)
Rührerdrehzahl [rpm]	1000
Glucose Soll Fütterung [g/L]	0,5
pO ₂ Soll [%]	70
Begasung Gesamt [L/h]	60
Induktion	IPTG 0,6 mM
BioView [®] -Messintervall [s]	90

6.5.2. Beobachtung der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung

Die glucosegeregelte *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung wird über 34 h durchgeführt. 6 h nach dem Animpfen des Reaktors wird die Fütterung bei einem Glucose-Sollwert von 0,5 g/L gestartet. Die Induktion erfolgt nach 17,4 h bei einer OD₆₀₀ von 25. In Abbildung (6.5.2.1.) ist der Verlauf wesentlicher Prozessvariablen und Prozessparameter gezeigt.

Bis zur 21. Kultivierungsstunde ist ein annähernd exponentielles Wachstum zu beobachten. Die zunehmende Acetatproduktion deutet darauf hin, dass der gewählte Glucose-Sollwert von 0,5 g/L über der kritischen Konzentration liegt. Nach der Induktion ist ein weniger starker Anstieg der Biotrockenmasse und entsprechend der Optischen Dichte zu beobachten. Die Aktivitäten der Penicillin Amidase nehmen parallel zur Zelldichte zu. Ab der 22. Kultivierungsstunde wird über die Online-Glucosemessung eine ansteigende Konzentration detektiert, was eine Senkung der Feedrate zur Folge hat. Die sinkende Stoffwechselaktivität ist an dem deutlichen Abfall der CO₂-Produktion zu erkennen. Die offline gemessenen Glucose-Konzentrationen liegen ab dem Zeitpunkt der Induktion konstant unterhalb der online bestimmten. Dieses Phänomen wurde bei mehreren Kultivierungen beobachtet und ist zum Teil auf den bis zur Messung andauernden Glucoseverbrauch in der Offline-Probe zurückzuführen [Ernst, 2004]. Durch die geringere Zufütterung wird ab der 25. Kultivierungsstunde auch das angereicherte Acetat wieder verbraucht. Im weiteren Verlauf wird beständig eine über dem Sollwert liegende Glucosekonzentration von ca. 0,6 g/L detektiert, wodurch die

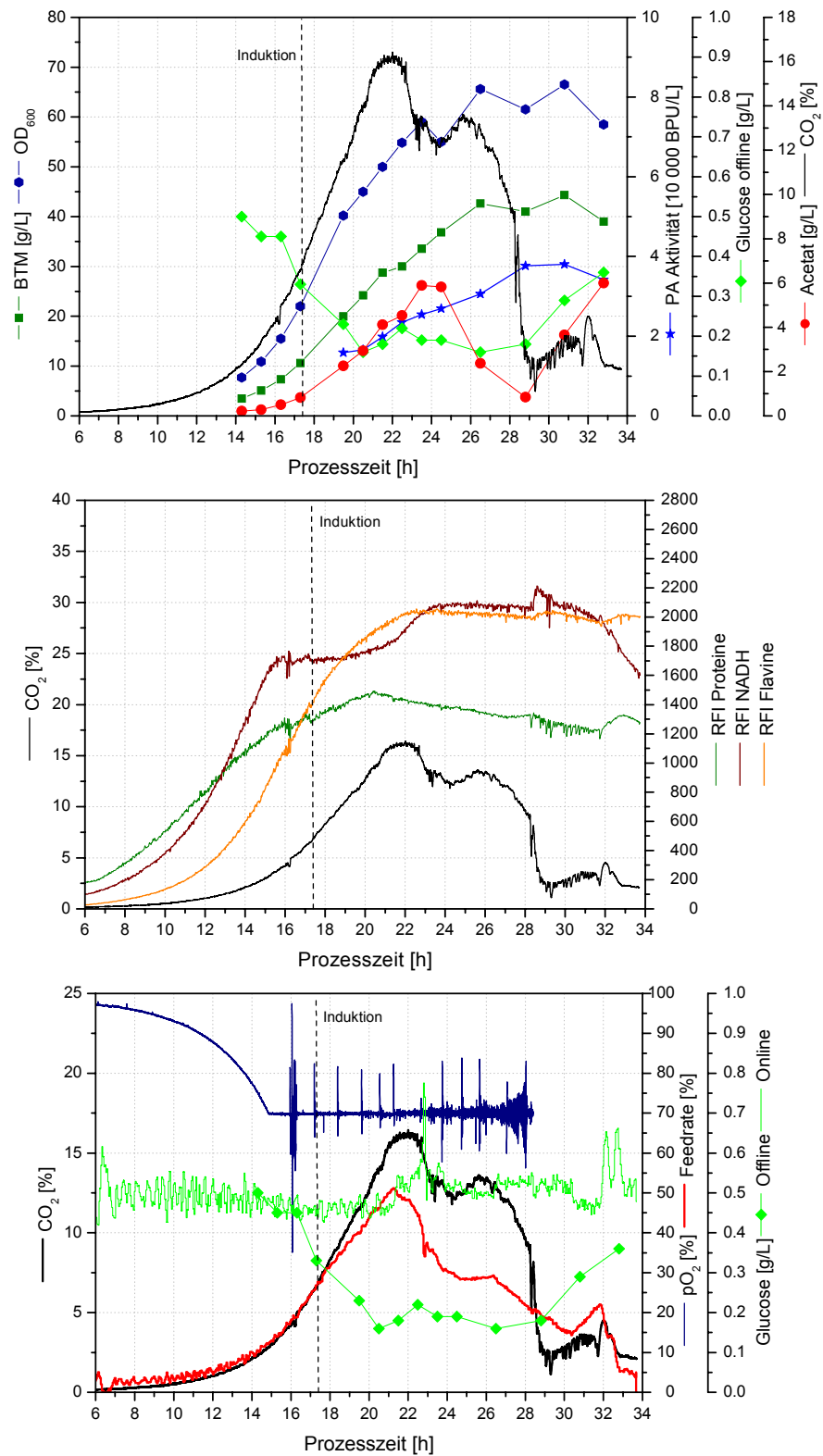


Abb. 6.5.2.1.: Verläufe der CO₂-Produktion, der Biotrockenmasse (BTM), Optischen Dichte (OD₆₀₀), Glucose- und Acetatkonzentration und PA Aktivität; Verlauf der NADH-, Protein- und Flavinfluoreszenz, des Gelöstsauerstoffgehalts (pO₂) und der Feedrate bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/h Luft/Sauerstoff

Feedrate auch weiterhin kontinuierlich gesenkt wird. Ab der 26. Kultivierungsstunde ist praktisch kein Zellwachstum mehr zu beobachten, Biotrockenmasse, Optische Dichte und PA-Aktivität bleiben konstant. In der Schlussphase der Kultivierung (ab 32 h) führt die nochmals höhere Feedrate auch lediglich zu einer Akkumulation von Glucose und einer deutlichen Acetatproduktion.

Die Verläufe der relativen Fluoreszenzintensitäten im NADH-, Protein- und Flavinbereich steigen bis zur 16. Kultivierungsstunde verhältnismäßig stark an, obwohl bis dahin kaum Zellwachstum zu beobachten ist. Mit Beginn der Regelung des Gelöstsauerstoffgehalts erreicht die NADH-Fluoreszenz ein Plateau, der Verlauf der Proteinfluoreszenz flacht deutlich ab. Zum Zeitpunkt der Induktion ist bei allen Verläufen ein lokales Minimum zu beobachten. Die NADH-Fluoreszenzintensität nimmt in der PA-Produktionsphase wieder, die Flavinfluoreszenz weiter zu. Beide RFI laufen bei ca. 23 h in eine Sättigung, die zum Teil auf der geringeren Zunahme der Biomasse, vor allem aber wohl auch auf *Inner-Filter*- und Quenching-Effekten (Fluoreszenzlöschung bei hohen Fluorophorkonzentrationen) aufgrund der hohen Zelldichte beruht. Die Fluoreszenz im Proteinbereich nimmt in der Produktionsphase mit sinkender Feedrate kontinuierlich ab. Die deutlichen Änderungen im Verlauf der Fluoreszenzintensitäten lassen vermuten, dass in den 2D-Fluoreszenzspektren detaillierte Informationen bezüglich des Prozessverlaufs bei der glucosegeregelten *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung enthalten sind. Zur näheren Untersuchung wird mit den Spektren eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt.

6.5.3. Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse wird mit den gesamten 1250 2D-Fluoreszenzspektren durchgeführt, die während der 34-stündigen *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung aufgenommen wurden.

Die PCA ergibt 2 Hauptkomponenten, von denen die erste 97 % und die zweite 2 % der Varianz beschreibt. Aus dem Loadingplot (Abbildung (6.5.3.1.)) ist zu erkennen, dass zur Komposition der ersten Hauptkomponente die Varianzen im Proteinbereich (ex290/em370), im NADH-Bereich (ex350/em470) und vor allem die im Flavinbereich (ex350/em530, ex430/em530 und ex450/em550) der 2D-Fluoreszenzspektren beitragen. Die zweite Hauptkomponente ist verstärkt von den Varianzen im Protein- und NADH-Bereich sowie vom wellenlängenabhängigen Streulicht abhängig.

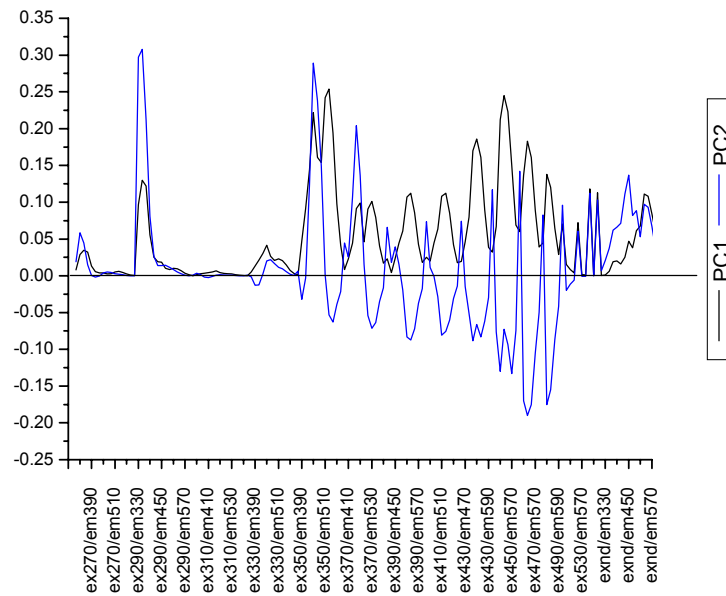


Abb. 6.5.3.1.: Loadings der ersten und zweiten Hauptkomponente, berechnet aus 1250 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung

Der Scoreplot in Abbildung (6.5.3.2.) zeigt einige charakteristische Punkte im Prozessverlauf. Bis zur 16. Kultivierungsstunde nehmen die Score-Werte der 2D-Fluoreszenzspektren sowohl entlang der ersten als auch der zweiten Hauptkomponente kontinuierlich zu.

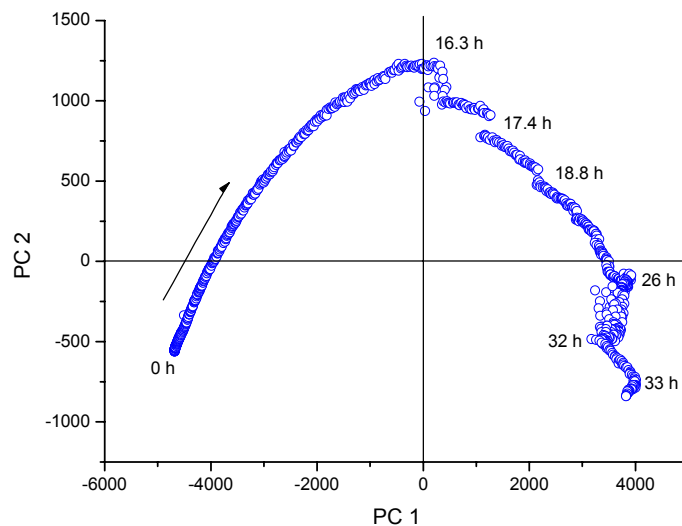


Abb. 6.5.3.2.: Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse von 1250 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung

Bei 16,3 h ist eine Abnahme der Score-Werte der zweiten Hauptkomponente zu beobachten, die Werte der ersten PC bleiben nahezu konstant. Zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung ist das Abflachen der NADH- und Protein-RFI zu beobachten, d.h., der Komponenten, deren Varianz die zweite Hauptkomponente

hauptsächlich bestimmt. Auch im Flavinbereich (dessen Varianz bestimmt die 1. PC) ist eine Unstetigkeit zu erkennen. Obwohl im Stoffwechselverhalten und Zellwachstum keine Besonderheiten auffallen, findet zu diesem Zeitpunkt offensichtlich eine Störung des Prozesses statt, die im Scoreplot zu erkennen ist. Der Zeitpunkt der Induktion bei 17,4 h wird ebenfalls in der Abbildung (6.5.3.2.) durch einen deutlichen Bruch im Verlauf der Score-Werte deutlich. Offenbar finden durch die Zugabe von IPTG Änderungen im Stoffwechsel der Zellen statt, die die Fluoreszenzverläufe beeinflussen und über die Score-Darstellung der PCA identifiziert werden können. Im weiteren Verlauf nehmen sowohl die Score-Werte der ersten als auch der zweiten PC weiter ab. Die Akkumulation der Spektren zwischen der 26. und 32. Stunde deutet darauf hin, dass der Prozess in dieser Phase nicht wesentlich fortschreitet, der Vergleich mit Abbildung (6.5.2.1.) zeigt, dass so gut wie kein Zellwachstum mehr stattfindet und sich die RFI kaum verändern. Zudem kommt es in dieser Zeit zu Unregelmäßigkeiten in einigen Prozessgrößen, da der pH-Wert und der Gelöstsauerstoffgehalt nicht mehr geregelt wurden, was zu starken Schwankungen führte (Daten nicht dargestellt).

Die Hauptkomponentenanalyse der 2D-Fluoreszenzspektren der glucose-geregelten *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung zeigt, dass die verschiedenen Prozessphasen anhand der Veränderungen in den Fluoreszenzverläufen charakterisiert und im Scoreplot der PCA deutlich gemacht werden können. Nun ist es wichtig, zu untersuchen, ob die Prozessgrößen, die für eine erfolgreiche Penicillin Amidase-Produktion von Bedeutung sind, wie z.B. eine ausreichend hohe Biomasse und die Produktkonzentration selbst, über die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zugänglich gemacht werden können.

6.5.4. PLS-Modelle

Mit dem Unscrambler[®] werden für die *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung 4 PLS1-Modelle entsprechend der Beschreibungen in Kapitel (2.1.2.) und (3.2.1.) zur Vorhersage der Offline-Größen BTM, Glucose- und Acetatkonzentration sowie der PA-Aktivität erstellt. Als Validierung dient auch hier eine zufällige Kreuzvalidierung.

In Abbildung (6.5.4.1.) sind die Ergebnisse der PLS-Regressionsmodelle für die vier Prozessgrößen gezeigt.

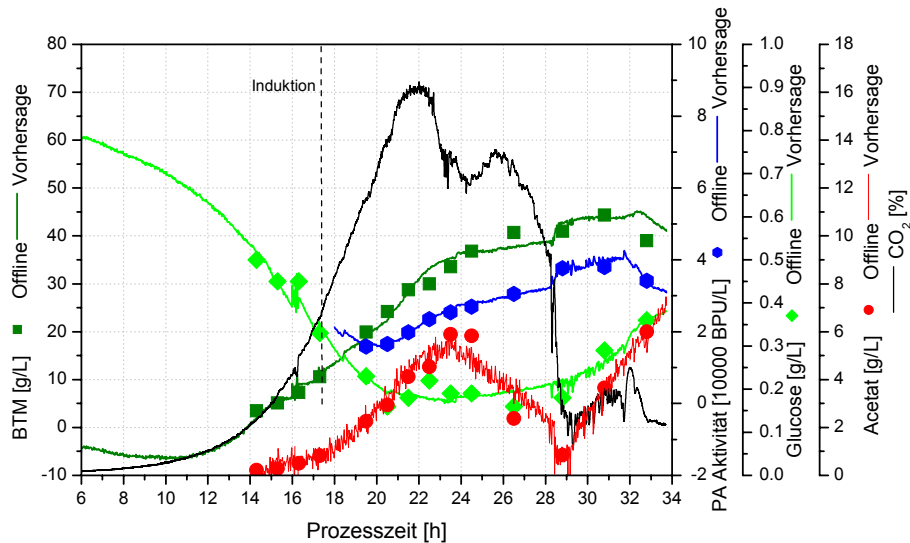


Abb. 6.5.4.1.: Ergebnis der PLS-Regressionsmodelle zur Vorhersage der Biotrockenmasse, der Glucose- und Acetatproduktion sowie der PA Aktivität bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung; Vergleich von vorhergesagten und offline bestimmten Y-Daten; Verlauf der CO₂-Produktion

Im Vergleich zu der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung (Kapitel (6.4.)) gelingt es bei der Fedbatch-Kultivierung, die Acetatkonzentration über den gesamten Zeitraum aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorherzusagen. Das Modell erfordert jedoch 7 Hauptkomponenten, wovon die erste 61 % der Y-Varianz beschreibt. Der mittlere RMSEP ist mit 24 % sehr hoch, was schon im Verlauf der Vorhersage deutlich wird.

Dagegen beschreiben die Modelle für BTM, Glucosekonzentration und PA-Aktivität die Verläufe besser. Das Modell für die Biotrockenmasse verwendet zwei Hauptkomponenten, die Modelle für die Glucosekonzentration und die PA-Aktivität jeweils drei. In Tabelle (6.5.4.1.) sind die berechneten Größen zur Beurteilung der Regression für alle vier PLS-Modelle zusammengefasst.

Tab. 6.5.4.1.: Anzahl der Hauptkomponenten, Bestimmtheitsmaß r^2 und RMSEP für die PLS-Regressionsmodelle zur Vorhersage der Biotrockenmasse, der Acetat- und Glucosekonzentration sowie der PA-Aktivität bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung

Modell	BTM	Glucose	Acetat	PA-Aktivität
PCs	2	3	7	3
Bestimmtheitsmaß r^2				
Kalibration	0,993	0,977	0,991	0,996
Validierung	0,986	0,956	0,832	0,984
RMSEP _{Mittel} [%]	12 %	8,5	9,4	9

Die Möglichkeit, Prozessgrößen wie die Biotrockenmasse aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorherzusagen, ist für die *E. coli*-Fedbatch-Kultivierungen beispielsweise zur Festlegung des optimalen Induktionszeitpunkts ideal.

Bei der hier untersuchten glucosegeregelter Fedbatch-Kultivierung war aufgrund der zu hohen Glucosekonzentration eine deutliche Acetatbildung zu beobachten. Wie bereits in Kapitel (6.1.) erwähnt, wurde die höchste Raum-Zeit Ausbeute für den Stamm BL21(DE3) bei exponentieller Fütterung erreicht, die höchsten spezifischen Aktivitäten bei konstanter Feedrate [Ernst, 2004]. Zum Vergleich des Prozessverlaufs wird im nächsten Abschnitt kurz eine *E. coli*-Fedbatch-Kultivierung mit exponentieller Fütterung beschrieben.

6.6. *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung mit exponentieller Fütterung und Induktion

Die Kultivierungsparameter und die Durchführung der Fedbatch-Kultivierung entsprechen bis auf die Fütterungsstrategie im Wesentlichen der Beschreibung in Kapitel (6.5.1.). Der Gelöstsauerstoffgehalt wird hier durch Zugasen von reinem Sauerstoff auf mindestens 50 % Sättigung geregelt. Bei einer OD_{600} von 4 wird die exponentielle Fütterung gestartet. Die Feedrate \dot{F} berechnet sich dabei nach folgender Gleichung:

$$\dot{F} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{V}{s_F} \cdot \mu_{set} \cdot x_0 \cdot \exp(\mu_{set} \cdot t) \quad (6.6.1.)$$

mit:

V :	Reaktorvolumen [L]	$Y_{X/S}$:	Ausbeutekoeffizient [g/g]
s_F :	Substratkonzentration Feed [g/L],	μ_{set} :	Wachstumsrate Setpoint [h^{-1}]
x_0 :	Startbiomasse [g]	t :	Zeit [h]

Die Wachstumsrate μ_{set} zur Berechnung der Pumprate wird wesentlich kleiner gewählt als die maximale Wachstumsrate, um substratlimitierte Bedingungen zu erhalten. Zu Beginn der Fütterung wird ein $\mu_{set}=0,15 h^{-1}$, nach der Induktion ein $\mu_{set}=0,05 h^{-1}$ gesetzt.

Der Verlauf der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung mit exponentieller Fütterung ist in Abbildung (6.6.1.) dargestellt. Die Induktion erfolgt nach 21,5 h bei einer OD_{600} von 25 mit 0,6 mM IPTG. Obwohl die Entwicklung der BTM in etwa mit der bei der glucosegeregelter Fedbatch-Kultivierung zu vergleichen ist (siehe Abb. (6.5.2.1.)), werden bei dieser Kultivierung doppelt so hohe PA-Aktivitäten erreicht (95 000.BPU/L im Vergleich zu ca. 40 000 BPU/L). Die Glucosekonzentration ist

über den gesamten Zeitraum wesentlich geringer, dementsprechend wird erst zum Ende der Kultivierung nennenswert Acetat produziert.

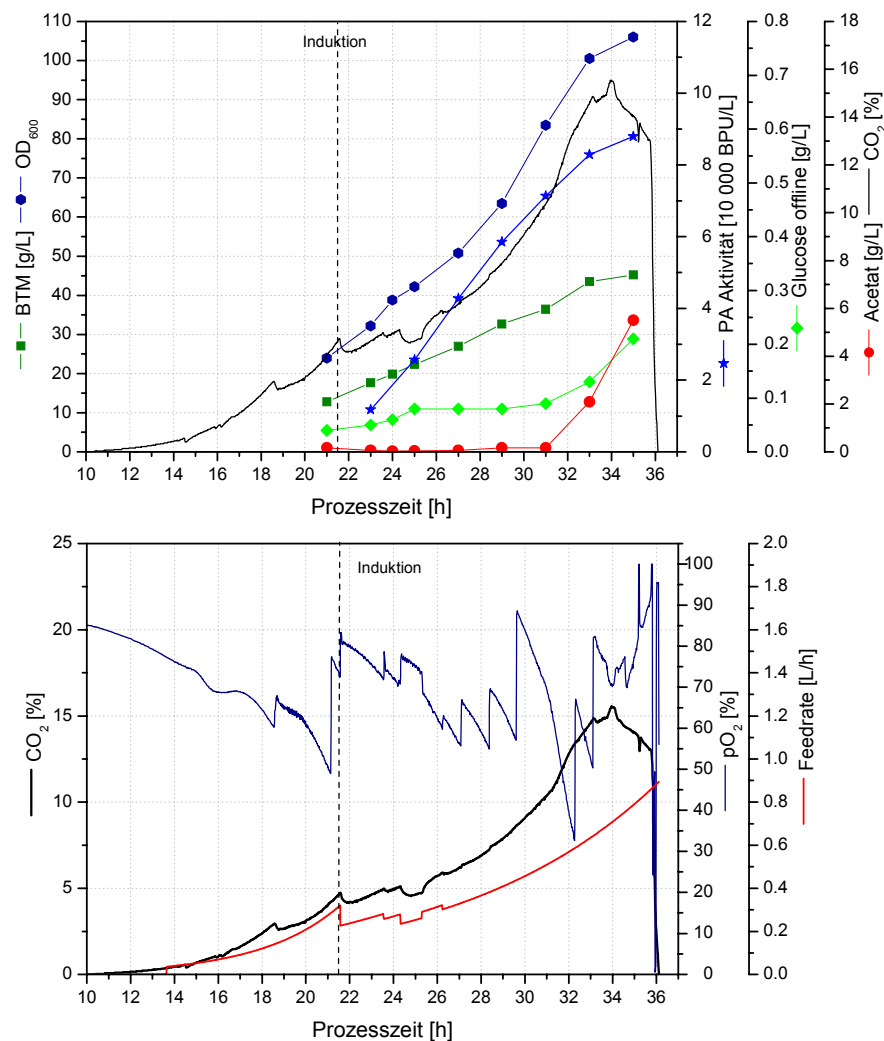


Abb. 6.6.1.: Verläufe der CO₂-Produktion, der Biotrockenmasse (BTM), Optischen Dichte (OD₆₀₀), Glucose- und Acetatkonzentration und PA Aktivität; Verlauf des Gelöstsauerstoffgehalts (pO₂) und der Feedrate bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung mit exponentieller Fütterung und Induktion, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/h Luft/Sauerstoff

Die Möglichkeit, eine gewünschte μ festzulegen, ist ein weiterer Vorteil bei einem exponentiellen Fütterungsprofil. Die Bestimmung der optimalen Wachstumsrate ist jedoch schwierig. In diesem Versuch wurde sie so niedrig gewählt, dass keine Acetatproduktion stattfindet, aber die erzielte Biomasse auch nicht höher ist als bei der glucosegeregelten Fedbatch-Kultivierung mit deutlicher Acetatproduktion. Zur weiteren Optimierung der BTM-Ausbeute sollte der Prozess analog zu den *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen knapp unterhalb der kritischen Glucosekonzentration geführt werden.

Im Folgenden soll versucht werden, eine exponentielle Fütterung nahe der kritischen Glucosekonzentration zu realisieren. Durch Glucosepulse soll zusätzlich oxidoreduktives Wachstum eingeleitet werden, um zu untersuchen, ob diese Stoffwechseländerung mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie analog zu den *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen erfasst werden kann. Damit wäre prinzipiell die Möglichkeit gegeben, die Glucosekonzentration basierend auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zu regeln und eine Ausbeute-maximierende Fütterung zu realisieren.

6.7. *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierungen zur Entwicklung einer fluoreszenzbasierten Glucoseregulung

Grundlage der Entwicklung einer fluoreszenzbasierten Glucoseregulung bei *E. coli*-Fedbatch-Kultivierungen ist die Möglichkeit, eine beginnende Acetatproduktion über die 2D-Fluoreszenzspektren zu detektieren. Dazu müssen zunächst die Wachstumsparameter des *E. coli*-Stamms BL21(DE3) für das hier verwendete System angepasst werden, um eine Fütterung nahe der kritischen Glucoseaufnahme durchzuführen zu können. Anschließend werden zusätzliche Glucosepulse während der Fütterung gesetzt. Die dadurch erzwungene Stoffwechseländerung soll unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden. Es werden zwei *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt werden, die FB E1 mit exponentieller Fütterung, die FB E2 mit konstanter Feedrate. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die Wachstumsrate und der Ausbeutekoeffizient, die für die Berechnung der Feedrate bei exponentieller Fütterung festgelegt werden müssen, im Vergleich zu den an der TU Hamburg-Harburg durchgeführten Kultivierungen deutlich heraufgesetzt werden müssen. Bei zu geringen Parametern wird die respiratorische Kapazität der Zellen nicht ausgeschöpft, und es findet trotz zusätzlicher Glucosepulse keine Acetatproduktion statt. Die optimierten Parameter zur Berechnung der Pumprate für die exponentielle Fütterung wurden zu $\mu = 0,225 \text{ h}^{-1}$ und $Y_{X/S} = 0,43 \text{ g/g}$ bestimmt.

6.7.1. Kultivierungsparameter und Durchführung

Die *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E1 wird mit exponentieller Fütterung, die Kultivierung FB E2 bei konstanter Feedrate durchgeführt. Beiden Kultivierungen geht eine Batch-Kultur voraus, um die für die Regelung benötigte Startbiomasse x_0 zu produzieren. Die Fütterung wird nach einstündiger Hunger-

phase gestartet. Der Versuchsaufbau und die Medienzusammensetzung sind im Anhang (10.3.) und (10.4.2.) zu finden, ebenso die Vorschriften zur Anzucht der Vorkultur (Anhang (10.5.2.)) sowie die Durchführungen der Analytik (Anhang (10.6.) – (10.7.)).

Die Feedpumpe wird über einen Prozessleitreechner gesteuert. Die Pumprate berechnet sich für die exponentielle Fütterung (FB E1) entsprechend Gleichung (6.6.1.) zu

$$\dot{F} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{V}{s_F} \cdot \mu_{set} \cdot x_0 \cdot \exp(\mu_{set} \cdot t) \quad (6.6.1.)$$

mit:

V :	Reaktorvolumen [1,5 L]	$Y_{X/S}$:	Ausbeutekoeffizient [0,43 g/g]
s_F :	Substratkonzentration Feed [636 g/L],	μ_{set} :	Wachstumsrate Setpoint [0,225 h ⁻¹]
x_0 :	Startbiomasse [g]	t :	Zeit [h]

Bei der Fedbatch-Kultivierung FB E2 wird eine konstante Pumprate von 0,023 L/h eingestellt. Die Kultivierungsparameter für die beiden *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierungen sind in Tabelle (6.7.1.1.) zusammengefasst.

Tab. 6.7.1.1.: Kultivierungsparameter der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E1

Kultivierung	FB E1	FB E2
Reaktorvolumen [L]	1,5	
Start Glucose [g/L]	11	30
Startbiomasse x_0 [g/L]	4,4	11,6
Temperatur [°C]	28	
pH	7,0	
pH-Regelung	NH ₃ (25 %ig); H ₂ SO ₄ (10 %ig)	
Rührerdrehzahl [rpm]	1000	
Glucose Feed [g/L]	636	
Feedrate [L/h]	siehe Gl. (6.6.1.)	0,023
pO ₂ Soll [%]	>50	
Begasung Gesamt [L/h]	60	
BioView [®] -Messintervall [s]	70	

Die Glucosepulse werden zu verschiedenen Zeitpunkten direkt in den Reaktor injiziert. Als Stammlösung dient eine sterile Glucoselösung der Konzentration 636 g/L. Bei der Fluoreszenzmessung mit dem BioView[®]-Sensor wird das wellenlängenabhängige Streulicht nicht aufgenommen, um eine höhere Messfrequenz zu erhalten.

6.7.2. Fedbatch-Kultivierung FB E1 mit exponentieller Fütterung

Bei der Kultivierung FB E1 wird die exponentielle Fütterung nach 20,25 h gestartet (Abbildung (6.7.2.1.)). Bis zur 30. Kultivierungsstunde werden 112 g Glucose zugefüttert, wobei die Biotrockenmasse von 5,6 g/L auf 33,9 g/L ansteigt. Die Ausbeute beträgt über diesen Zeitraum 0,38 g BTM/g Glucose bei einer mittleren Wachstumsrate von $\mu = 0,19 \text{ h}^{-1}$.

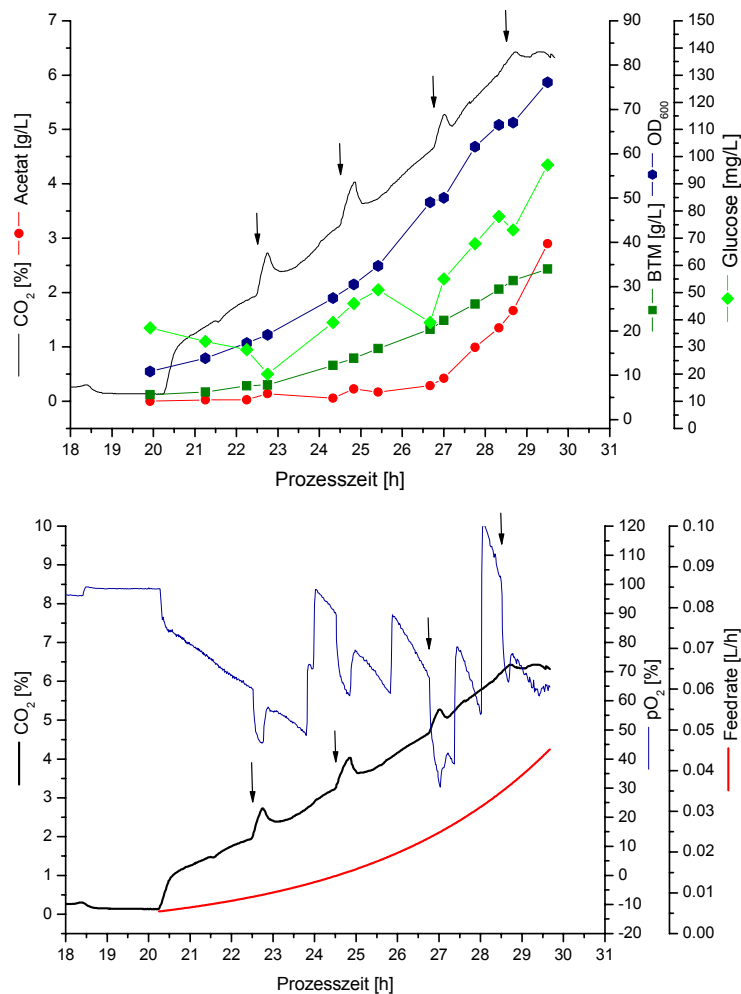


Abb. 6.7.2.1.: Verläufe der CO₂-Produktion, der Biotrockenmasse (BTM), Optischen Dichte (OD₆₀₀), Glucose- und Acetatkonzentration; Verlauf des gelösten Sauerstoffgehalts (pO₂) und der Feedrate bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E1 mit exponentieller Fütterung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/h Luft/Sauerstoff

Zu vier Zeitpunkten der Kultivierung werden Glucosepulse gesetzt (1 g Glucose bei 22,5 h, 1,5 g Glucose bei 24,5 h, 26,75 h und 28,5 h), die in der Abbildung (6.7.2.1.) durch Pfeile markiert sind. Jeder Puls hat unmittelbar ein Ansteigen der CO₂-Produktion zur Folge, das Zeichen für eine gesteigerte Stoffwechselaktivität. Die ersten beiden Pulse führen zu einer geringen Acetatproduktion. Die zusätzliche Glucose wird sehr schnell verbraucht, ein Anstieg der

Gesamtkonzentration kann über die Offline-Proben nicht nachgewiesen werden. Erst ab dem dritten Glucosepuls erhöht sich die Glucosekonzentration im Reaktor deutlich, und es wird eine größere Menge an Acetat produziert, die sich durch den vierten Glucosepuls nochmals bis auf ca. 3 g/L steigert. Das Acetat wird auch im Gegensatz zu den ersten beiden Pulsen nicht wieder abgebaut, und die Glucosekonzentration steigt weiter an. Anhand des Verlaufs der Biotrockenmasse und der Optischen Dichte ist ab der 27. Kultivierungsstunde auch ein leicht vermindertes Wachstum zu erkennen. Die erreichte OD_{600} von 80 nach 29,5 h liegt nahe der für den verwendeten Stamm unter diesen Bedingungen maximal möglichen von ca. 100 [Ernst, 2004].

Die bei der exponentiellen Fütterung gesetzten Glucosepulse führen in allen vier Fällen zu einer Acetatproduktion. In Hinblick auf die Detektion dieser Stoffwechseländerung werden die während der Kultivierung aufgenommenen 2D-Fluoreszenzspektren ausgewertet. Um einen ersten Überblick über Veränderungen zu erhalten, wird zunächst mit den 462 Spektren aus der 20. bis 30. Kultivierungsstunde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Es werden zwei PCs berechnet, von denen die erste ca. 99 %, die zweite ca. 1 % der in den Spektren enthaltenen Varianz beschreibt. Im Scoreplot (Abbildung (6.7.2.2.)) zeigen sich dabei einige Auffälligkeiten.

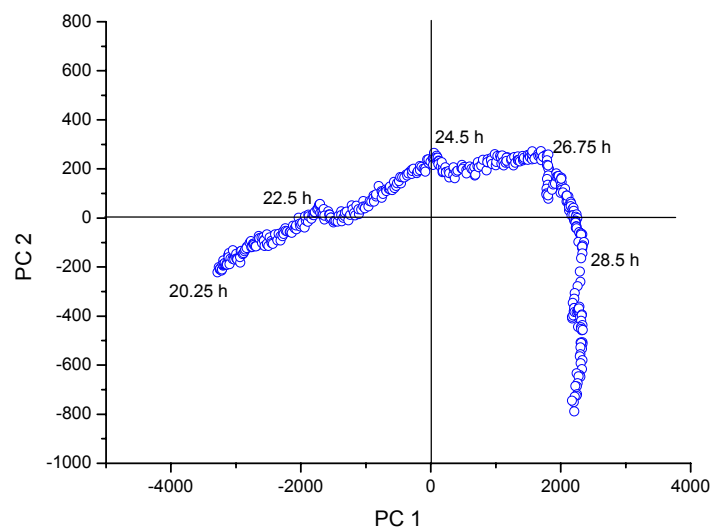


Abb. 6.7.2.2.: Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse von 462 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E1

An einigen Punkten treten im Verlauf der Score-Werte Unstetigkeiten auf, die den Zeitpunkten kurz nach den Glucosepulsen entsprechen (in der Abbildung (6.7.2.2.) durch die Zeitangaben gekennzeichnet). Offensichtlich spiegeln sich die durch die Pulse erzwungenen Stoffwechseländerungen in den Bereichen der 2D-Fluoreszenzspektren wider, die die Hauptkomponenten beeinflussen.

Die Loadingwerte, die den Einfluss der einzelnen Wellenlängenkombinationen auf die Komposition der Hauptkomponente angeben, sind maximal im Flavinbereich der Spektren, daneben auch hoch im Protein- und NADH-Bereich. In Abbildung (6.7.2.3.) sind die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten für die Fluorophore dargestellt, deren Varianz den größten Einfluss auf die 1. Hauptkomponente ausübt.

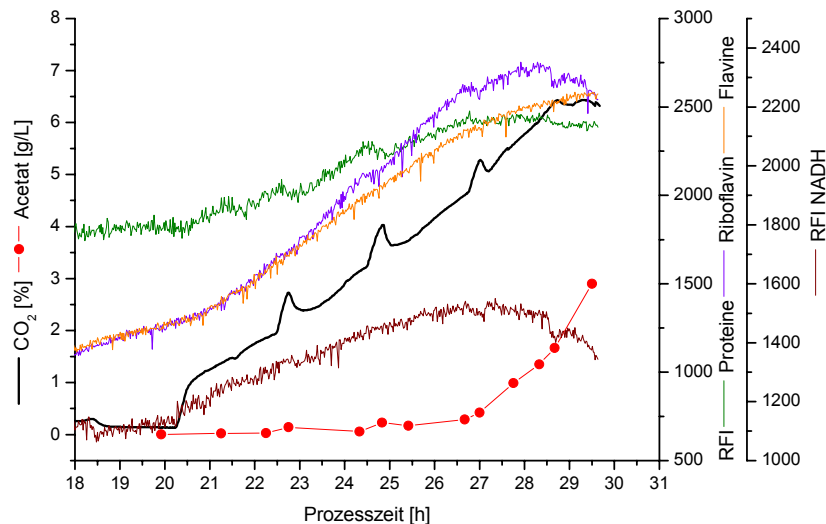


Abb. 6.7.2.3.: Verläufe der CO₂-Produktion, der Acetatkonzentration und Verlauf der NADH-, Protein-, Riboflavin- sowie Flavinfluoreszenz bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E1, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/h Luft/Sauerstoff

Die im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse gefundenen Veränderungen in den Spektren werden im Verlauf der ausgewählten Fluoreszenzintensitäten ebenfalls deutlich. Die Grundlinien der RFI steigen entsprechend der Zunahme an Biomasse an. Zu den Zeitpunkten der Glucosepulse ist ein Absinken der RFI in allen Fluoreszenzverläufen zu beobachten, das in der RFI des Riboflavins und im Proteinbereich am deutlichsten ausfällt. Letzteres findet allerdings leicht verzögert statt. Mit zunehmender Biomasse läuft die Proteinfluoreszenz wiederum in die Sättigung, was auch schon bei den Fedbatch-Kultivierungen mit Induktion in Kapitel (6.6.) beobachtet wurde. Die NADH- und Riboflavin-Fluoreszenzintensitäten nehmen ab der 28. Kultivierungsstunde sogar ab, obwohl noch Zellwachstum stattfindet. Vermutlich kommt es bei der erreichten hohen OD₆₀₀ in diesem Bereich ebenfalls zu Quenching-Effekten, die die Fluoreszenz abschwächen.

Die RFI-Abnahmen bei den Glucosepulsen fallen deutlicher aus, je mehr Acetat produziert wird. Bei den *S. cerevisiae*-Kultivierungen wurde eine beginnende Acetatproduktion durch ein Ansteigen der NADH-Fluoreszenzintensität angezeigt, die auf definierten Stoffwechselfvorgängen begründet ist. Bei den *E. coli*-Kultivierungen wird ein Absinken der NADH-Fluoreszenz beobachtet, das auch im

Vergleich weniger ausgeprägt ist. Die mit der Acetatproduktion verbundenen Stoffwechseländerungen beeinflussen die Konzentration der biogenen Fluorophore offenbar deutlich weniger, wodurch eine Detektion sehr geringer Acetatmengen eventuell erschwert werden könnte.

Zur weiteren Untersuchung der durch die Acetatproduktion bedingten Änderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren und zum Vergleich zweier verschiedener Fütterungsprofile wird im Folgenden eine *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung mit konstanter Fütterungsrate durchgeführt.

6.7.3. Fedbatch-Kultivierung FB E2 mit konstanter Fütterung

Die konstante Fütterung bei einer Feedrate von 0,023 L/h wird bei der Fedbatch-Kultivierung FB E2 nach 23,9 h gestartet. Bei dieser Kultivierung werden bis zur 30. Kultivierungsstunde 109 g Glucose zugefüttert. Die BTM steigt von 11,6 g/L auf 33,8 g/L, was einer Ausbeute von 0,30 g BTM/g Glucose entspricht. Die mittlere Wachstumsrate μ beträgt $0,10 \text{ h}^{-1}$. Im Vergleich zu der exponentiellen Fütterung sind sowohl die Ausbeute als auch die Wachstumsrate bei der konstanten Fütterung geringer. In Abbildung (6.7.3.1.), die den Verlauf der Kultivierung FB E2 wiedergibt, ist zu erkennen, dass die Glucosekonzentration im Reaktor höher ist als bei der Kultivierung FB E1 (Abbildung (6.7.2.1.)) und zu Beginn kontinuierlich ansteigt. Gleichzeitig ist über den gesamten Zeitraum eine geringe Acetatkonzentration vorhanden, die aus der Anfahrphase der Fütterung resultiert. Nach den ersten beiden Glucosepulsen von 1 g bei 25,8 h und 27,3 h ist keine zusätzliche Acetatproduktion zu beobachten, erst beim dritten Puls bei 28,2 h (2 g Glucose) wird geringfügig mehr Acetat produziert. Die konstant vorhandene Acetatmenge deutet darauf hin, dass die eingestellte Pumprate zu einer zu hohen Glucosekonzentration führt und über weite Strecken kein rein oxidatives Wachstum stattfindet, was auch die Ursache für die bei dieser Kultivierung geringere Ausbeute sein kann.

Der letzte Puls von 1,5 g Glucose bei 29,4 h führt ebenfalls zu keiner gesteigerten Acetatproduktion, das Zellwachstum nimmt in der letzten Phase der Kultivierung kaum noch zu.

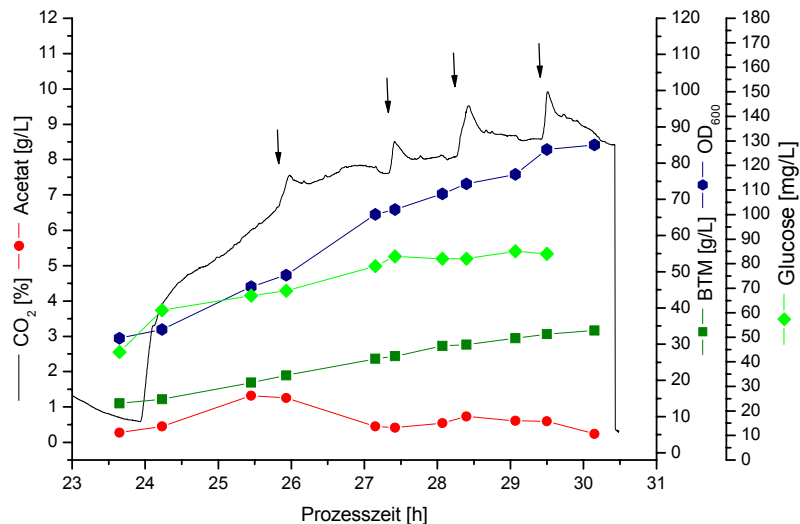


Abb. 6.7.3.1.: Verläufe der CO₂-Produktion, der Biotrockenmasse (BTM), Optischen Dichte (OD₆₀₀), Glucose- und Acetatkonzentration bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E2 mit konstanter Fütterung, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/h Luft/Sauerstoff

Die Fedbatch-Kultivierung FB E2 mit konstanter Fütterungsrate verläuft bezüglich der Acetatproduktion anders als die Kultivierung FB E1 mit exponentieller Fütterung. Die Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren mittels Hauptkomponentenanalyse ergibt ebenfalls ein unterschiedliches Bild. Für die Beschreibung der Varianz der zwischen der 24. und 30. Kultivierungsstunde aufgenommenen 320 2D-Spektren werden drei PCs berechnet. Die Hauptkomponenten erfassen zusammen 99 % (1. PC: 92 %; 2. PC: 6 %; 3. PC: 1 %) der Varianz.

Im Scoreplot (Abbildung (6.7.3.2.)) sind die Score-Werte der ersten gegen die zweite Hauptkomponente aufgetragen. Zunächst fällt auf, dass die Werte entlang der 2. PC im Vergleich zu der Kultivierung FB E1 in der ersten Phase abnehmen.

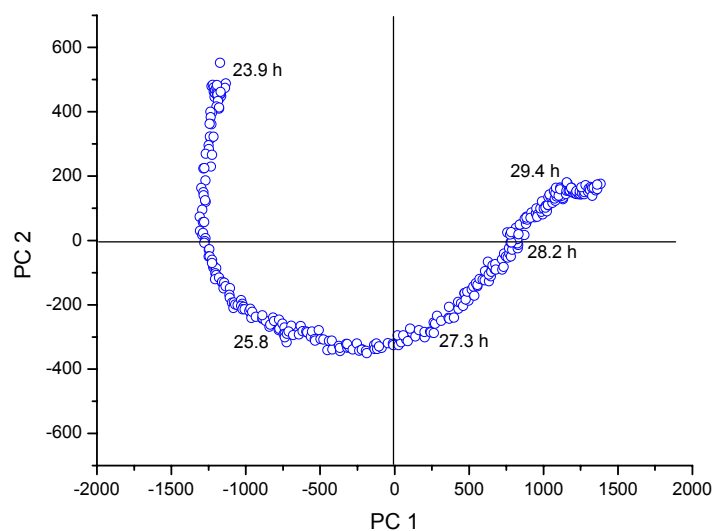


Abb. 6.7.3.2.: Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse von 320 Spektren der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E2

Diese Hauptkomponente hängt stark von der Varianz der Fluoreszenz im Protein- und NADH-Bereich des Spektrums ab. Die Zeitpunkte der Glucosepulse sind im Scoreplot eingetragen. Während der ersten beiden Pulse sind kaum Veränderungen im Verlauf der Score-Werte zu erkennen, beim dritten und vierten Puls ist ein leichtes Abknicken der Kurve zu beobachten. Kurz nach der 29. Kultivierungsstunde ist allerdings allmählich die maximale Zelldichte erreicht, die Änderung des Kurvenverlaufs in der Abbildung (6.7.3.2.) deutet vermutlich auch auf das Ende des Zellwachstums hin.

Zur Verdeutlichung und Erklärung des Verlaufs der Score-Werte sind in der Abbildung (6.7.3.3.) die RFI der Fluoreszenzbereiche während der Kultivierung FB E2 dargestellt, deren Varianzen die Hauptkomponenten maßgeblich beeinflussen.

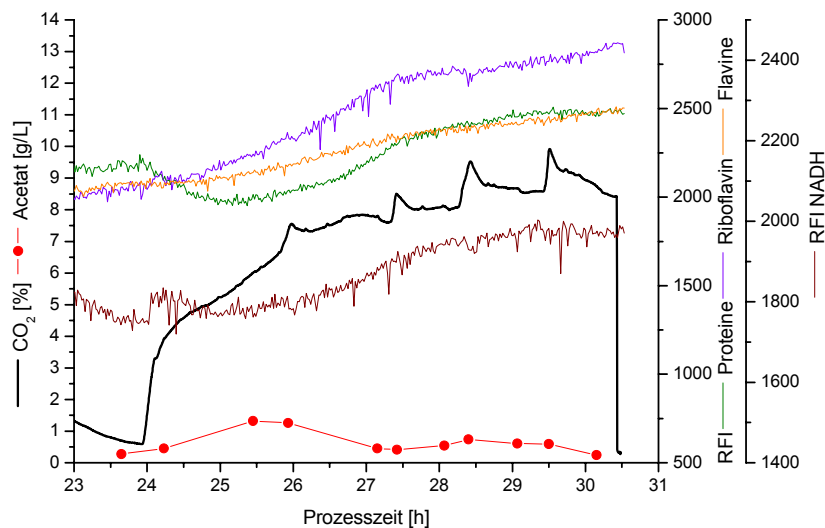


Abb. 6.7.3.3.: Verläufe der CO₂-Produktion, der Acetatkonzentration und Verlauf der NADH-, Protein-, Riboflavin- sowie Flavinfluoreszenz bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung FB E2, pH 7, T=28°C, 1000 rpm, 60 L/h Luft/Sauerstoff

Die Fluoreszenzintensitäten im Protein- und NADH-Bereich zeigen zu Beginn der Fütterung einen fallenden Verlauf und steigen erst nach der 25. Kultivierungsstunde allmählich an. Damit erklärt sich auch das Sinken der Score-Werte der 2. PC in diesem Bereich, die genau von diesen beiden Fluoreszenzbereichen abhängt. Die OD₆₀₀ und die BTM nehmen unterdessen kontinuierlich zu. Basierend auf den Befunden bei der Kultivierung FB E1 könnte das Absinken der RFI zu Beginn der Fütterung auf der beständigen Acetatproduktion begründet sein, die möglicherweise das Zellwachstum hemmt. Eventuell wäre ohne diese eine höhere Zelldichte zu beobachten. Bezüglich der Glucosepulse sind bei 25,8 h und 28,2 h lokale Minima in der NADH- und Riboflavin-Fluoreszenz zu erkennen, in dem Verlauf der Protein-Fluoreszenz sind hier im Vergleich zur Kultivierung FB E1 keine Auffälligkeiten festzustellen.

Insgesamt sind die Veränderungen in den Spektren bei der Fedbatch-Kultivierung mit konstanter Fütterung wesentlich weniger ausgeprägt als bei der exponentiellen Fütterung. Aufgrund des Rauschens in den RFI-Verläufen werden sie im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse deshalb wohl auch nicht deutlicher.

Der Hauptunterschied der beiden durchgeführten Fedbatch-Kultivierungen liegt in der konstant vorhandenen Acetatmenge bei der Kultivierung FB E2. Die Stoffwechseländerungen, die durch die Glucosepulse erzwungen werden sollen, sind dementsprechend nicht so gravierend und werden in den 2D-Fluoreszenzspektren schlechter detektiert.

Trotzdem kann bei beiden Kultivierungen in einzelnen Fluoreszenzbereichen die Acetatproduktion erkannt werden. In Hinblick auf eine fluoreszenzbasierte Glucoseregulation wäre es wahrscheinlich sinnvoll, nicht die kompletten 2D-Fluoreszenzspektren auszuwerten, sondern nur die Wellenlängenkombinationen, die tatsächliche Veränderungen zeigen.

6.8. Zusammenfassung

Da *E. coli* zur Produktion rekombinanter Proteine bei weitem am häufigsten eingesetzt wird, ist die Optimierung der Prozessführung aus ökonomischen Gründen sehr wichtig. Die hier durchgeführten Untersuchungen mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) haben gezeigt, dass es durch den Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie möglich ist, relevante Informationen bezüglich des Prozessverlaufs und einzelner Prozessgrößen zu erhalten.

Bei der *E. coli* BL21(DE3) Batch-Kultivierung führen unlimitiertes Wachstum und die begrenzte respiratorische Kapazität der Zellen zur Produktion von Acetat. Im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse aus den 2D-Fluoreszenzspektren der Kultivierung können charakteristische Phasen wie z.B. das exponentielle Wachstum und die Umstellung nach dem Verbrauch der Glucose erkannt werden. Die Reduktion der Variablenzahl liefert zwei Hauptkomponenten, die die gesamte in den Spektren enthaltene Varianz beschreiben. Bei den *E. coli*-Kultivierungen spielen neben den Fluoreszenzintensitäten im Protein- und NADH-Bereich dabei vor allem die Fluoreszenzintensitäten des Flavinbereichs (Riboflavin, FAD und FMN) eine entscheidende Rolle. Wesentliche Prozessvariablen wie die Biotrockenmasse und die Glucosekonzentration können durch die Erstellung von PLS-Modellen mit einem relativen Fehler von 2 % bzw. 5 % vorhergesagt werden. Die Vorhersage der Acetatproduktion ist über die 2D-Fluoreszenzspektren ebenfalls möglich.

Fedbatch-Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3) zur Produktion von Penicillin Amidase werden zur Unterdrückung der Acetatproduktion substratlimitiert

gefahren. Durch die chemometrische Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren einer Fedbatch-Kultivierung mit konstanter Feedrate und Induktion können die einzelnen Prozessphasen und die Stoffwechsellage nach der Induktion detektiert werden. Ebenso können über den Scoreplot der PCA schnell Störungen des Prozessverlaufs erkannt werden. Die Glucosekonzentration, Biotrockenmasse, OD_{600} und auch die gebildete Produktmenge (Aktivität der Penicillin Amidase) können über PLS-Modelle mit sehr guter Genauigkeit aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorhergesagt werden. Dadurch ergibt sich eine ausgezeichnete Möglichkeit zur Bestimmung des optimalen Induktionszeitpunkts, ohne auf zeitaufwändige Offline-Bestimmungen der Zellmasse zurückgreifen zu müssen. Der Verlauf der trotz der Substratlimitierung auftretenden Acetatkonzentration kann bei der Fedbatch-Kultivierung ebenfalls, wenn auch mit geringerer Genauigkeit, über die 2D-Fluoreszenzspektren berechnet werden.

Bei der *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierung mit exponentieller Fütterung und Induktion werden deutlich höhere PA-Aktivitäten und eine geringere Acetatproduktion erreicht.

Durch das Setzen von Glucosepulsen wird bei weiteren *E. coli* BL21(DE3) Fedbatch-Kultivierungen ohne Induktion eine Acetatproduktion gezielt eingeleitet. In den 2D-Fluoreszenzspektren ist die einsetzende Stoffwechsellage durch ein Absinken der RFI im Protein-, NADH- und Flavinbereich zu erkennen. Bei exponentieller Fütterung (Kultivierung FB E1) werden diese Änderungen auch im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse deutlich. Bei der Fedbatch-Kultivierung FB E2 mit konstanter Feedrate werden eine geringere Ausbeute und eine geringere Wachstumsrate erzielt. Gleichzeitig ist über den gesamten Zeitraum Acetat vorhanden, wodurch die Änderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren nach den Glucosepulsen weniger deutlich ausfallen. Die vorhandene Glucosekonzentration liegt hier offenbar oberhalb der kritischen Konzentration.

Die Stoffwechsellage von oxidativ zu oxidoreduktiv kann auch bei *E. coli*-Kultivierungen mittels der 2D-Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden. Damit ist grundsätzlich die Möglichkeit einer fluoreszenzbasierten Glucoseregulation gegeben. Solange zunächst ein rein oxidatives Wachstum stattfindet, kann eine einsetzende Acetatproduktion frühzeitig erkannt werden. Diesbezüglich sind allerdings weitere Optimierungen der Wachstumsparameter für den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) nötig, um die kritische Glucosekonzentration und die maximal einstellbare Wachstumsrate (zur Berechnung der Feedrate bei exponentieller Fütterung) auch für verschiedene Prozessbedingungen genauer zu bestimmen.

7. Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, dass die 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine effektive und zeitnahe Bioprozessbeobachtung ermöglicht. In den Fluoreszenzverläufen der biogenen Fluorophore sind Informationen bezüglich des Stoffwechsels und wesentlicher Prozessgrößen enthalten, die mit Hilfe chemometrischer Auswerteverfahren zugänglich gemacht werden können. Die Korrelation von Offline-Größen mit den Fluoreszenzverläufen gelingt in der Regel sehr gut. In einigen Fällen, vor allem wenn die Bereiche wichtiger Information in den 2D-Fluoreszenzspektren sehr klein sind, können jedoch auch Schwierigkeiten auftreten. In diesen Fällen könnte eine höhere spektroskopische Auflösung den Informationsgehalt deutlich erhöhen und somit zu einer verbesserten Auswertung führen.

Der in dieser Arbeit verwendete BioView[®]-Sensor arbeitet mit je 16 Filtern für Exzitation und Emission bei einem Wellenlängenabstand von 20 nm. Im Zuge der Weiterentwicklung des Geräts ist es mittlerweile auch möglich, jeweils 20 Filter zu verwenden. Durch die individuelle Auswahl der Filter können somit verschiedene, für die Prozessbeobachtung wesentliche Bereiche des Spektrums höher aufgelöst werden.

Um einzuschätzen, inwieweit die Verwendung zusätzlicher Filter in Zukunft sinnvoll ist, wird zum Abschluss dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit *M. Kollecker* eine chemometrische Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren durchgeführt. Dabei soll untersucht werden, wie sich der Informationsgehalt der Spektren in Abhängigkeit vom Wellenlängenabstand der Filter verändert.

7.1. Durchführung

Die 2D-Fluoreszenzmessungen werden mit dem Fluoreszenzspektrometer F-4500 (Hitachi, Japan) durchgeführt. Dessen Funktionsweise ist in Kapitel (3.1.) erläutert. Zur Untersuchung des Informationsgehalts wird eine Lösung aus sieben Fluoreszenzfarbstoffen im Wellenlängenbereich von 270-590 nm für die Exzitation und 310-360 nm für die Emission vermessen. Die Farbstoffe werden nach ihren Fluoreszenzmaxima und Konzentrationen so ausgewählt, dass ein Großteil des zu messenden Wellenlängenbereichs relativ gleichmäßig besetzt ist. In Tabelle (7.1.1.) sind die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe mit den Konzentrationen und den Fluoreszenzmaxima (laut Herstellerangaben) aufgeführt, in Tabelle (7.1.2.) die verwendeten Einstellungen des F-4500.

Tab. 7.1.1.: Konzentration und Fluoreszenzmaxima der zur Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Konzentration	Fluoreszenzmaximum
Rhodamin	$2,5 \cdot 10^{-4}$ µg/mL	ex560/em575
Alexa Fluor 430	$2,5 \cdot 10^{-3}$ µg/mL	ex430/em520
4-Methyl-umbelliferryl-phosphat	$5 \cdot 10^{-4}$ µg/mL	ex320/em380
FITC	$1,25 \cdot 10^{-4}$ µg/mL	ex500/em520
Propidiumiodid	$5 \cdot 10^{-3}$ µg/mL	ex540/em590
Hoechst 33342	0,1 µg/mL	ex355/em465
Sytox Green	0,1 µmol/mL	ex505/em520

Tab. 7.1.2.: Spektrometereinstellungen des Hitachi F-4500 zur Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren

Parameter	
Wellenlängenbereich Exzitation [nm]	270-590
Wellenlängenbereich Emission [nm]	310-630
Wellenlängenabstand (Exzitation und Emission) [nm]	5
Bandbreite [nm]	10

7.2. Informationsgehalt von 2D-Fluoreszenzspektren

Um zu untersuchen, wie sich der Informationsgehalt mit zunehmendem Wellenlängenabstand verändert, werden aus dem aufgenommenen 2D-Fluoreszenzspektrum zunächst durch Auslassung der entsprechenden Wellenlängenmesswerte reduzierte Spektren mit Wellenlängenabständen von je 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm und 30 nm generiert. Die reduzierten Spektren sind inklusive des Originalspektrums in Abbildung (7.2.1.) dargestellt.

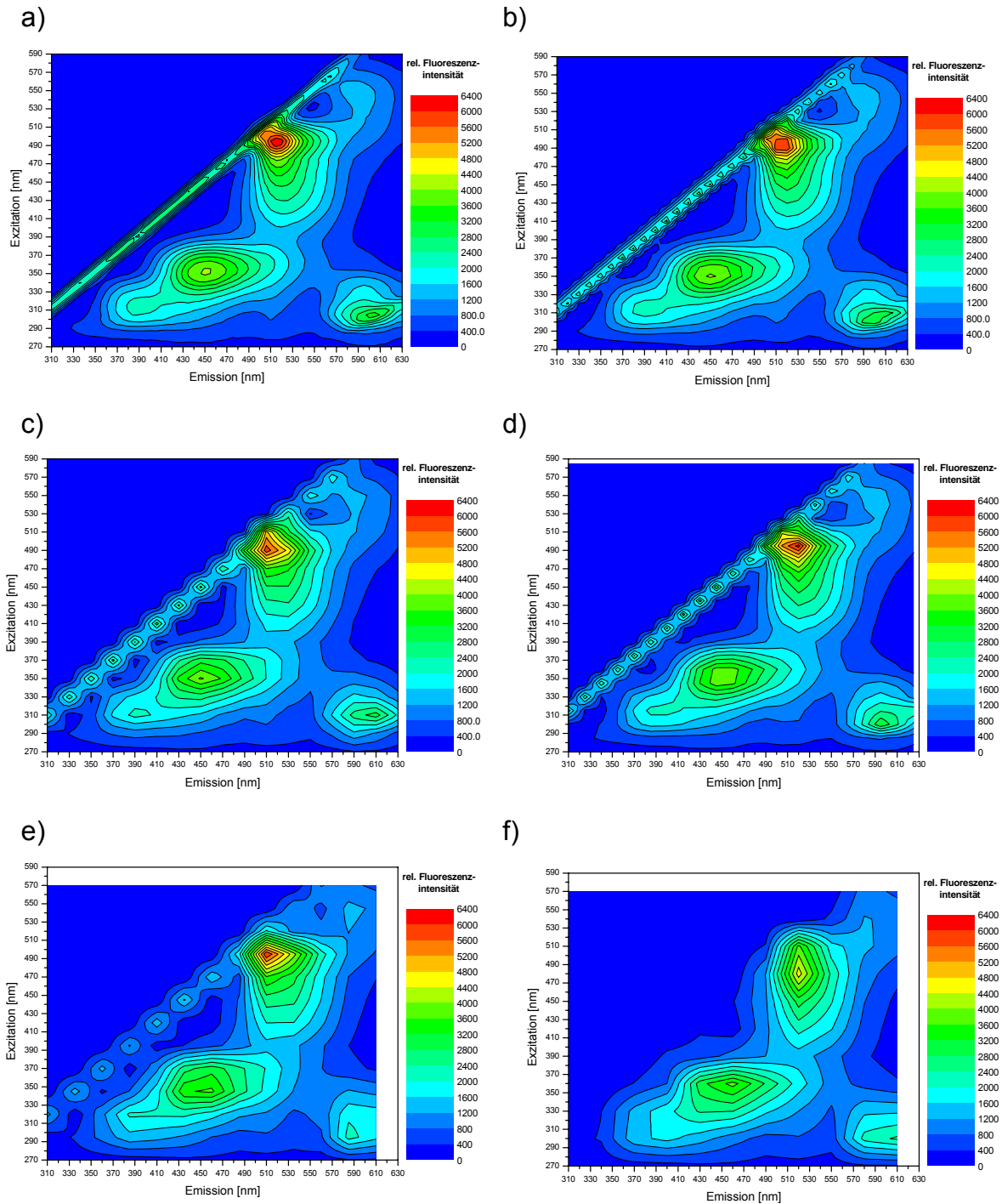


Abb. 7.2.1.: Fluoreszenzspektren der Lösung aus den Farbstoffen Rhodamin, Alexa Fluor 430, 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat, FITC, Propidiumiodid, Hoechst 33342 und Sytox Green aufgenommen mit dem F-4500 Fluoreszenzspektrometer; Bandbreite 10 nm

- a) Wellenlängenabstand $ex + em$ 5 nm, b) Wellenlängenabstand $ex + em$ 10 nm,
 c) Wellenlängenabstand $ex + em$ 15 nm, d) Wellenlängenabstand $ex + em$ 20 nm,
 e) Wellenlängenabstand $ex + em$ 25 nm, f) Wellenlängenabstand $ex + em$ 30 nm

Durch den Vergleich der Spektren in Abbildung (7.2.1.) ist zu erkennen, dass die Peaks ab einem Wellenlängenabstand von 20 nm schon weniger gut und ab einem Wellenlängenabstand von 25 nm noch schlechter aufgelöst werden. Informationen über das Peakmaximum und über die Peak-Umgebung gehen durch die geringere Auflösung verloren.

Um den Informationsverlust quantitativ zu erfassen, wird aus jedem der reduzierten Spektren durch lineare Interpolation ein Spektrum mit einem Wellenlängenabstand von 5 nm neu berechnet und mit dem Originalspektrum verglichen. In Tabelle (7.2.1.) sind die mittleren Fehler der neu berechneten Spektren in Bezug auf das Originalspektrum angegeben.

Tab. 7.2.1.: Relative und absolute Fehler der aus den reduzierten Spektren neu berechneten Spektren in Bezug auf das Originalspektrum (Wellenlängenabstand 5 nm)

Spektrum	Relativer Fehler [%]	Absoluter Fehler [RFI]
Wellenlängenabstand 10 nm	2,1	22,68
Wellenlängenabstand 15 nm	5,0	42,51
Wellenlängenabstand 20 nm	6,5	70,36
Wellenlängenabstand 25 nm	13,9	106,69
Wellenlängenabstand 30 nm	11,5	129,88

Die mittleren Fehler nehmen beim Übergang auf einen Wellenlängenabstand von 15 nm und nochmals beim Übergang auf einem Wellenlängenabstand von 30 nm deutlich zu. Ein relativer Fehler von bis zu 10 % liegt zwar im Toleranzbereich, eine Auflösung von 10 nm oder sogar 5 nm ist für Bereiche mit wichtiger Information aber wesentlich sinnvoller.

In realen Medien treten verschiedenste Wechselwirkungen auf, die die Fluoreszenz beeinflussen. Überlagerungen und gegenseitige Abhängigkeiten erschweren die Auswertung der Spektren. In diesem Zusammenhang ist eine hohe Auflösung besonders erstrebenswert, um benachbarte Peaks im Spektrum getrennt voneinander erfassen zu können. Andernfalls können spezifische Verläufe nicht erkannt werden, da die Auswertung der Daten zumeist auf den Veränderungen im Bereich des Peakmaximums beruht.

Zur Verdeutlichung dieses Problems ist in Abbildung (7.2.2.) eine Ausschnittsvergrößerung der Spektren b) und f) aus Abbildung (7.2.1.) mit Wellenlängenabständen von 10 nm und 30 nm gezeigt.

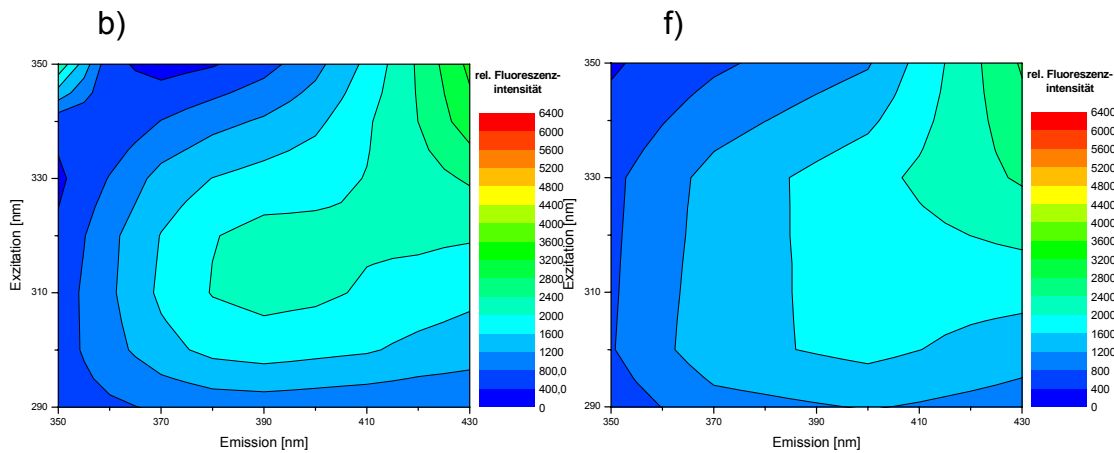


Abb. 7.2.2.: Ausschnittsvergrößerung der Fluoreszenzspektren aus Abb. (7.2.1.)

b) Wellenlängenabstand $\Delta\lambda = 10$ nm, f) Wellenlängenabstand $\Delta\lambda = 30$ nm

Bei einer Auflösung von 30 nm wird der Peak des 4-Methyl-umbelliferrylphosphats (ex320/em380) nicht mehr erfasst, während bei einer Auflösung von 10 nm die Trennung der Peaks noch möglich ist. Der mittlere Fehler in Bezug auf das Originalspektrum (Abb. (7.2.1.a)) steigt im Bereich des Peaks (ex300-325/em380-410) von 1,2 % bei einer Auflösung von 10 nm kontinuierlich bis auf 10,0 % bei einer Auflösung von 30 nm.

Die Darstellung der reduzierten Spektren und die Fehlerberechnung machen bereits deutlich, dass der Informationsgehalt der 2D-Fluoreszenzspektren mit geringerer Auflösung sehr stark abnimmt. Zur genaueren Untersuchung werden die Spektren chemometrisch ausgewertet.

7.3. Chemometrische Sensitivitätsanalyse

Die 2D-Fluoreszenzspektren sollen durch eine Hauptkomponentenanalyse ausgewertet werden. Diese bietet die Möglichkeit, nicht nur einzelne Bereiche sondern die gesamte Information der Spektren zu berücksichtigen. Zur Erhöhung der Spektrenzahl werden neben dem Originalspektrum von sieben Fluoreszenzfarbstoffen auch die Original- sowie reduzierten Spektren der einzelnen Farbstoffe sowie dreier Mischungen unterschiedlicher Komposition verwendet. Für jedes Spektrum wird unabhängig voneinander eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt [Kollecker, 2004]. In der Abbildung (7.3.1.) sind die Score-Werte der 1. PC der (reduzierten) Spektren mit den Wellenlängenabständen $\Delta\lambda = 5, 10, 15, 20, 25$ und 30 nm gegen die Score-Werte der 1. PC der Originalspektren ($\Delta\lambda = 5$ nm) dargestellt. Für die Messpunkte wird eine lineare Regression berechnet.

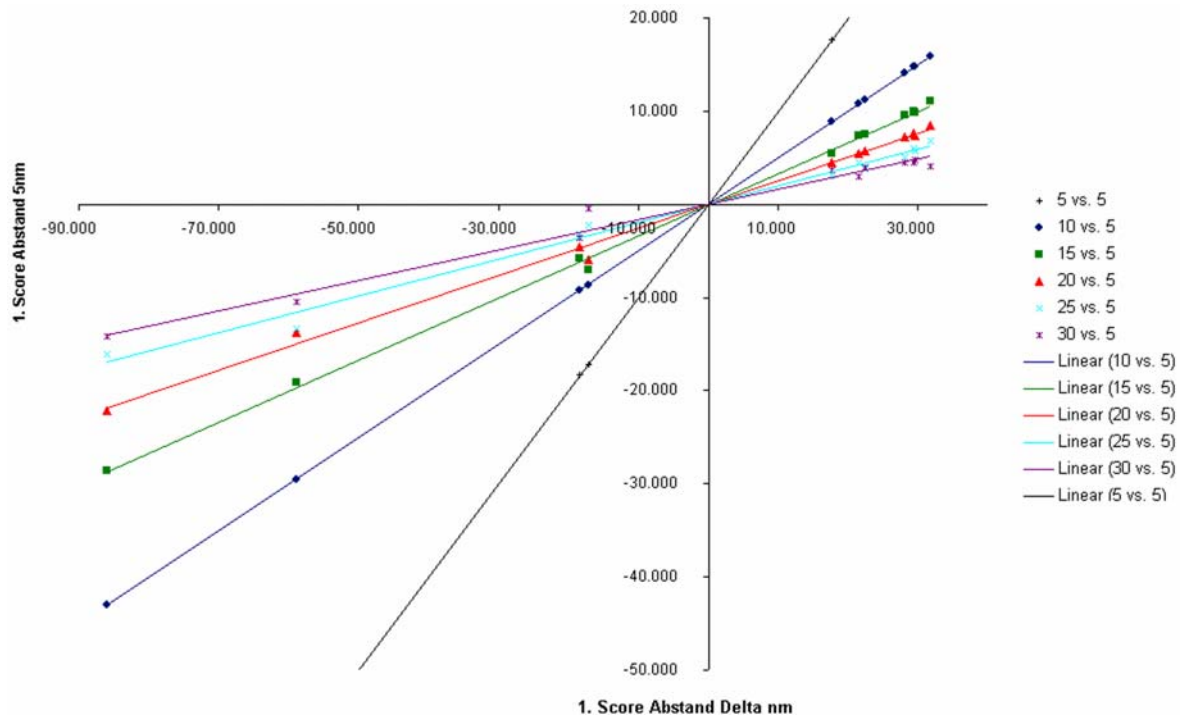


Abb. 7.3.1.: Auftragung der Score-Werte der 1. PC der Spektren mit $\Delta\lambda = 5, 10, 15, 20, 25$ und 30 nm gegen die Score-Werte der 1. PC der Originalspektren ($\Delta\lambda = 5$ nm) mit Regressionsgeraden

Die Auftragung zeigt, dass mit zunehmendem Wellenlängenabstand $\Delta\lambda$ die Steigung der Geraden abnimmt und sich gleichzeitig der Abstand zur ersten Winkelhalbierenden vergrößert. Das bedeutet, die Abweichung der reduzierten Spektren von den Originalspektren nimmt mit steigendem $\Delta\lambda$ zu, die Sensitivität ab.

Da sich die Spektren mit gleichem Wellenlängenabstand über eine lineare Regression korrelieren lassen, ist es durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor a_{Δ} möglich, die Score-Werte der Originalspektren aus den Score-Werten der reduzierten Spektren zu berechnen. Dieser Faktor a_{Δ} steigt entsprechend der größeren Abweichung mit steigendem $\Delta\lambda$ von $1,996$ ($\Delta\lambda = 10$ nm) bis auf $6,135$ ($\Delta\lambda = 30$ nm) an.

Das Bestimmtheitsmaß r^2 der linearen Regression beträgt bei $\Delta\lambda = 10$ nm $0,9999$ und nimmt bis $\Delta\lambda = 30$ nm auf $0,9815$ ab. Auch dieser Befund spricht für eine abnehmende Sensitivität der Messungen. Die größte Abnahme ist auch hier wieder beim Übergang von $\Delta\lambda = 20$ nm auf $\Delta\lambda = 25$ nm zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

7.4. Zusammenfassung

Die Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren hat gezeigt, dass die Sensitivität der 2D-Fluoreszenzmessung mit sinkender Auflösung deutlich nachlässt. Über die Generierung reduzierter Spektren und anschließender Rückberechnung der Originalspektren kann der Informationsverlust quantitativ beschrieben werden. Die chemometrische Auswertung (PCA) und die Auftragung der Score-Werte der 1. PC der reduzierten Spektren gegen die Score-Werte der 1. PC der Originalspektren bestätigt die stark abnehmende Messgenauigkeit ab einem Wellenlängenabstand von 20 nm.

Bei Auflösungen bis zu 20 nm ist der Informationsgehalt ausreichend, für kritische Bereiche innerhalb des Spektrums jedoch eine höhere Auflösung wünschenswert. Hinsichtlich der Bioprozessbeobachtung mit dem BioView[®]-Sensor sind beispielsweise die Fluoreszenzbereiche der biogenen Fluorophore bedeutsam, d.h. der NADH-Bereich um ex350/em450, der Flavinbereich um ex450/em530 oder der Proteinbereich um ex290/em330. Der Einsatz zusätzlicher Filter, um hier eine höhere Auflösung zu erreichen, erscheint daher sinnvoll.

8. Zusammenfassung und Ausblick

In der modernen Biotechnologie stellen industrielle Produktionen hohe Anforderungen an die Prozessbeobachtung und Regelung. Gleichbleibende Produktqualitäten und Ausbeuten sind essentielle Faktoren einer effektiven Prozessführung. Aufgrund der Dynamik und Komplexität biotechnologischer Systeme ist eine empfindliche und selektive Analytik nötig, die eine hohe Verlässlichkeit aufweist. Die zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie bietet neben diesen Eigenschaften die Möglichkeit einer Echtzeit-Überwachung direkt am Prozess. Die in-situ-Messung erlaubt die simultane Detektion verschiedener Analyte, und die nicht-invasive Verfahrensweise schließt ein Kontaminationsrisiko aus. Durch die "open-end"-Detektion ist die Fluoreszenzmessung auch in trüben Medien und sogar an verschiedenen Oberflächen möglich.

Aufgrund der vielfältigen Einflüsse auf die Fluoreszenz, komplexen Wechselwirkungen und der großen Datenmengen müssen intelligente Systeme zur Auswertung der Spektren angewendet werden. In den 2D-Fluoreszenzspektren sind neben offensichtlichen Informationen bezüglich der biogenen Fluorophore auch latente Informationen über den Verlauf verschiedener Prozessgrößen, wie z.B. Substrat- und Produktkonzentrationen enthalten. In den seltensten Fällen findet man dabei eine Abhängigkeit einer Prozessgröße von nur einer Variable, d.h. für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie von nur einer Wellenlängenkombination. Univariate Auswerteverfahren sind daher bei modernen, komplexeren Datenanalysen von begrenztem Nutzen. Über multivariate Auswertesysteme können Abhängigkeiten einer Größe von verschiedenen Faktoren sowie indirekte Zusammenhänge beschrieben werden. Chemometrische Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse dienen dazu, die Informationen des gesamten Spektrums zu erfassen und zu komprimieren. Über die Maximierung der Varianz erfolgt eine Transformation der Ausgangsvariablen (Wellenlängenkombinationen) in wenige neue Variablen. Die Datenreduktion erleichtert das Auffinden wesentlicher Information, ohne dass der Bezug zu den Messgrößen verloren geht. Über die Score- und Loadingwerte können die einzelnen Spektren und Wellenlängenkombinationen weiterhin analysiert werden. Im Scoreplot der Spektren können charakteristische Prozessverläufe aber auch Störungen des Systems erkannt werden. Über die PLS-Regression und Erstellung von Modellen ist es möglich, Fluoreszenzverläufe mit Prozessgrößen zu korrelieren und die für die Beschreibung einer Größe relevanten Variablen zu bestimmen.

In dieser Arbeit wurden die Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie als effektives und sensibles Online-Verfahren zur Prozessbeobachtung und Regelung aufgezeigt. Die chemometrische Auswertung der

Daten durch Hauptkomponentenanalyse und PLS-Regression hat zu neuen Einblicken in Stoffwechselfvorgänge und Prozessverläufe geführt. Die Vielseitigkeit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie konnte an drei verschiedenen Bioprozessen demonstriert werden.

Bei synchronen *S. cerevisiae*-Kulturen (Kapitel (4)) konnten die hoch dynamischen Veränderungen durch die 2D-Fluoreszenzspektroskopie erfasst werden. Über die Hauptkomponentenanalyse wurde eine erhebliche Reduktion der Fluoreszenzdaten erreicht. Es zeigte sich, dass die Varianz der NADH-, Protein- und Flavinfluoreszenz den größten Einfluss auf die neuen Variablen ausübt. Über die Darstellung der Spektren im Scoreplot konnte die Stabilität der beobachteten Oszillationen bestätigt werden. Es fanden sich drei Gruppen von Spektren, die den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden konnten. Durch die Erstellung von PLS-Modellen wurden verschiedene intra- und extrazelluläre Prozessgrößen mit sehr guter Genauigkeit aus den Fluoreszenzspektren vorhergesagt. Die Übertragung der Modelle auf weitere synchrone Kulturen mit abweichender Verdünnungsrate konnte mit kleinen Einschränkungen erreicht werden. Damit ist die Möglichkeit einer Online-Vorhersage wichtiger Prozessgrößen durch die 2D-Fluoreszenzmessung gegeben. Die Untersuchung der zellzyklusabhängigen Genexpression hat gezeigt, dass 690 Gene in der S- und G2/M-Phase unterschiedlich reguliert sind. Der Großteil der zugehörigen Genprodukte konnte zellzyklusrelevanten Funktionen zugeordnet werden.

Anhand von *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen (Kapitel (5)) wurde basierend auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ein Regelungsmodell erstellt, das es erlaubt, den Prozess rein oxidativ bei maximaler BTM-Ausbeute und ohne Ethanolproduktion (Crabtree-Effekt) zu führen. Eine beginnende Ethanolproduktion führt in den Fluoreszenzspektren zu deutlichen Änderungen im Verlauf der NADH- und der Flavinfluoreszenz. Die Regelung basiert auf der Berechnung eines Metabolischen Werts aus den Fluoreszenzspektren, der es erlaubt, den Übergang von oxidativem zu oxidoreduktivem Stoffwechsel bei *S. cerevisiae* frühzeitig zu erkennen. In Kombination mit einem auf einem einfachen Zustandsmodell beruhenden Feedprofil konnte der Prozess nahe der kritischen Glucose-aufnahmerate der Zellen geführt werden. Das erstellte Modell kann auf vergleichbare Fedbatch-Kultivierungen übertragen werden. Die Möglichkeit, Stoffwechseländerungen sofort zu erfassen und somit jederzeit Auskunft über den biologischen Zustand einer Kultur zu erhalten, macht die 2D-Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit geeigneten Regelsystemen zu einem ausgezeichneten Instrument der Prozessautomatisierung.

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde weiterhin an einem Hochzelldichte-Prozess von *E. coli* eingesetzt (Kapitel (6)). Bei der Batch-Kultivierung konnten einzelne Prozessphasen über die Score-Darstellung der PCA der Spektren erkannt werden. Wesentliche Prozessgrößen wie die Glucosekonzentration und die Biotrockenmasse wurden über PLS-Modelle mit den Fluoreszenzspektren korreliert. Bei der chemometrischen Auswertung der *E. coli*-Kultivierungen spielen die Fluoreszenzintensitäten der Flavine eine besondere Rolle.

Bei substratlimitierten *E. coli*-Fedbatch-Kultivierungen mit Induktion zur Produktion von Penicillin Amidase konnten durch eine Hauptkomponentenanalyse der Fluoreszenzspektren der Zeitpunkt der Induktion und weitere Prozessphasen identifiziert werden. Die Vorhersage wichtiger Prozessgrößen wie BTM, Optische Dichte, Glucose- und vor allem auch der Produktkonzentration konnte mit guter Genauigkeit über PLS-Modelle erreicht werden. Damit ergibt sich beispielsweise die Möglichkeit, den Induktionszeitpunkt aufgrund der Online-Vorhersage der Zelldichte zu bestimmen anstatt über zeitaufwändige Offline-Messungen.

Zur weiteren Optimierung der BTM-Ausbeute wurden Ansätze zur fluoreszenzbasierten Glucoseregulation für hochzelldichte *E. coli*-Kultivierungen entwickelt. Bei *E. coli* kommt es aufgrund einer begrenzten respiratorischen Kapazität bei zu hohen Glucosekonzentrationen zur Produktion von Acetat. Durch Glucosepulse während einer Fedbatch-Kultivierung wurde diese Stoffwechseländerung bei *E. coli* erzwungen. Die Acetatproduktion konnte in den 2D-Fluoreszenzspektren durch einen Abfall der RFI im Protein-, NADH- und Flavinbereich beobachtet werden. Die Detektion gelingt dabei besser, je weniger Acetat zu Beginn vorhanden ist. Bei einer Fütterung unterhalb der kritischen Glucosekonzentration sollte es möglich sein, eine einsetzende Acetatproduktion über die Fluoreszenzmessung frühzeitig zu erkennen. Die Sensitivität des Messsystems ist im Vergleich zu der Ethanoldetektion bei *S. cerevisiae* jedoch geringer.

Zur Verbesserung der Sensitivität könnte in einzelnen Bereichen des Spektrums mit wesentlicher Information die Auflösung erhöht werden. Eine chemometrische Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren (Kapitel (7)) hat gezeigt, dass der Informationsverlust ausgehend von einer Auflösung, d.h., einem Wellenlängenabstand von 5 nm mit abnehmender Auflösung deutlich größer wird. Peakmaxima wurden nicht mehr richtig bestimmt, und benachbarte Peaks konnten nicht mehr einzeln erfasst werden. Bis zu einem Abstand von 20 nm liegen die resultierenden Fehler im Toleranzbereich, für einzelne Bereiche mit wichtiger Information ist eine höhere Auflösung allerdings sinnvoll. Für die Bioprozessbeobachtung bieten sich hier besonders die Fluoreszenzbereiche der biogenen Fluorophore an.

Auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse ergeben sich für die Zukunft mehrere Ansatzpunkte, um die Analytik und das Verständnis biotechnologischer Prozesse unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit chemometrischer Datenauswertung weiter zu verbessern.

Bei der Untersuchung des synchronen Wachstums von *S. cerevisiae* haben sich mit der In-situ Mikroskopie und der DNA-Chiptechnologie zwei neue interessante Anwendungen ergeben. Das automatisierte Bildanalyse-System der In-situ-Mikroskopie liefert online Informationen über so wichtige Größen wie Zellzahl, Zellgröße und Vitalität. Neben den Vorteilen des nicht vorhandenen Kontaminationsrisikos und der Vermeidung von Messfehlern bei der Auszählung von Zellproben kann über die Online-Messung zudem eine hohe Datendichte erreicht werden. Die morphologischen Größen können ebenfalls mit den 2D-Fluoreszenzspektren korreliert werden. Das entsprechende Modell wird genauer, je mehr Daten zur Erstellung vorhanden sind. Der erste Einsatz des Mikroskops bei den synchronen *S. cerevisiae*-Kultivierungen hat gezeigt, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zur Verbesserung der Messgenauigkeit noch ein Optimierungspotenzial des Bildaufnahme-Verfahrens besteht.

Die Synchronität der *S. cerevisiae*-Kultur prädestiniert dieses Modellsystem für die Untersuchung der zellzyklusabhängigen Genexpression. Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen können weitere Experimente durchgeführt werden. Zunächst sollten Expressionsprofile aus sämtlichen Zellzyklusphasen aufgenommen und die Resultate aus unterschiedlichen Kultivierungen verglichen werden. Darauf aufbauend ließe sich ein speziell auf die exprimierten Gene zugeschnittener DNA-Chip entwickeln, um die Analyse zu vereinheitlichen und zu optimieren. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Expressionsmuster mit den Fluoreszenzverläufen korrelieren. Ein Einsatz der DNA-Chiptechnologie wäre auch bei *S. cerevisiae* Fedbatch-Kultivierungen denkbar, um zu untersuchen, wie sich das Expressionsmuster bei einem Übergang von oxidativem zu oxidoreduktivem Stoffwechsel ändert.

Zur Entwicklung einer fluoreszenzbasierten Glucoseregulation bei den hochzellichten *E. coli*-Kultivierungen müssen weitere Untersuchungen hinsichtlich der kritischen Glucosekonzentration und der optimalen Wachstumsrate für die Fütterung durchgeführt werden. Anschließend muss analog zu der Glucoseregulation bei *S. cerevisiae*-Kultivierungen ein chemometrisches Modell erstellt werden, das die Stoffwechsellage der Zellen bei einsetzender Acetatproduktion aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorhersagen kann. Vermutlich ist dabei aufgrund der geringeren Sensitivität des Messsystems hinsichtlich der Acetatdetektion die Konzentration auf ausgewählte Fluoreszenzbereiche sinnvoll. Eine höhere Auflösung würde die Vorhersagegenauigkeit gerade bei den *E. coli*-

Kultivierungen sicherlich verbessern. Das Modell sollte anschließend auch bei Fedbatch-Kultivierungen mit Induktion getestet werden.

Bei hohen Zelldichten können sich im Kultivierungsverlauf Schwierigkeiten ergeben, wie beispielsweise Limitierung durch eine Substrat- oder Produkt-hemmung, die schlechtere Löslichkeit fester oder gasförmiger Substanzen und die Anreicherung toxischer Nebenprodukte. Zur Umgehung dieser Probleme wurden verschiedene Filtrations- und Dialysetechniken entwickelt. Das Zellwachstum kann weiter gesteigert werden, indem inhibierende oder toxische Stoffe aus dem Kultivierungsraum entfernt und im Gegenzug Substrat und Nährstoffe zugeführt werden. An der TU Hamburg-Harburg steht ein speziell entwickelter Dialyse-Reaktor für hochzelldichte *E. coli*-Kultivierungen zur Verfügung. Das Wachstum des in dieser Arbeit verwendeten Stamms BL21(DE3) soll in Zukunft über das Dialyseverfahren weiter optimiert werden. Auch bei diesem Verfahren kann die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Prozessbeobachtung eingesetzt werden. Über die Vorhersage der Biomasse könnten z.B. der optimale Zeitpunkt zum Start der Dialyse bestimmt oder auch Wachstumsstörungen infolge schlechter Nährstoffversorgung erkannt werden.

Die chemometrische Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren durch Hauptkomponentenanalyse und PLS-Regression liefert in den meisten Fällen bereits sehr gute Resultate. Die Modellgüte ließe sich weiter verbessern, indem die Datenmatrix der Spektren über mathematische Operationen durch zusätzliche Informationen erweitert wird (z.B. durch die Angabe der Steigung oder quadratischer Terme der Fluoreszenzintensitäten). Die Kalibration kann auch mit Datensätzen mehrerer Kultivierungen durchgeführt werden. Durch die Mittelung verringern sich die Einflüsse unterschiedlicher Prozessbedingungen. In dieser Hinsicht wäre auch der Einsatz eines internen Standards denkbar, der den Prozess nicht beeinflusst und über den Grundlinienverschiebungen der Fluoreszenz ausgeglichen werden könnten.

Die Kombination von 2D-Fluoreszenzspektroskopie und intelligenter Datenauswertung ermöglicht eine zeitnahe und verlässliche Bioprozessbeobachtung. Multivariate Messsysteme gewinnen mit der Etablierung und ständigen Weiterentwicklung chemometrischer Auswerteverfahren zunehmend an Bedeutung. Interdisziplinäres Fachwissen und die Möglichkeiten der modernen Technik werden in Zukunft zu einem wesentlich besseren Verständnis biotechnologischer Prozesse führen.

9. Literatur

- ABU-ABSI N.R., SRIENC F. (2002), Instantaneous evaluation of mammalian cell culture growth rates through analysis of the mitotic index, *J Biotechnology* 95 (1), 63-84
- ADAMS M.J. (1995), *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995
- AKIYAMA A., TSURUGI K. (2003), The GTS1 gene product facilitates the self-organization of the energy metabolism oscillation in the continuous culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol Lett* 228, 105-110
- ANDERSEN K., VON MEYENBURG K., (1980), Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration ?, *J Bacteriology* 144, 114-123
- BACHMANN R., BASTIANELLI E., RIESE J., SCHLENZAKA W. (2000), Using plants as plants, *The McKinsey Quarterly* 2, 92-99
- BAHMED K., QUILES F., BONALY R., COULON J. (2003), Fluorescence and Infrared Spectrometric Study of Cell Walls from *Candida*, *Kluyveromyces*, *Rhodoturula* and *Schizosaccharomyces* Yeasts in Relation with Their Chemical Composition, *Biomacromolecules* 4, 1763-1772
- BELLEGARDT K.H. (1994), Analysis of synchronous growth of baker's yeast. Part I: development of a theoretical model for sustained oscillations; Part II: Comparison of model prediction and experimental data, *J Biotechnology* 35, 19-33; 35-49
- BEUSE M. (1997), *Populationsverteilung und Wachstumsmodi bei Saccharomyces cerevisiae* in synchronen Chemostatkulturen, Dissertation, Universität Hannover, 1997
- BEUSE M., BARTLING R., KOPMANN A., DIEKMANN H., THOMA M. (1998), Effect of the dilution rate on the mode of oscillation in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biotechnology* 61, 15-31
- BEUTEL S., KLEIN K., KNOBBE G., KONIGFELD P., PETERSEN K., ULBER, R., SCHEPER T. (2002), Controlled enzymatic removal of damaging casein layers on medieval wall paintings, *Biotechnol Bioeng* 80 (1), 13-21
- BIO – Biotechnology Industry Organisation (2004), unter www.bio.org
- BIOINFORMATION (2004), unter www.bioinformation.de/wissen/broschuere/chip.htm
- BIROL, G., ZAMAMIRI, A.M., HJORTSO M.A. (2000), Frequency analysis of autonomously oscillating yeast cultures, *Process Biochemistry* 35, 1085-1091

- BOEHL D., SOLLE D., HITZMANN B., SCHEPER T. (2003), Chemometric modelling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess characterization, *J Biotechnology* 105, 179-188
- BOYER P.M., HUMPHREY A.E. (1988) *Biotechnol Letter* 2 (3), 193-198
- BRADAMANTE S., BARENGHI L., BERETTA G., BONFA M., ROLLINI M., MANZONI M. (2002), Production of Lovastatin by an Integrated Approach Based on Chemometrics and DOSY-NMR, *Biotechnol Bioeng* 80(5), 589-593
- BRIMMER P.J., HALL J.W. (1993), Determination of Nutrient Levels in a Bioprocess Using Near-Infrared Spectroscopy, *Canadian J Appl Spectroscopy* 38(6), 155-162
- BRIZA P., BREITENBACH M., ELLINGER A., SEGALL J. (1990), Isolation of two developmentally regulated genes in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev* 4 (10), 1775-1789
- BROCKHINKE A., PLESSOW R., DITTRICH P., KOHSE-HOINGHAUS K. (2000), Analysis of the local conformation of proteins with two-dimensional fluorescence techniques, *Applied Physics B-Lasers and Optics* 71 (5), 755-763
- BRÜCKERHOFF T., RUDOLPH G., FRERICHS J.G., MARTINEZ G., JOERIS K., KONSTANTINOV K., SCHEPER T. (2004), Image analysis based inline monitoring of mammalian and yeast cell cultivation processes, Tagungsband 12. Heiligenstädter Kolloquium, Heiligenstadt 2004
- BRÜCKERHOFF T. (2004), laufende Dissertation, Universität Hannover, 2004
- BUCHHOLZ S. (2004), Automation von RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese, Diplomarbeit, Universität Hannover, 2004
- BURZLAFF A. (2004), laufende Dissertation, Universität Hannover, 2004
- CANGHAI L., ALBANO C.R., BENTLEY W.E., RAO G. (2002), Different Rates of Gene Expression Monitored by Green Fluorescent Protein, *Biotechnol Bioeng* 79 (4), 429-437
- CAZZADOR L., MARIANI L., MARTEGANI E., ALBERGHINA L. (1990), Structured segregated models and analysis of self-oscillating yeast continuous cultures, *Bioprocess Eng* 5, 175-180
- CHARLTON A.J., FARRINGTON W.H.H., BRERETON P. (2002), Application of ¹H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee, *J Agric Food Chem* 50, 3098-3103
- CHEN C.I., McDONALD K.A. (1990), Oscillatory Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture. I: Effects of pH and Nitrogen Levels; II: Analysis of Cell

- Synchronization and Metabolism, *Biotechnol Bioeng* 36, 19-27; 28-38
- CHENINA R. (1993) Ein Fluoreszenzspektrometer zur On-line-Verfolgung von Fermentationsprozessen, Dissertation, Universität Kaiserslautern 1993
- CHO R.J., CAMPBELL M.J., WINZELER E.A., STEINMETZ L., CONWAY A., WODICKA L., WOLFSBERG T.G., GABRIELIAN A.E., LANDSMANN D., LOCKHART D.J., DAVIS R.W. (1998), A Genome-wide Transcriptional Analysis of the Mitotic Cell Cycle, *Molecular Cell* 2 (1), 65-73
- CHUDYK W., BOTTERON C., POHLIG K. (1992), Vapor phase analysis of aromatic organic compounds using laser-induced fluorescence and fiber optics, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* 1587, 242-249
- COPELLA S.J., DHURJATI P. (1990), A mathematical description of recombinant yeast, *Biotechnol Bioeng* 35, 356-374
- COULTER® XL/XL-MLC Durchflussscytometriesystem, Bedienungsanleitung, 1996
- CROSMAN J.T., PINCHUK R.J., COOPER D.G. (2002), Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation, *J Amer Oil Chem Soc* 79 (5), 467-472
- CYGD – COMPREHENSIVE YEAST GENOME DATABASE (2004),
unter: <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast>
- D'AQUINO R. (2003), Green Factories for Pharmaceuticals, CEP 1, 34S-36S
- DE DEKKEN R.H. (1966), The Crabtree effect: a regulatory system in yeast, *J Gen Microbio.* 44, 149-156
- DE LICHTENBERG U., JENSEN T.S., JENSEN L.J., BRUNAK S. (2003), Protein Feature Based Identification of Cell Cycle Regulated Proteins in Yeast, *J Mol Biol* 329 (4), 663-674
- DICKINSON, J.R. (1991) Metabolism and Biosynthesis, in: TUIE M.F., OLIVER S.G. (eds.): *Saccharomyces, Biotechnology Handbooks* Vol. 4, Plenum Press, London New York, 1991
- DUARTE I.F., BARROS A., ALMEIDA C., SPRAUL M., GIL A.M. (2004), Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as a Potential Tool for the Quality Control of Beer, *J Agric Food Chem* 52, 1031-1038
- DUBOC P., MARISON I., VON STOCKAR U. (1996), Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations, *J Biotechnology* 51, 57-72
- DUYSENS L.M.N., AMESZ J. (1957), Fluorescence spectroscopy of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region, *Biochim Biophys Acta* 24, 19-26

- EDWARDS H.G.M., RUSSEL N.C., WEINSTEIN R., WYNN-WILLIAMS D.D. (1995), Fourier-Transform Raman-spectroscopic study of Fungi, *J Raman Spectroscopy* 26, 911-916
- ENFORS S.O. (1992), Control of proteolysis in fermentation of recombinant proteins. *Trends Biotechnol* 10, 310-315
- ERNST & YOUNG (2004), *Per Aspera Ad Astra*, Deutscher Biotechnologie-Report 2004
- ERNST B. (2004), laufende Dissertation, TU HH-Harburg
- ESBENSEN K.H., GUYOT D., WESTAD F. (2000), Multivariate data analysis – In practice, an introduction to multivariate data analysis and experimental design, HiT/TF, 4th Edition, CAMO ASA, Oslo, Norway, 2000
- FASMAN G.D. (1976), Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed., vol. 2, CRC Press, Cleveland, 1976
- FESTEL G., KNÖLL J., GÖTZ H., ZINKE H. (2004), Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie, *CIT* 76(3), 307-312
- FIECHTER A., FUHRMANN G.F., KÄPPELI O. (1981), Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Adv Microbial Physiol* 22, 123-183
- FRERICHS J.-G. (2000), Entwicklung eines In-situ-Mikroskops zur bildgestützten Online-Überwachung von Bioprozessen; Dissertation, Universität Hannover, 2000
- FUNABASHI H., HARUYAMA T., MIE M., YANAGIDA Y., KOBATAKE E., AIZAWA M. (2002), Non-destructive monitoring of rpoS promoter activity as stress marker for evaluating cellular physiological status, *J Biotechnology* 95 (1), 85-93
- GANCEDO J.M. (1998), Yeast Carbon Catabolite Repression, *Microbiol. Mol Bio Rev* 62(2), 334-361
- GOMY C., JOUAN M., DAO N.Q. (1988), A quantitative laser Raman spectrometric method with fibre optics for monitoring an alcoholic fermentation, *Anal Chim Acta* 215, 211
- GOODACRE R., KARIM A., KADERBHAJI M.A., KELL D.B. (1994), Rapid and quantitative analysis of recombinant protein expression using pyrolysis mass-spectrometry and artificial neural networks: Application to mammalian cytochrome *b₅* in *Escherichia coli*, *J Biotechnology* 34, 185-193
- GOODACRE R., TREW S., WRIGLEY-JONES C., SAUNDERS G., NEAL M.J., PORTER N., KELL D.B. (1995), Rapid and quantitative-analysis of metabolites in fermenter broths using pyrolysis mass-spectrometry with supervised learning – Application to the screening of penicillin-chrysogenum fermentations for the overproductions of penicillins, *Anal Chim Acta* 313 (1-3), 25-43

- GORDON S.H., GREEN R.V., WHEELER B.C., JAMES C. (1993), Multivariate FTIR analysis of substrates for protein, polysaccharide, lipid and microbe content: Potential for solid-state fermentations, *Biotech Adv* 11, 665-675
- GUILBAULT G.G. (1973), Practical Fluorescence: Theory, Methods, and Techniques, Dekker, New York, 1973
- HAGMAN A., SIVERTSSON P. (1998), The use of NIR spectroscopy in monitoring and controlling bioprocesses, *Process Control and Quality* 11(2), 125-128
- HALL J.W., MCNEIL B., ROLLINS M.J., DRAPER I., THOMPSON B.G., MACALONEY G. (1996), Near-Infrared Spectroscopic Determination of Acetate, Ammonium, Biomass, and Glycerol in an Industrial *Escherichia coli* Fermentation, *Appl Spectroscopy* 50(1), 103-108
- HARMS P., KOSTOV Y., RAO G. (2002), Bioprocess Monitoring, *Curr Opin Biotechnol* 13, 124-127
- HARRISON D.E.F., CHANCE B. (1970), Fluorimetric Technique for Monitoring Changes in the Level of Reduced Nicotinamide Nucleotides in Continuous Cultures of Microorganisms, *Applied Microbiology* 19 (3), 446-450
- HARTUNG J., ELPELT B. (1999), Multivariate Statistik, 6. Aufl., Verlag Oldenburg, München, Wien, 1999
- HENNIG W. (1998), Genetik, 2. Aufl., Springer, Berlin, 1998
- HEREFORD L.M., OSLEY M.A., LUDWIG T.R.D, MCLAUGHLIN C.S. (1981), Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA, *Cell* 24, 367-375
- HJORTSO M.A. (1996), Population balance models of autonomous periodic dynamics in microbial cultures. Their use in process optimization, *Can J Chem Eng* 74, 612-620
- HOPPENHEIDT K., MÜCKE W., PECHE R., TRONECKER D., ROTH U., WÜRDINGER E., HOTTENROTH S., ROMMEL W. (2004), *Entlastungseffekte für die Umwelt durch Substitution konventioneller chemisch-technischer Prozesse und Produkte durch biotechnologische Verfahren*, Schlussbericht zum UFOPLAN-Vorhaben 202 66 326, Juli 2004
- HORN U., STRITTMATTER W., KREBBER A., KNÜPFER U., KUJAU M., WENDEROTH R., MÜLLER K., MATZKU S., PLÜCKTHUN A., RIESENBERG D. (1996), High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, *Appl Microbiol Biotechnol* 46, 524-532

- HÜLL, D. (2002), Kompensation der Zeitverzögerung von Glucosemessungen bei der Regelung von Kultivierungsprozessen basierend auf einem Kalman-Filter, Diplomarbeit, Universität Hannover, 2002
- IGNATOVA Z.; HÖRNLE C.; NURK A.; KASCHE V. (2002), Unusual Signal Peptide Directs Penicillin Amidase from *Escherichia coli* to the Tat Translocation Machinery, *Biochem Biophys Res Com* 291, 146-149
- IGNATOVA Z.; MAHSUNAH A.; GEORGIEVA M.; KASCHE V. (2003) Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains, *Appl Env Microbiol* 69, 1237-1245
- JOHNSON C.S. (1999), Diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, *Prog Nucl Magn Reson Spectroscopy* 34, 203-256
- JOHNSON H., BROADHURST D., KELL D.B., THEODOROU M.K., MERRY R.J., GRIFFITH G.W. (2004), High-Throughput Metabolic Fingerprinting of Legume Silage Fermentations via Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics, *Appl Environ Microbiology* March 2004, 1583-1592
- JOLIFFE I.T. (1986), Principal Component Analysis, Springer Verlag, New York, 1986
- JONES A., YOUNG D., TAYLOR J., KELL D.B., ROWLAND J.J. (1998), Quantification of Microbial Productivity Via Multi-Angle Light Scattering and Supervised Learning, *Biotechnol Bioeng* 59(2), 131-143
- JONES K.D., KOMPALA D.S. (1999), Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures, *J Biotechnology* 71, 105-131
- JUNG B., LEE S., YANG I. H., GOOD T., COTÉ G. L. (2002), Automated On-Line Noninvasive Optical Glucose Monitoring in a Cell Culture System, *Appl Spectroscopy*, 56 (1), 51-57
- KAPTEYN J.C., TER RIET B., VINK E., DE NOBEL H., VAN DEN ENDE H., KLIS F.M. (2001), Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, *Mol Microbiol* 39 (2), 469-479
- KASCHE V., HAUFLE U., MARKOWSKY D., MELNYK S. ZEICH A.G., GALUNSKI B. (1987), Penicillin amidase from *E. coli*: Enzyme heterogeneity and stability, *Ann N.Y. Acad Sci* 501, 97-102
- KASCHE V., IGNATOVA Z., MÄRKL H., PLATE W., PUNCKT N., SCHMIDT D., WIEGANDT K., ERNST B., (2004), Ca²⁺ is a cofactor required for membrane transport and maturation and is a yield determining factor in high cell density penicillin amidase production, *submitted to Biotechnol Progress*

- KASCHE V.; LUMMER K.; NURK A.; PIOTRASCHKE E.; RIEKS A.; STOEVA S.; VOELTER V. (1999), Intramolecular proteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1433, 76-86
- KEULERS M., KURIYAMA H. (1998), Extracellular signaling in an oscillatory yeast culture, in: Holcombe W.M.L., Paton R., Holcombe R. (eds.), *Information Processing in cells and tissue*, Plenum New York 1998, 85-94
- KOLLECKER M. (2004), laufende Dissertation, Universität Hannover, 2004
- KONSTANTINOV K., KISHIMOTO M., SEKI T., YOSHIDA T (1990), A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng* 36, 750-758
- KORZ D.J., Rinas U., Hellmuth K., Sanders E.A., Deckwer W.-D. (1995), Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*; *J Biotechnology* 39, 59-65
- LE GALL G., PUAUD M., COLQUHOUN I.J. (2001), Discrimination between orange juice and pulp wash by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds, *J Agric Food Chem* 49, 580-588
- LI J.K., ASALI E.C., HUMPHREY A.E., HORVATH J.J. (1991), Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry, *Biotechnol Prog* 7, 21-27
- LINDEMANN C. (1998), Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozessbeobachtung, Dissertation, Universität Hannover, 1998
- LIU W., WANG J., MITSUI K., SHEN H., TSURUGI K. (2002), Interaction of the GTS1 gene product with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 required for the maintenance of the metabolic oscillations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biochem* 269, 3560-3569
- LOPEZ-DIEZ E.C., GOODACRE R. (2004), Characterization of Microorganisms Using UV Resonance Raman Spectroscopy and Chemometrics, *Anal Chem* 76, 585-591
- MAKRIDES S. C. (1996), Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60, 512-538
- MARIEY L., SIGNOLLE J.P., AMIEL C., TRAVERT J. (2001), Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vibrational Spectroscopy* 26, 151-159
- MAROSE S. (1999), Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Universität Hannover 1999

- MARTEGANI E., PORRO D., RANZI B.M., ALBERGHINA L. (1990), Involvement of a cellsize control mechanism in the induction and maintenance of oscillations in continuous cultures of budding yeast, *Biotechnol Bioeng* 36, 453-459
- MATTHEWS T.M., WEBB C. (1991), Culture Systems, in: TUIE M.F., OLIVER S.G. (eds.): *Saccharomyces, Biotechnology Handbooks* Vol. 4, Plenum Press, London New York, 1991
- MAZAREVICA G., DIEWOK J., BAENA J.R., ROSENBERG E., LENDL B. (2004), On-Line Fermentation Monitoring by Mid-infrared Spectroscopy, *Appl Spectroscopy* 58(7), 804-810
- MCGOVERN A.C., ERNILL R., KARA B.V., KELL D.B., GOODACRE R. (1999), Rapid analysis of the expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* using pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy with chemometrics: Application to alpha 2-interferon production, *J Biotechnology* 72(3), 157-167
- MCGOVERN A.D., BROADHURST D., TAYLOR J., KADERBHAI N., WINSON M.K., SMALL D.A., ROWLAND J.J., KELL D.B., GOODACRE R. (2002), Monitoring of Complex Industrial Bioprocesses for Metabolite Concentrations Using Modern Spectroscopies and Machine Learning: Application to Gibberellic Acid Production, *Biotechnol Bioeng* 78(5), 527-538
- MCSHANE M.J., CAMERON B.D., COTE G.L., SPIEGELMAN C.H. (1999), Improving Complex Near-IR Calibrations Using a New Wavelength Selection Algorithm, *Appl Spectroscopy* 53(12), 1575-1581
- MEYER H.P., BEYERLE W., FIECHTER A. (1984) Experiences with the on-line measurement of culture fluorescence during cultivation of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Sporotrichum thermophile*, *J Biotechnology* 1, 341-349
- MOSSOBA M.M., KHAMBATY F.M., FRY F.S. (2002), Novel Application of a Disposable Film to the Analysis of Bacterial Strains: A Chemometric Classification of Mid-infrared Spectroscopy, *Appl Spectroscopy* 56(6), 732-736
- MÜNCH T.; SONNLEITNER B., FIECHTER A. (1992), New insights into the synchronisation mechanism with forced synchronous cultures of *S. cerevisiae*, *J Biotechnology* 24, 299-314
- MUNK L. (1989) Fluorescence analysis in foods, John Wiley & Sons Inc., New York 1989
- NAKANO K., RISCHKE M., SATO S., MÄRKL H. (1997), Influence of acetic acid in the growth of *Escherichia coli* K12 during a high cell density cultivation in a dialysis reactor, *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 597-601

- NAUMANN D. (1998), Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology, in: MANTSCH H.H., JACKSON M. (eds.) *Infrared Spectroscopy: New Tool in Medicine*, Proceedings of SPIE 3275, The International Society for Optical Engineering, Bellingham, WA, 1998, 245-257
- NICHOLSON D.J., KELL D.B., DAVEY C.L. (1996), Deconvolution of the dielectric spectra of microbial cell suspensions using multivariate calibration and artificial neural networks, *Bioelectrochem Bioenergetics* 39, 185-193
- OTTO M. (1997), *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik*, VCH Weinheim 1997
- PAALME T., TIISMA K., KAHRU A., VANATALU K., VILU R. (1990), Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate, *Biotechnol Bioeng* 35, 312-319
- PARULEKAR S.J., SEMONES G.B., ROLF M.J., LIEVENSE J.C., LIM H.C. (1986), Induction and elimination of oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Bioeng* 28, 700-710
- PATNAIK P.R. (2003), Effect of fluid dispersion on cybernetic control of microbial growth on substitutable substrates, *Bioprocess Biosyst Eng* 25, 315-321
- PHAM H.T., LARSSON G., ENFORS S.O. (1998), Growth and Energy Metabolism in Aerobic Fed-Batch Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and Model verification, *Biotechnol Bioeng* 60(4), 474-482
- PORRO D., MARTEGANI E., RANZI B.M., ALBERGHINA L. (1988), Oscillations in continuous cultures of budding yeast: a segregated parameter analysis, *Biotechnol Bioeng* 32, 411-417
- REIJENGA K.A., WESTERHOFF H.V., KHOLODENKO B.N., SNOEP J.L. (2002), Control analysis of autonomously oscillating biochemical networks, *Biophys J* 82, 99-108
- RICHARD P. (2003), The rhythm of yeast, *FEMS Microbiol Rev* 27, 547-557
- RIESEBERG M. (2000), *Durchflussscytometrische Analytik: Ein Weg zur Optimierung biotechnologischer Prozesse*, Dissertation, Universität Hannover, 2000
- RIESENBERG D., GUTHKE R. (1999), High-cell-density cultivation of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 422-430
- RUZICKA J., HANSEN E. (1988), *Flow-Injection Analysis*, 2nd Ed.; John Wiley & Sons, New York, 1988

- SAKAMOTO S., IJIMA S., MATSUZAWA H., OHTA T. (1994), Production of thermophilic protease by glucose-controlled fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *J Ferment Bioeng* 78, 304-309
- SCHANNE O.F., CERETTI E.R.P. (1978), Impedance Measurements in Biological Cells, John Wiley & Sons, New York, 1978
- SCHATZMANN H. (1975), Anaerobes Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, ETH Zürich No. 5504
- SCHEPER T., SCHÜGERL K. (1986), Culture fluorescence studies on aerobic continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Mikrobiol Biotechnol* 23, 440-444
- SCHMITT J., UDELHOVEN T., NAUMANN D., FLEMMING H.C. (1998), Stacked spectra data processing and artificial neural networks applied to FT-IR and FT-Raman spectra in biomedical applications, in: MANTSCH H.H., JACKSON M. (eds.) *Infrared Spectroscopy: New Tool in Medicine*, Proceedings of SPIE 3275, The International Society for Optical Engineering, Bellingham, WA, 1998, 236-244
- SCHÜGERL K., BELLGARDT K.H., KRETZMER G., HITZMANN B., SCHEPER T. (1993), In-situ- und On-line-Überwachung und Regelung biotechnologischer Prozesse, *CIT* 65 (12), 1447-1456
- SCHULMANN S.G. (1985), Molecular luminescence spectroscopy methods and applications – Part 1, *Chem Anal* 77, John Wiley and Sons, New York, 1985
- SCHWEDER O. (2001), Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Analytik von Hefezellkulturen, Diplomarbeit, Universität Hannover, 2001
- SHAW A.D., KADERBHAI N., JONES A., WOODWARD A.M., GOODACRE R., ROWLAND J.J., KELL D.B. (1999), Noninvasive, On-Line Monitoring of the Biotransformation by Yeast of Glucose to Ethanol Using Dispersive Raman Spectroscopy and Chemometrics, *Appl Spectroscopy* 53(11), 1419-1428
- SHOPE T.B., VICKERS T.J., MANN C.K. (1987), The direct analysis of fermentation products by Raman spectroscopy, *Appl Spectroscopy* 41, 908-912
- SILLJE H.H.W., TER SCHURE E.G., ROMMENS A.J.M., HULS P.G., WOLDRINGH C.L., VERKLEIJ A.J., BOONSTRA J., VERRIPS C.T. (1997), Effects of Different Carbon Fluxes on G₁ Phase Duration, Cyclin Expression, and Reserve Carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Bacteriology* 179 (21), 6560-6565
- SKIBSTED E., LINDEMANN C., ROCA C., OLSSON L. (2001), On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration, *J Biotechnology* 88, 47-57

- SOHN H.Y., MURRAY D.B., KURIYAMA H. (2000), Ultradian oscillation of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic continuous culture: hydrogen sulfide mediates population synchrony, *Yeast* 16, 1185-1190
- SONNLEITNER B., KÄPPELI O., (1986), Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis, *Biotechnol Bioeng* 28, 927-937
- SPELLMAN P.T., SHERLOCK G., ZHANG M.Q., IYER V.R., ANDERS K., EISEN M.B., BROWN P.O., BOTSTEIN D., FUTCHER B. (1998), Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization, *Mol Bio Cell* 9, 3273-3297
- SPELLMANN P.T., SHERLOCK G. (2004), Reply: whole-culture synchronization – effective tools for cell cycle studies, *Trends in Biotechnology* 22(6), 270-273
- STÄRK E. (2002), Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren, Dissertation, Universität Hannover 2002
- STRANDBERG L.; ENFORS S.O. (1991), Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 57, 1669-1674
- STRÄSSLE C., SONNLEITNER B., FIECHTER A. (1988), A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. I. Concept, *J Biotechnology* 7, 299-318
- STRÄSSLE C., SONNLEITNER B., FIECHTER A. (1989), A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. II. Experimental verification, *J Biotechnology* 9, 191-208
- STRYER L. (1996), Biochemie, 4. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1996
- TETER S. A.; KLIONSKY D. J. (1999), How to get a folded protein across a membrane, *Trends in Cell Biol* 9, 428-431
- TEUSING B., PASSARGE J., REIJENGA C.A., ESGALHADO E., VAN DER WEIJDEN C.C., SCHEPPER M. (2000), Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry, *Eur J Biochem* 267, 5313-5329
- THOMAS L.C., GREENSTREET J.E.S. (1954), The identification of microorganisms by infrared spectroscopy, *Spectrochim Acta* 6, 302-319
- TIMMINS E.M., QUAIN D.E., GOODACRE R. (1998), Differentiation of Brewing Yeast Strains by Pyrolysis Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Yeast* 14, 885-893

- VAN HOEK P., DE HULSTER E., VAN DIJKEN J.P., PRONK J.T. (1999), Fermentative Capacity in High-Cell-Density Fed-Batch Cultures of Baker's Yeast, *Biotechnol Bioeng* 68(5), 517-523
- VANKOVA R., KUNCOVA G., OPATRNA J., SUSSENBKOVA H., GAUDINOVA A., VANEK T. (2001), Two-dimensional fluorescence spectroscopy – a new tool for the determination of plant cell viability, *Plant Cell Reports* 20 (1), 41-47
- WEIGEL B. (1995), Entwicklung von Enzym-Kartuschen und FIA-Methoden zur On-line-Analytik in Biomedien, Dissertation; Universität Hannover, 1995
- WICKNER R.B. (1991), Methods in Classical Genetics, in: TUIE M.F., OLIVER S.G. (eds.): *Saccharomyces*, *Biotechnology Handbooks* Vol. 4, Plenum Press, London New York, 1991
- WILGENBUS K.K., LICHTER P. (1999), DNA chip technology *ante portas*, *J Mol Med* 77, 761-768
- WINSON M.K., GOODACRE R., TIMMINS E.M., JONES A., ALSBERG B.K., WOODWARD A.M., ROWLAND J.J, KELL D.B. (1997), Diffuse reflectance absorbance spectroscopy taking in chemometrics (DRASTIC). A hyperspectral FT-IT-based approach to rapid screening for metabolite overproduction, *Anal Chim Acta* 348 (1-3), 273-282
- WOEHRER, W., ROEHR M. (1981), Regulatory aspects of baker's yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures, *Biotechnol Bioeng* 23, 567-581
- WOLD H. (1975), Modeling by latent variables: the non-linear iterative partial least squares approach, in J. GANI (ed): *Perspectives in Probability and Statistics*, Academic Press, London 1975
- WOLF J., SOHN H.J., HEINRICH R., KURIYAMA H. (2001), Mathematical analysis of a mechanism for autonomous metabolic oscillations in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett* 459, 81-86
- WOLFBEIS O.S, LEINER M. (1985), Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization, *Anal Chim Acta* 167, 203-215
- WOLFBEIS O.S. (1985), Fluorescence of organic natural products, in: *Molecular luminescence spectroscopy methods and applications - Part 1*, Hrsg.: SCHULMAN S.G., Chemical analysis, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York 1985
- WU Q., HAMILTON T., NELSON W.H., ELLIOT S., SPERRY J.F., WU M. (2001), UV Raman Spectral Intensities of *E. Coli* and Other Bacteria Excited at 228.9, 244.0, and 248.2 nm, *Anal Chem* 73, 3432-3440

- WU Q., NELSON W.H., ELLIOT S., SPERRY J.F., FELD M., DASARI R., MANOHARAN R. (2000), Intensities of *E. coli* Nucleic Acid Raman Spectra Excited Selectively from Whole Cells with 251-nm Light, *Anal Chem* 72, 2981-2986
- YANG H., IRUDAYARAJ J. (2003), Rapid detection of foodborne microorganisms on food surface using Fourier transform Raman spectroscopy, *J Molecular Structure* 646, 35-43
- YEE L.; BLANCH H. W. (1992), Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *Biotechnology* 10, 1550-1556
- YOON S.K., KANG W.K., PARK T.H. (1994), Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate, *Biotechnol Bioeng* 43, 995-999
- ZABRISKIE D.W., HUMPHREY A.E. (1978), Estimation of fermentation biomass concentration by measuring culture fluorescence, *Applied European Microbiology* 35 (2), 337-343
- ZHANG Z., MOO-YOUNG M., CHISTI Y. (1996), Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Adv* 14, 401-435
- ZHAO L.P., PRENTICE R., BREEDEN L. (2001), Statistical modeling of large microarray data sets to identify stimulus-response profiles, *PNAS* 98 (19), 6531-5636

10. Anhang

10.1. Abkürzungen und Symbole

2D	zweidimensional
[BPU/L]	Benzympenicillin-Units pro Liter
BTM	Biotrockenmasse
Cy3, cy5	Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffe
D	Verdünnungsrate
DMSO	Dimethylsulfoxid
$\Delta\lambda$	Wellenlängenabstand
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
em	Emission
ex	Exzitation
ex / em	Wellenlängenkombination Exzitations-/Emissionswellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
\dot{F}	Feedrate
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid (reduzierte Form)
FIA	Fließinjektionsanalyse
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMN	Flavinmononucleotid (oxidierte Form)
FMNH ₂	Flavinmononucleotid (reduzierte Form)
[g]	Gramm
[g/kg]	Gramm pro Kilogramm
[g/L]	Gramm pro Liter
[g/mol]	Gramm pro Mol
GC	Gaschromatograph(ie)
[h]	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
[kPa]	Kilopascal
[L]	Liter
[L/h]	Liter pro Stunde
[L/min]	Liter pro Minute
[M]	molar
[MB]	Metabolisch(er Wert)
[mg/L]	Milligramm pro Liter
[mg/mL]	Milligramm pro Milliliter
[min]	Minute
[mL]	Milliliter
[mL/L]	Milliliter pro Liter
[mm]	Millimeter

[mm ²]	Quadratmillimeter
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
μ	Wachstumsrate
μ_{\max}	maximale Wachstumsrate
μ_{Set}	Wachstumsraten zur Berechnung der Feedrate
[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Mikrogramm pro Milliliter
[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Mikrogramm pro Mikroliter
[μL]	Mikroliter
[μm]	Mikrometer
[μM]	Mikromolar
[$\mu\text{mol}/\text{mL}$]	Mikromol pro Milliliter
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
ND	Neutraldichte
[nm]	Nanometer
OD	Optische Dichte
OUR	Sauerstoffaufnahme (Oxygen uptake rate)
PA	Penicillin Amidase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PC(s)	Hauptkomponente(n) (Principal component(s))
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis)
PLS	Partial least squares
pO ₂	Gelöstsauerstoffgehalt
r ²	Bestimmtheitsmaß der Regression
RNA	Ribonucleinsäure
RQ	respiratorischer Quotient
RFI	relative Fluoreszenzintensität(en)
RMSEP	Root means square error of prediction
[rpm]	Umdrehungen pro Minute (Rührerdrehzahl)
RT	Raumtemperatur
S	Substratkonzentration
S ₀ , S _F	Substratkonzentration in der Feedlösung
S _{G2/M}	Signalintensität der Probe aus der G2/M-Phase
S _S	Signalintensität der Probe aus der S-Phase
[s]	Sekunde
T	Temperatur
t	Zeit
t ₉₀	Zeit, bis 90% des Signalmaximums erreicht sind
TE	Tris-EDTA (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-EDTA)
[U/g]	Units pro Gramm
[U/L]	Units pro Liter
UV	Ultraviolett
[V]	Volt
V, V _R	Reaktorvolumen
[vvm]	Volumen Gaszufuhr pro Reaktorvolumen und Minute
WLK(s)	Wellenlängenkombination(en)
Y, Y _{X/S}	Ausbeute (Biotrockenmasse pro Glucose)

10.2. BioView®-Spezifikationen

Tabelle 10.2.1.: Einstellungen des BioView®-Sensors

Exzitationswellenlängenbereich	270-550 nm
Emissionswellenlängenbereich	310-590 nm
Neutraldichte-Filter Exzitation / Emission	270-590 nm
Schrittweite Exzitation / Emission	20 nm / 20 nm
Bandbreite Exzitation / Emission	20 nm / 20 nm
Mögliche Mehrfachmessungen pro Filtereinstellung	1-16
Photomultiplier-Einstellung	(siehe Tab. 10.2.2.)
Messungen pro Filtereinstellung	3

Tabelle 10.2.2.: Photomultiplier-Einstellung (Gain)

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Anzahl der Filter- Kombinationen	Gain	
			<i>S. cerevisiae</i> - Kultivierungen	<i>E. coli</i> - Kultivierungen
270	310-390	4	1100	1150
	410-590	11	1100	1300
290	330-590	14	1000	1000
310	350-590	13	1200	1200
330	370-590	12	1100	1000
350	390-590	11	1100	1000
370	410-470	4	1000	900
	490-590	6	1000	800
390	430-590	9	1000	850
410	450-590	8	1000	800
430	470-590	7	1000	800
450	490-590	6	1000	800
470	510-590	5	1000	800
490	530-590	4	1000	800
510	550-590	3	1000	800
530	570-590	2	1000	800
550	590	1	1000	800
exND	270-590	15	800	800
270-590	NDem	15	800	800

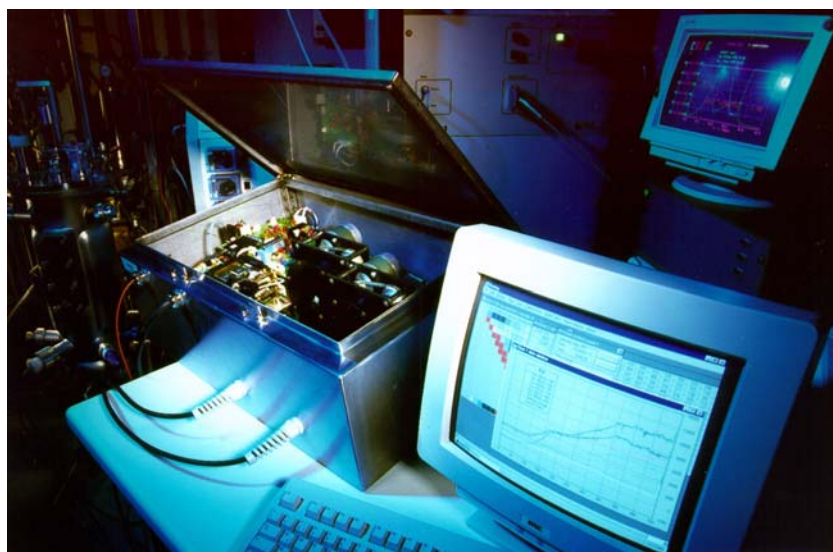
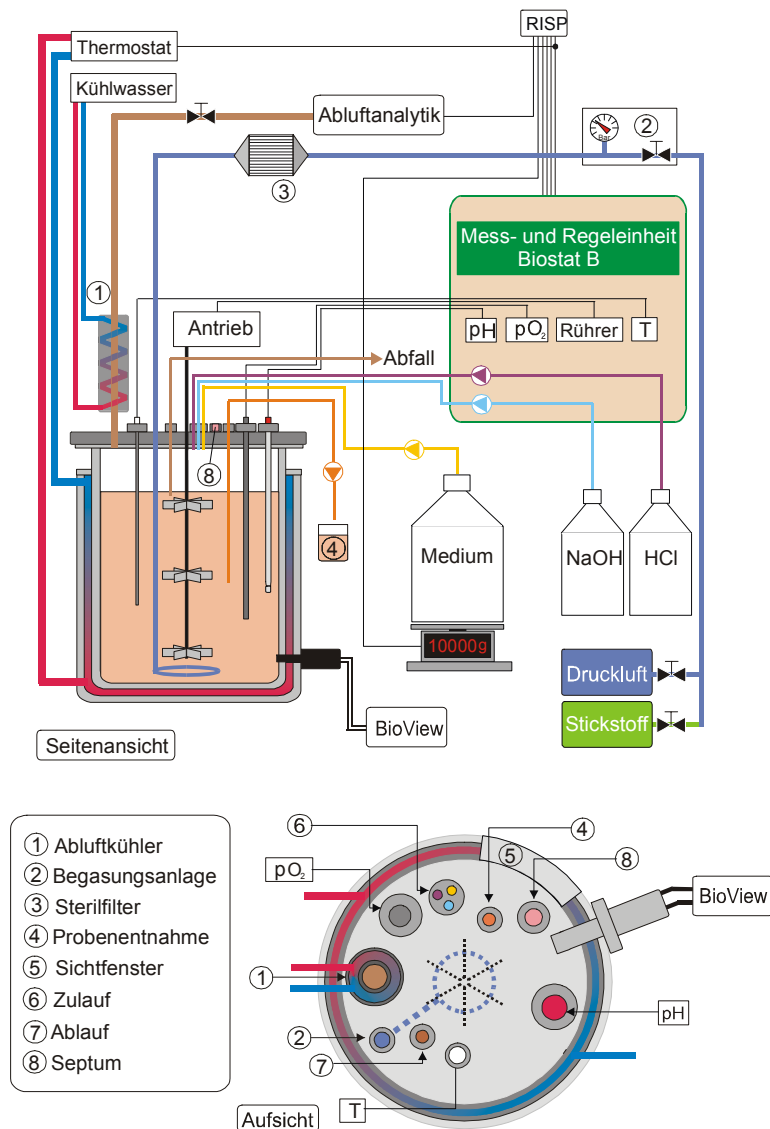


Abb.10.2.1.: BioView®-Sensor und PC zur Datenaufnahme

10.3. Versuchsaufbau



Im Reaktordeckel sind die pH-Elektrode (FermProbe T635, Fa. Broadley & James, USA), die Sauerstoffelektrode (Inpro 6000, Fa. Mettler-Toledo, USA) und das Thermoelement (Pt-100, Fa. Braun Biotech, Melsungen) installiert. Temperiert wird der Reaktor über eine Mantelkühlung. Mittels der Steuereinheit Biostat B (Fa. B. Braun Biotech, Melsungen) wird die Kultur überwacht und geregelt. Mit dem Biostat B verbunden ist eine Workstation, die auf Basis der Software RISP (Realtime Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) arbeitet. Hier werden die Messwerte der Steuereinheit und die Abgasdaten gespeichert. Auch eine Aufarbeitung der Daten (z.B. Berechnung des respiratorischen Quotients aus den Abgasdaten) ist möglich.

Der gekühlte Abluftanschluss ist mit einem Abgasanalysegerät (EGAS 2, Fa. Hartmann & Braun, Frankfurt a.M.) verbunden. Bei den Batch- und Fedbatch-Kultivierungen ist der Ablauf verschlossen bzw. für die Online-Glucosemessung mit einem Probenahmemodul versehen. Die pH-Wert-Regulation erfolgt bei Hefe-

Kultivierungen mit Natronlauge (10%ig) und Salzsäure (4M), bei den *E. coli* - Kultivierungen mit Ammoniak (25%ig) und Schwefelsäure (10%ig), außerdem wird hierbei zusätzlich mit Sauerstoff begast.

10.4. Medien

10.4.1. Schatzmann-Medium für *S. cerevisiae* [nach Schatzmann, 1975]

	Substanz	Konzentration [g/L]
	Glucose	30,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,9
	KCl	0,9
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,34
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,42
Mineralsalzlösung	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,5 · 10 ⁻²
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,9 · 10 ⁻²
	MnSO ₄ · 2H ₂ O	1,05 · 10 ⁻²
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,24 · 10 ⁻²
Vitaminlösung	m-Inosit	6,0 · 10 ⁻²
	Ca-Pantothenat	3,0 · 10 ⁻²
	Thiamin · HCl	0,6 · 10 ⁻²
	Pyridoxol · HCl	0,15 · 10 ⁻²
	Biotin	0,3 · 10 ⁻⁴

Das Schatzmann-Medium wird sowohl für die Vorkultur als auch die Hauptkultur und den Feed (bei den Fedbatch-Kultivierungen mit abweichender Glucosekonzentration) verwendet.

Die Mineralsalz- und die Vitaminlösung werden 1000fach konzentriert in aqua bidest. angesetzt und bei 4°C gelagert. Für das Medium werden ca. 2/3 des benötigten Volumens an aqua dest. mit konz. Schwefelsäure auf pH 2 gebracht und anschließend sämtliche Mineralsalze gelöst, bevor die Puffersalze, das restliche Wasser und Antischaummittel (Desmophen, 1:10000) zugegeben werden. Die Glucose wird separat in einem Zusatzgefäß autoklaviert und erst kurz vor dem Animpfen in den Reaktor gegeben. Die Vitaminlösung wird ebenfalls über einen Sterilfilter direkt in den Reaktor injiziert.

Für die kontinuierlichen und die Fedbatch-Kultivierungen wird das Feed-Medium komplett angesetzt und über zwei hintereinander geschaltete Sterilfilterkartuschen (1,2 µm Sartopure PP2 und 0,45/0,2 µm Sartobran P, Sartorius AG, Göttingen) in ein steriles Vorratsgefäß gepumpt.

Das Feed-Medium für die kontinuierlichen Kultivierungen enthält zusätzlich Antibiotika (Chloramphenicol $0,3 \cdot 10^{-4}$ g/L, Tetracyclin $0,2 \cdot 10^{-4}$ g/L, Ampicillin $0,5 \cdot 10^{-4}$ g/L).

10.4.2. Medien für *E. coli* [Ernst, 2004]

Vorkultur:

	Substanz	Konzentration [g/kg]
LB-Medium	Hefeextrakt	5
	Trypton	10
	NaCl	10
	Chloramphenicol	0,025

Hauptkultur:

	Substanz	Konzentration im Reaktor [g/kg]
Stock Grund	Na ₂ HPO ₄	6
	KH ₂ PO ₄	3
	NaCl	0,5
	NH ₄ Cl	1
Stock Eisen	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,05
Stock Magnesium	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,07
	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,06
Stock Calcium	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,15
Stock Sulfat	Na ₂ SO ₄	0,02
Stock Spuren	ZnSO ₄ *7H ₂ O	$3 \cdot 10^{-5}$
	CuSO ₄ *5H ₂ O	$1,3 \cdot 10^{-5}$
	MnSO ₄ *H ₂ O	$4,5 \cdot 10^{-6}$
	H ₃ BO ₄	$2 \cdot 10^{-6}$
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *5H ₂ O	$1,4 \cdot 10^{-6}$
	Chloramphenicol	0,025
	Thiamin·HCl	0,005
	Glucose	11

Die Stocklösungen werden konzentriert einzeln angesetzt und bei RT aufbewahrt. Im Reaktor wird der Stock Grund, der Stock Eisen, Wasser sowie 0,25 mL/L Desmophen vorgelegt. Alle weiteren Substanzen werden über Sterilfilter nach dem Autoklavieren in den Reaktor gegeben.

Feed:

	Substanz	Konzentration [g/kg]
Stock Eisen	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,05
Stock Magnesium	MgSO ₄ *7H ₂ O	2,1
	MgCl ₂ *6H ₂ O	1,8
Stock Calcium	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,15
Stock Sulfat	Na ₂ SO ₄	0,06
Stock Spuren	ZnSO ₄ *7H ₂ O	3·10 ⁻⁵
	CuSO ₄ *5H ₂ O	1,3·10 ⁻⁵
	MnSO ₄ *H ₂ O	4,5·10 ⁻⁶
	H ₃ BO ₄	2·10 ⁻⁶
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *5H ₂ O	1,4·10 ⁻⁶
	Thiamin·HCl	0,005
	Glucose	636,4

Glucosemonohydrat wird in der entsprechenden Menge Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend werden die Zusätze über Sterilfilter injiziert.

10.5. Vorkulturen**10.5.1. *S. cerevisiae***

Die Anzucht der Vorkultur erfolgt in einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen und Animpfnadel. Zu 50 mL Schatzmann-Medium werden 5,8 g/L Na-Citrat gegeben, und der Kolben wird autoklaviert. Glucose und Vitamine werden in ca. 10 mL aqua dest. gelöst anschließend steril dazugegeben. Angeimpft wird unter sterilen Bedingungen mit einer auf Schrägagar gehaltenen Kultur. Die Vorkultur wird anschließend ca. 20h in einem Schüttelschrank bei 120 rpm und 30°C inkubiert.

10.5.2. *E. coli*

Zur Anzucht der Vorkultur werden 100 mL LB-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen autoklaviert und anschließend 80 µL Chloramphenicol aus einer Stammlösung in Ethanol (34 mg/mL) zugegeben. Der Kolben wird mit einem aufgetauten Aliquot einer bei -80°C aufbewahrten Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C und 175 rpm in einem Schüttelschrank inkubiert. Dabei wird regelmäßig die Optische Dichte bestimmt, und bei einer OD von 1 wird der Reaktor mit 25 mL/L Reaktorvolumen angeimpft.

10.6. Online-Analytik

10.6.1. pH-Wert

Zur Messung des pH-Wertes wird eine sterilisierbare Gelelektrode (FermProbe T635, Fa. Broadley & James, USA) verwendet, die mit der Steuereinheit des Fermenters verbunden ist. Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgt vor dem Autoklavieren der Bioreaktoren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,01 und pH 7,0, Fa. Mettler Toledo, USA). Zur Aufbewahrung wird die Elektrode in 3M Kaliumchloridlösung getaucht.

10.6.2. Gelöstsauerstoff (pO₂)

Der Gelöstsauerstoff wird mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Inpro 6000, Fa. Mettler-Toledo, USA) als Sauerstoffpartialdruck amperometrisch gemessen. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, die die Messlösung von der Ag-Anode und Pt-Kathode trennt, und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert.

Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren im Fermenter-System kalibriert. Vor der Kalibration muss die Elektrode 6 h polarisieren. Zur Kalibration wird zunächst durch Begasung mit Stickstoff der 0 %-Wert eingestellt. Der 100 %-Wert wird durch Begasung mit Druckluft bzw. Sauerstoff unter Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl und Begasungsrate) eingestellt. Die während der Fermentation gemessenen Werte geben die relative Sauerstoffsättigung an.

10.6.3. Abgasanalytik

Die Abgasanalyse wird mit dem EGAS 2 der Firma Hartmann & Braun, Frankfurt a.M., durchgeführt. Das Gesamtsystem zur Messgasaufbereitung besteht aus dem Messgaskühler mit Kondensatauffanggefäß zum Trocknen des Messgases, der Messgasfördereinheit mit Überwachung von Fluss und Feuchtigkeit und den Analysegeräten zur Messung von Kohlendioxid und Sauerstoff.

Sauerstoffmessung

Der Sauerstoffgehalt wird elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Der Sauerstoffsensor nach dem Stromsondenprinzip besteht aus einer elektrochemischen Zelle mit röhrenförmigem Festelektrolyten aus sauerstoffionenleitender Zirkondioxidkeramik, auf deren Innen- und Außenfläche poröse elektronenleitende Schichten als Elektroden aufgebracht sind. Der mit Yttriumoxid dotierte Zirkondioxid-Festelektrolyt enthält in seinem Kristallgitter Sauerstoff-Leerstellen, die eine mit der Temperatur exponentiell zunehmende Sauerstoffionenleitfähigkeit ermöglichen. Oberhalb der Mindesttemperatur der Sonde (ca. 650°C) ist die Messung temperaturunabhängig. Durch Anlegen einer

Gleichspannung von 0,4-1,0 V wird in der rohrförmigen Zirkondioxid-Festelektrolytzelle ein Gleichstromsignal erzeugt, das der Sauerstoffionenkonzentration des zu messenden Gases direkt proportional ist.

Kohlendioxidmessung

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

Die Kalibration der Abgasanalytik erfolgt manuell mit Eichgas der Zusammensetzung 2,0 % CO₂, 19,0 % O₂, Rest N₂.

10.6.4. Respiratorischer Quotient

Der respiratorische Quotient beschreibt das Verhältnis von Kohlendioxidproduktionsrate und Sauerstoffaufnahme.

$$RQ = \frac{CPR}{OUR} \quad (10.6.4.1.)$$

Die Sauerstoffverbrauchsrate (OUR - Oxygen uptake rate) ist definiert als:

$$OUR = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{O_2}^E - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{O_2}^A \right\} \quad (10.6.4.2.)$$

und die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CPR – Carbon dioxide production rate) als:

$$CPR = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{CO_2}^A - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{CO_2}^E \right\} \quad (10.6.4.2.)$$

Mit:

- f_E : Volumenstrom des eintretenden Gases [L/h]
 V_M : Molvolumen des idealen Gases (22,41 L/mol)
 V_R : Arbeitsvolumen [L]
 $x_{O_2}^E$: Molenbruch des Sauerstoffs im Gaseintritt
 $x_{O_2}^A$: Molenbruch des Sauerstoffs im Gasaustritt
 $x_{CO_2}^E$: Molenbruch des Kohlendioxids im Gaseintritt
 $x_{CO_2}^A$: Molenbruch des Kohlendioxids im Gasaustritt

10.6.5. FIA-Puffer

Substanz	Konzentration [g/L]
K ₂ HPO ₄	4,3
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	2,2
NaCl	3,0
EDTA	1,5
NaN ₃	0,065

10.7. Offline-Analytik

10.7.1. Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Improved-Zählkammer (Firma LO - Laboroptik, Friedrichsdorf) sowie ein Forschungsmikroskop Olympus IX-50 mit 200-facher Vergrößerung (Firma Olympus, Japan) verwendet. Die Probe wird mit 0,9%iger NaCl-Lösung so verdünnt, dass sich in einem Großquadrat (Fläche 1 mm², Höhe 0,1 mm) ca. 200 Zellen befinden.

10.7.2. Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgt gravimetrisch. Dazu werden je Probe zwei Mal 1,6 mL Kulturlösung in ausgeheizte und gewogene Eppendorf Microreaktionsgefäße (2 mL) gefüllt und nach jeder Zugabe in einer Zentrifuge (Centrifuge 5415 D, Fa. Eppendorf, Hamburg) 2 min bei 10000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird für weitere Offline-Bestimmungen bei -20°C eingefroren. Nach Trocknung der Zellpellets im Trockenschrank bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz (24 h) wird das Microreaktionsgefäß erneut ausgewogen.

10.7.3. Optische Dichte

S. cerevisiae:

Die Optische Dichte (OD_{590}) der Kulturlösung wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 590 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung gemessen. Die Probe wird vor der Messung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung so verdünnt, dass die Extinktion unter 0,7 liegt (linearer Bereich). Es werden jeweils drei Parallelbestimmungen durchgeführt, um Verdünnungsfehler zu minimieren.

E. coli:

Die Optische Dichte (OD_{600}) der Kulturlösung wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen aqua dest. gemessen. Die Probe wird vor der Messung mit aqua dest. so verdünnt, dass die Extinktion im Bereich von 0,1 bis 0,3 liegt. Es werden ebenfalls jeweils drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

10.7.4. Glucose

Bestimmung mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select:

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgt mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select der Firma Yellow Springs Instruments, USA. Die Glucose wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Dieses wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelluloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert. Die Kalibration des Gerätes erfolgt mit einem Glucosestandard mit 2 g/L.

Bestimmung mit dem Reflectoquant® Glucosetest:

Bei geringeren Glucosekonzentrationen von weniger als 100 mg/L wird die Glucosebestimmung mit Reflectoquant® Glucose-Teststreifen (Fa. Merck, Darmstadt) durchgeführt. Auf diesen ist das Enzym Glucoseoxidase fixiert. Die Glucosebestimmung findet durch die Detektion der gebildeten Wasserstoffperoxidmenge statt. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit einem Redoxindikator, der sich blaugrün verfärbt. Die Farbintensität wird mit dem Reflektometer RQflex plus® der Firma Merck, Darmstadt gemessen. Die Angabe der Glucosekonzentration erfolgt in mg/L.

10.7.5. Ethanol

Die Ethanolbestimmung wird gaschromatographisch mit dem Gaschromatograph GC-14B (Fa. Shimadzu, Japan) nach einer Zwei-Punkt-Kalibration durchgeführt. Als Interner Standard wird n-Propanol (8 g/L) zugegeben. Das Probevolumen beträgt 0,5 µl. Die Einstellungen des Geräts sind den Tabellen 10.7.5.1. und 10.7.5.2. zu entnehmen.

Tabelle 10.7.5.1.: Gasfluss

	Gas	Druck [kPa]
Brenngas	Wasserstoff	65
Brenngas	Luft	50
Trägergas P	Stickstoff	500
Trägergas M	Stickstoff	330

Tabelle 10.7.5.2.: Temperaturprogramm (Laufzeit 10 min)

	Temperatur	Typ
Injektor	275°C	
Säule	70 - 190°C	Chromosorb 101, 80/100, 6` x 18
Detektor	250°C	Flammenionisationsdetektor

Die Daten werden mit der Class VP 4.2 Software von Shimadzu, Japan aufgenommen und ausgewertet.

10.7.6. Acetat

Acetat wird photometrisch mit dem UV-Test Essigsäure(Acetat) der Firma Boehringer Mannheim/ R-biopharm, Darmstadt, durchgeführt. Hierbei wird Acetat durch eine enzymkatalysierte Reaktion zu Acetyl-CoenzymA umgesetzt. Dieses reagiert mit Oxalacetat zu Citrat und CoenzymA, wobei zur Bildung des benötigten Oxalacetats aus L-Malat NAD zu NADH reduziert wird. Über die Extinktion des gebildeten NADH bei 340 nm lässt sich die Acetat-Konzentration bestimmen. Die Messungen werden an einem Cary 50 Bio UV-VIS Spektrometer (Fa. VARIAN, Darmstadt) durchgeführt. Die Proben werden vor Durchführung der Messprozedur entsprechend der Anleitung mit Wasser für den Messbereichs von 0,03 bis 0,15 g/L Acetat verdünnt.

10.8. Cytometrie

10.8.1. Zellzyklus

Zur Bestimmung des Zellzyklus werden 100 μL der in Ethanol fixierten Zellen in 1000 μL PBS suspendiert. Nach Zentrifugation (800 g, 5 min) wird das Zellpellet in 200 μL PBS resuspendiert und mit 100 μL RNase-Lösung (2 mg/mL in PBS) versetzt. Die Zellsuspension wird über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach Resuspension in 900 μL PBS werden 100 μL einer 5 μM Sytox Green-Lösung zugegeben und wiederum für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Zellen in 1 mL PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

10.8.2. Proteine

Für die Messung des Gesamtproteingehalts werden 100 μL der in Ethanol fixierten Zellen in 1 mL PBS suspendiert. Nach Zentrifugation (800 g, 5 min) wird das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert und mit 100 μL FITC-Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO) versetzt. Die Zellsuspension wird 20 min im Thermomixer bei 800 rpm und RT inkubiert, anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen, in 1 mL PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

10.8.3. Lipide

Für die Messung der Neutrallipide werden 100 μL der in Ethanol fixierten Zellen in 1 mL PBS suspendiert. Nach Zentrifugation (800 g, 5 min) wird das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert und mit 100 μL BODIPY-Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO) versetzt. Die Zellsuspension wird 20 min im Thermomixer bei 800 rpm und RT inkubiert, anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen, in 1 mL PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

10.9. DNA-Chiptechnologie [Buchholz, 2004]

10.9.1. Isolation der RNA

Zur Probennahme wird 1 mL der Kulturbrühe möglichst schnell abpipettiert und sofort bei -80°C eingefroren. Aus den aufgetauten Zellen wird mit dem RNeasy mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, die RNA isoliert. Die genaue Versuchsdurchführung kann unter www.qiagen.com als Handbook erhalten werden. Die RNA-Präparation erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst findet die Lyse der Zellwand statt. Hierzu wird Lytikase in 1 M Sorbitol und 0,1 M EDTA gelöst. Die Zellen werden 30 min in 100 μL Sorbitol-Puffer inkubiert und anschließend nach Zugabe des Lysepuffers 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Total-RNA im Lysat wird nach DNA-Abbau durch DNAsen und verschiedenen Reinigungsschritten mit Ethanol gefällt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wird photometrisch bei 260 nm (Extinktion Nukleinsäuren) und 280 nm (Extinktion Restprotein) gegen TE-Puffer, pH 8, bestimmt.

10.9.2. DNA-Chip-Herstellung

Die gereinigte RNA-Lösung wird unter Verwendung des Qiagen Labelstar Kits hybridisiert. Während der reversen Transkription werden die Proben der unterschiedlichen Zellzyklusphasen cy3- bzw. cy5-markiert. Die resultierende cDNA wird mit dem Qiagen Purification Kit aufgereinigt und nach Einrotieren anschließend in einem Hybridisierungspuffer aufgenommen. Die Proben werden auf einen Pan[®] Yeast Array-Chip der Firma MWD Biotech, Ebersberg, aufgetragen und über Nacht bei 42°C inkubiert. Der zugehörige Application Guide ist unter www.mwg-biotech.com zu finden. Der Chip wird mit dem Array Scanner 428[™] (Affymetrix Inc., USA) unter Verwendung der Software Affymetrix Jaguar[™] Image Processing eingescannt. Die Signale werden nach Intensität und Markierung ausgewertet.

10.10. Übersicht Genexpressionsanalyse

Genename	Gene Description	Quotient $S_S/S_{G2/M}$
HOR7	hyperosmolarity-responsive protein	-4476
RPS5	ribosomal protein S5.e	-3421
YEF3	translation elongation factor eEF3	-2718
HKR1	Hansenula MrakII k9 killer toxin-resistance protein	-2301
SUB2	probably involved in pre-mRNA splicing	-1419
DIT2	cytochrome P450 56	-1231
FAS2	fatty-acyl-CoA synthase, beta chain	-1140
CCR4	transcriptional regulator	-1015
ALD4	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	-863
ARO8	aromatic amino acid aminotransferase I	-750
POR1	mitochondrial outer membrane porin	-740
CPA1	arginine-specific carbamoylphosphate synthase, small chain	-710
MRS6	geranylgeranyltransferase regulatory subunit	-680
ENO2	enolase II (2-phosphoglycerate dehydratase)	-670
CDC19	pyruvate kinase	-560
RIB5	riboflavin synthase, alpha chain	-550
LYS21	homocitrate synthase	-526
TDH4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4	-507
RPL39	60S large subunit ribosomal protein L39.e	-485
PPH21	protein ser/thr phosphatase PP2A-1	-431
NCR1	involved in sterol homeostasis and trafficking	-429
RPS0B	40S ribosomal protein p40 homolog B	-415
NAR1	protein with similarity to human nuclear prelamin A recognition factor	-391
ERG25	C-4 sterol methyl oxidase	-346
APL6	AP-3 complex subunit, beta3-adaptin, 91 KD	-340
TY2B	TY2B protein	-321
TPI1	triose-phosphate isomerase	-321
RPL26B	60S large subunit ribosomal protein	-321
URA2	multifunctional pyrimidine biosynthesis protein	-321
SCW5	glucanase gene family member	-267
HXT13	high-affinity hexose transporter	-262
CLB5	cyclin, B-type	-261
SLN1	two-component signal transducer	-258
STF1	ATPase stabilizing factor, 10 kDa	-258
BMH2	14-3-3 protein involved in rapamycin-sensitive signalling	-257
QCR10	ubiquinol--cytochrome-c reductase 8.5 kDa subunit	-241
ARO4	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase, tyrosine-inhibited	-237
RAT1	5'-3' exoribonuclease	-233
RPS1B	ribosomal protein S3a.e	-232
TFB1	TFIIH subunit (transcription initiation factor), 75 kD	-230
VHT1	plasma membrane H+-biotin symporter	-228
RPS13	ribosomal protein	-228
QCR9	ubiquinol--cytochrome-c reductase subunit 9	-218
MSS11	activator of STA1, STA2, and STA3	-216
SEC1	protein transport protein	-213
CWP1	cell wall mannoprotein	-208
COP1	coatomer complex alpha chain of secretory pathway vesicles	-204
TFG2	TFIIF subunit (transcription initiation factor), 54 kD	-203
KEM1	multifunctional nuclease	-202
AAR2	A1 cistron splicing factor	-202

MSH3	DNA mismatch repair protein	-198
ATP7	F1F0-ATPase complex, FO D subunit	-195
SPS19	peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	-191
PHB2	Prohibitin	-190
SUA5	translation initiation protein	-190
APE3	vacuolar aminopeptidase Y	-189
HXT2	high-affinity hexose transporter	-189
YET1	Yeast endoplasmic reticulum 25 kDa transmembrane protein	-183
FHL1	transcriptional activator of the forkhead/hnf3 family	-182
YPD1	phosphorelay intermediate between SLN1P and SSK1P	-179
GRE1	induced by osmotic stress	-177
ACC1	acetyl-CoA carboxylase	-177
GUT1	glycerol kinase	-177
KAR2	nuclear fusion protein	-176
ATP2	F1F0-ATPase complex, F1 beta subunit	-176
PRY1	contains homology to the plant PR-1 class of pathogen related proteins	-171
RPL19A	60S large subunit ribosomal protein L19.e	-171
TIF7	translation initiation factor 6 (eIF6)	-168
SPB4	ATP-dependent RNA helicase of DEAH box family	-164
NIT2	nitrilase	-163
OM45	protein of the outer mitochondrial membrane	-161
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase	-160
RPS7A	ribosomal protein	-160
RPS30A	40S small subunit ribosomal protein	-160
MRS5	subunit of the TIM22-complex	-159
PRI1	DNA-directed DNA polymerase alpha 48kDa subunit (DNA primase)	-158
RPS21A	ribosomal protein S21.e	-157
ANP1	required for protein glycosylation in the golgi	-157
SAS3	silencing protein	-156
LYS9	saccharopine dehydrogenase (NADP+, L-glutamate forming)	-155
RPS26A	40S small subunit ribosomal protein S26.e.c7	-155
RPC19	DNA-directed RNA polymerase I,III 16 KD subunit	-153
TOP1	DNA topoisomerase I	-150
RPL19B	60S large subunit ribosomal protein L19.e	-149
LYS12	homo-isocitrate dehydrogenase	-149
AI2	COX1 intron 2 protein	-147
CYR1	adenylate cyclase	-145
	beta-transducin family (WD-40 repeat) protein	-145
COX1	cytochrome-c oxidase subunit I	-145
ATP4	F1F0-ATPase complex, F0 subunit B	-145
MIS1	C1-tetrahydrofolate synthase precursor, mitochondrial	-143
SPT20	member of the TBP class of SPT proteins that alter transcription site selection	-142
SRV2	adenylate cyclase-associated protein, 70kDa	-141
GAR1	nucleolar rRNA processing protein	-140
SNQ2	multidrug resistance protein	-140
SKN7	transcription factor with similarity to HSF1P	-136
RPS3	ribosomal protein S3.e	-131
IXR1	intrastrand crosslink recognition protein and transcription factor	-130
ALK1	DNA damage-responsive protein	-127
SWI5	transcription factor	-127
ATP5	F1F0-ATPase complex, OSCP subunit	-126
SPE1	ornithine decarboxylase	-125
SUB1	transcriptional coactivator	-124
MHP1	microtubule-associated protein	-124
PEX14	peroxisomal protein involved in protein import - peroxin	-121
MCD4	sporulation protein	-121

PRB1	protease B, vacuolar	-120
PEX3	peroxisomal assembly protein - peroxin	-119
ALG1	beta-mannosyltransferase	-118
EFB1	translation elongation factor eEF1beta	-116
NUP2	nuclear pore protein	-112
RUD3	suppressor of USO1-1 transport defect	-111
TRP5	tryptophan synthase	-110
RPS25B	ribosomal protein S25.e.c12	-109
ARP10	similarity to Actin proteins	-108
SPP381	Suppressor of Pre-mRNA Processing mutant	-107
EAP1	translation initiation factor 4E-associated protein	-106
RPL1A	ribosomal protein	-106
PDB1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta chain precursor	-103
ERG5	C-22 sterol desaturase	-102
ENB1	a gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin	-102
HRT2	high level expression reduced Ty3 transposition	-101
RPL5	60S large subunit ribosomal protein L5.e	-101
TIP20	required for ER to Golgi transport	-101
YKU80	component of DNA end-joining repair pathway	100
DBP8	DEAD-box protein 8	100
SES1	seryl-tRNA synthetase, cytosolic	102
AQY2	member of mip family transmembrane channels	105
APE4	vacuolar aminopeptidase Y	106
CHS6	chitin biosynthesis protein	109
HYR1	glutathione peroxidase	109
QCR6	ubiquinol--cytochrome-c reductase 17K protein	110
CYB5	cytochrome b5	111
AFG3	protease of the SEC18/CDC48/PAS1 family of ATPases (AAA)	111
SEC23	component of COPII coat of ER-Golgi vesicles	112
FAS1	fatty-acyl-CoA synthase, beta chain	113
RAD7	nucleotide excision repair protein	114
TCM10	protein of unknown function	115
RPL18A	60S large subunit ribosomal protein S18.e	119
THI7	thiamin transport protein	119
ANP2	required for protein glycosylation in the golgi	119
SXM1	putative beta-karyopherin	120
RPN4	26S proteasome subunit	121
CYC8	general repressor of transcription	122
CTL1	RNA 5'-triphosphatase with manganese- or cobalt-dependent NTPase activities	122
SSF1	mating protein	123
RPL20B	60S large subunit ribosomal protein	123
YCF1	glutathione S-conjugate transporter, vacuolar	124
URA3	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	125
RPL11B	ribosomal protein	126
TUF1	translation elongation factor TU, mitochondrial	127
AUA1	involved in ammonia regulation of amino acid transport	127
DUR3	urea transport protein	128
PET122	translational activator of cytochrome c oxidase subunit III	130
QCR2	ubiquinol--cytochrome-c reductase 40KD chain II	133
RIF1	RAP1-interacting factor 1	133
LEU2	beta-isopropyl-malate dehydrogenase	133
PDC1	pyruvate decarboxylase, isozyme 1	136
UBR1	ubiquitin-protein ligase	138
TFA2	TFIIE subunit (transcription initiation factor), 43 KD	138
GDH1	glutamate dehydrogenase (NADP+)	140
RPP1B	60S large subunit acidic ribosomal protein L44prime	141

MTR5	involved in nucleocytoplasmic transport of mRNA	144
ARG4	arginosuccinate lyase	145
RPL27A	60S large subunit ribosomal protein L27.e	147
ARV1	weak similarity to C.elegans R05H5.5 protein and NUP120P	150
GLC3	1,4-glucan branching enzyme (glycogen branching enzyme)	150
ITR1	myo-inositol permease, major	154
TRP2	anthranilate synthase component I	155
RPL23B	ribosomal protein L23.e	159
RPL6B	60S large subunit ribosomal protein	159
KRS1	lysyl-tRNA synthetase, cytosolic	162
TFA1	TFIIE subunit (transcription initiation factor), 66 kD	163
TOM7	mitochondrial outer membrane import receptor subunit, 6 kD	167
SFC1	succinate-fumarate transporter	168
TYS1	tyrosyl-tRNA synthetase	168
MET6	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	172
RPS28A	40S small subunit ribosomal protein S28.e.c15	173
CTT1	catalase T, cytosolic	176
QCR8	ubiquinol--cytochrome-c reductase chain VIII	177
NUP82	nuclear pore protein	177
ECM29	involved in cell wall biogenesis and architecture	180
BAG7	structural homolog of SAC7P	185
TC11	protein phosphatase Two C-Interacting protein	186
RPL14A	ribosomal protein	187
HSP60	heat shock protein - chaperone, mitochondrial membrane-associated protein involved in regulation of fructose-1,6-bisphosphatase	198
VID27	import into Vid vesicles	200
RGD1	putative GTPase activating protein	200
SAM1	S-adenosylmethionine synthetase 1	222
DOT6	involved in derepression of telomeric silencing	225
HXT3	low-affinity hexose transporter	231
APM2	involved in clathrin-independent transport processes	235
NHP6B	nonhistone chromosomal protein	241
RAD23	nucleotide excision repair protein (ubiquitin-like protein)	242
LOS1	pre-tRNA splicing protein	264
SPS4	sporulation-specific protein	265
VTC4	polyphosphate synthetase (putative)	268
PEX15	required for peroxisome assembly - peroxin	268
RPL15A	60s large subunit ribosomal protein L15.e.c12	270
GRS1	glycine--tRNA ligase	272
UBA1	E1-like (ubiquitin-activating) enzyme	277
SRN2	suppressor of RNA1-1 mutation	279
UBI5	ubiquitin	291
IPP1	inorganic pyrophosphatase, cytoplasmic	294
RPL12B	60S large subunit ribosomal protein L12.e	294
SIP18	osmotic stress protein	294
RPL30	60S large subunit ribosomal protein L30.e	295
TAF90	TFIID and SAGA subunit	331
RPS4A	ribosomal protein S4.e.c10	361
GIM5	Gim complex component	365
ATP15	F1F0-ATPase complex, F1 epsilon subunit	375
CDC20	pyruvate kinase	401
ARG5.6	acetylglutamate kinase and acetylglutamyl-phosphate reductase	404
ADH2	alcohol dehydrogenase III	454
CIT2	citrate (si)-synthase, peroxisomal	467
APS3	AP-3 complex subunit, sigma3 subunit, 22 KD	478
DYN2	dynein light chain 1, cytosolic	479

GND2	phosphogluconate dehydrogenase	491
ARA1	D-arabinose dehydrogenase, large subunit	491
HTA1	histone H2A	492
BFR2	involved in protein transport steps at the Brefeldin A blocks	517
NPI46	proline cis-trans isomerase	552
RPS27B	ribosomal protein S27.e	563
IPT1	mannosyl diphosphorylinositol ceramide synthase	582
TFP4	H ⁺ -ATPase V0 domain 17 KD subunit, vacuolar	593
ACB1	acyl-coenzyme-A-binding protein (diazepam binding inhibitor)	600
RPL40B	ubiquitin	639
BMH1	14-3-3 protein involved in rapamycin-sensitive signalling	652
COX13	cytochrome-c oxidase chain VIa	664
RPL37A	ribosomal protein L37.e	696
CUP1-1	metallothionein	707
OLE1	stearoyl-CoA desaturase	830
ILV1	anabolic serine and threonine dehydratase precursor	857
CWP2	cell wall mannoprotein	857
RPL1B	60S large subunit ribosomal protein	900
NHP10	Non-histone protein	1029
RPS10B	ribosomal protein	1033
GUT2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	1055
CPA2	arginine-specific carbamoylphosphate synthase, large chain	1062
DDR2	heat shock protein DDRA2	1368
MTR4	involved in nucleocytoplasmic transport of mRNA	1427
ADH2	alcohol dehydrogenase II	1700
HSP104	heat shock protein	2208
TDH3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	3285
MSH6	DNA mismatch repair protein	4426

10.11. Koeffizienten für den Savitzky-Golay-Filter

Punkte	25	23	21	19	17	15	13	11	9	7	5
-12	-253										
-11	-138	-42									
-10	-33	-21	-171								
-9	62	-2	-76	-136							
-8	147	15	9	-51	-21						
-7	222	30	84	24	-6	-78					
-6	287	43	149	89	7	-13	-11				
-5	322	54	204	144	18	42	0	-36			
-4	387	63	249	189	27	87	9	9	-21		
-3	422	70	284	224	34	122	16	44	14	-2	
-2	447	75	309	249	39	147	21	69	39	3	-3
-1	462	78	324	264	42	162	24	84	54	6	12
0	467	79	329	269	43	167	25	89	59	7	17
1	462	78	324	264	42	162	24	84	54	6	12
2	447	75	309	249	39	147	21	69	39	3	-3
3	422	70	284	224	34	122	16	44	14	-2	
4	387	63	249	189	27	87	9	9	-21		
5	322	54	204	144	18	42	0	-36			
6	287	43	149	89	7	-13	-11				
7	222	30	84	24	-6	-78					
8	147	15	9	-51	-21						
9	62	-2	-76	-136							
10	-33	-21	-171								
11	-138	-42									
12	-253										
Σ	5175	8059	3059	2261	323	1105	143	429	231	21	35

Lebenslauf

Name: Kirsten Hantelmann
Geburtstag: 20. Oktober 1975
Geburtsort: Peine

Schulbildung

Aug. 1982 - Juni 1986 Grundschule Groß Bülten / Ilsede
Aug. 1986 - Juni 1988 Orientierungsstufe Groß Ilsede
Aug. 1988 - Juni 1995 Gymnasium Groß Ilsede
Juni 1995 Abitur

Studium

Okt. 1995 – Nov. 1997 Grundstudium Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
Nov. 1997 Vordiplom Chemie
Dez. 1997 – Mai 2000 Hauptstudium Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
Mai 2000 mündliche Diplomprüfung
Mai 2000 – Nov 2000 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover mit dem Thema „Online-Analytik in Kühlschmierstoffen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper
Seit Jan. 2001 Doktorand am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Hannover, den 5.05.2005