

**Charakterisierung des Zellmetabolismus bei
Fermentationen und biomedizinischen
Anwendungen mit Hilfe eines miniaturisierten
faseroptischen Fluoreszenzmessaufbaus**

**vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Kerris Isolde Klug**

**von der Fakultät III – Prozesswissenschaften der Technischen
Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften**

**Dr.-Ing.
genehmigte Dissertation**

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Peter Neubauer (TU Berlin)

Berichter: Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner (TU Berlin)

Berichter: Prof. Dr. Thomas Beuermann (HS Mannheim)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 11. Juni 2009

Berlin 2009

D 83

Inhaltsübersicht

| | |
|---|------|
| DANKSAGUNG | II |
| VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION..... | IV |
| INHALTSVERZEICHNIS | V |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | VIII |
| TABELLENVERZEICHNIS | XIII |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | XIV |
| 1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG | 1 |
| 2 STAND DES WISSENS | 2 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN..... | 23 |
| 4 ERGEBNISSE..... | 47 |
| 5 DISKUSSION | 136 |
| 6 ZUSAMMENFASSUNG | 146 |
| 7 QUELLENVERZEICHNIS | 148 |
| 8 ANHANG..... | 155 |

Danksagung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen eines INNO-WATT-Projektes (Nr. IW061204 „Entwicklung eines Fluoreszenzensors zur Erfassung von Hefe-Vitalparametern“) sowie eines von der Karl-Völker-Stiftung an der Hochschule Mannheim geförderten Forschungsprojektes (Nr. 017090601 „Markierungsfreie Bioanalytik mittels UV/VIS-Spektroskopie und faseroptische Fluoreszenzmessung mit Mehrkomponentenanalyse“) erzielt. Allen, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben, sei an dieser Stelle gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner und Herrn Prof. Dr. Thomas Beuermann für das mir entgegengebrachte Vertrauen, ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und vor allem für die hervorragende Betreuung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Projektpartners fermtec GmbH, insbesondere bei Herrn Dr.-Ing. Jürgen Schöber und Herrn Dr. Axel Fleischer für die experimentelle Unterstützung und vielfältige Diskussionen.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme der Hochschule Mannheim. Hervorheben möchte ich den Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Matthias Rädle, ihm danke ich für seine wertvollen Anregungen und fachlichen Diskussionen. Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Kollegen Rüdiger Jung, Timo Scheu, Tobias Klink, Natascha Heß-Mohr, Daniel Geörg und Dominik Egly für die gute Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern der Versuchsanstalt der Hefeindustrie, besonders Herrn Dr.-Ing. Michael Quantz und Herrn Claus Decker, für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Fed-Batch-Versuche sowie den Untersuchungen zur Lagerstabilität.

Herrn Prof. Dr. Dirk Schadendorf, Herrn Dr. Jochen Utikal, Frau Dr. Nina Booken, Herrn Prof. Dr. Norbert Gretz, Herrn Dr. Marcus Czabanka, Frau Dr. Bettina Kränzlin und Herrn Tobias Bläske vom Universitätsklinikum Mannheim danke ich für die großzügige Unterstützung bei den Untersuchungen zur Aktinischen Keratose und Glioblastome.

Ebenfalls bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie sowie des Instituts für Instrumentelle Analytik der Hochschule Mannheim für ihre wertvollen Ratschläge und großzügige Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich Michael Reuter, Christiane Koch, Prof. Winfried Storhas, Dr. Caro von Reitzenstein, Dominik Albert, Ralf Müller und Prof. Dr. Carsten Hopf.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der Eichbaum Brauerei Mannheim, vor allem Herrn Carsten Lange und Herrn Martin Ahollinger für ihre unbürokratische Unterstützung.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Projektkollegen der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin René Eiswirth und Claudia Weigert für die gute und verlässliche Zusammenarbeit sowie stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren uneingeschränkte Unterstützung diese Dissertation, insbesondere in der Endphase, nicht möglich gewesen wäre.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Tagungsbeiträgen vorab veröffentlicht:

Klug, K. I., Weigert, C., Methner, F.-J., Schöber, J., Fleischer, A., & Beuermann, T. (2007). Miniaturisierter faseroptischer Fluoreszenzmessaufbau zur Prozessverfolgung von Fermentationen. 8. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, 10.-12. Dezember 2007

Klug, K. I., Weigert, C., Methner, F.-J., Schöber, J., Fleischer, A., Quantz, M., & Beuermann, T. (2008). Fluoreszenzsensor zur Aktivitätsbestimmung in Fermentationen. 21. VH-Hefetagung, Wien, 21.-22. April 2008

Beuermann, T., Geörg, D., & Klug, K. I. (2008). Faseroptische Online-Messmethoden zur Prozesskontrolle von Hefe-Fermentationen. 95. Oktobertagung der VLB, Berlin, 13.-14. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG | 1 |
| 2 | STAND DES WISSENS | 2 |
| 2.1 | MESSSYSTEME ZUR ONLINE BIOPROZESSÜBERWACHUNG | 2 |
| 2.2 | FLUORESZENZ..... | 3 |
| 2.2.1 | <i>Grundlagen.....</i> | 3 |
| 2.2.2 | <i>Messung endogener Fluorophore.....</i> | 6 |
| 2.3 | KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN | 10 |
| 2.3.1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 10 |
| 2.3.2 | <i>Escherichia coli.....</i> | 19 |
| 2.4 | BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN | 20 |
| 2.4.1 | <i>Fluoreszenzdiagnostik bei Aktinischer Keratose.....</i> | 21 |
| 2.4.2 | <i>Photodynamische Therapie</i> | 22 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN..... | 23 |
| 3.1 | FLUORESZENZMESSUNG..... | 23 |
| 3.1.1 | <i>Fluoreszenzmessaufbau mit CCD-Spektrometer.....</i> | 23 |
| 3.1.2 | <i>Mehrkanal-Fluoreszenzsensor.....</i> | 24 |
| 3.1.3 | <i>Absorptionsspektren und Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore</i> | 27 |
| 3.2 | BIOREAKTOR..... | 28 |
| 3.3 | FERMENTATIONSANALYTIK | 29 |
| 3.3.1 | <i>Abgasanalytik</i> | 29 |
| 3.3.1.1 | <i>CO₂-Messung</i> | 29 |
| 3.3.1.2 | <i>Sauerstoff-Messung</i> | 30 |
| 3.3.1.3 | <i>Ethanol-Messung</i> | 30 |
| 3.3.2 | <i>Zelldichtebestimmung.....</i> | 31 |
| 3.3.2.1 | <i>Streulicht</i> | 31 |
| 3.3.2.2 | <i>Neubauer-Zählkammer.....</i> | 32 |
| 3.3.3 | <i>Bestimmung der Substrat- und Produktverläufe</i> | 32 |
| 3.3.4 | <i>Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung der Fluorophore bei Kultivierungen.....</i> | 35 |
| 3.4 | KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN | 36 |
| 3.4.1 | <i>Versuchsbedingungen</i> | 36 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.4.1.1 | Batch-Kultivierung von Backhefe | 37 |
| 3.4.1.2 | Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe..... | 37 |
| 3.4.1.3 | Batch-Kultivierung von Bier- bzw. Brennereihefe | 38 |
| 3.4.1.4 | Batch-Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> | 40 |
| 3.5 | UNTERSUCHUNGEN AN BIERWÜRZE | 41 |
| 3.6 | VERSUCHE ZUR LAGERSTABILITÄT VON BACKHEFE..... | 42 |
| 3.7 | VERWENDETE CHEMIKALIEN..... | 43 |
| 3.8 | PATIENTEN MIT AKTINISCHER KERATOSE | 44 |
| 3.9 | MÄUSE MIT IMPLANTIERTEN GLOBLASTOMZELLEN..... | 45 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 47 |
| 4.1 | FLUORESZENZMESSAUFBAU MIT CCD-SPEKTROMETER | 47 |
| 4.1.1 | <i>Absorptionsspektren und Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore</i> | <i>47</i> |
| 4.1.1.1 | Messungen in Phosphatpuffer pH 7,0..... | 48 |
| 4.1.1.2 | Messungen in Phosphatpuffer pH 5,0..... | 51 |
| 4.1.1.3 | Messungen in Ethanol | 53 |
| 4.1.1.4 | Messungen in DMSO | 55 |
| 4.1.1.5 | Fluoreszenzemissionsspektren in verschiedenen Matrizes..... | 58 |
| 4.2 | MESSUNGEN IN BIERWÜRZE | 66 |
| 4.3 | CHARAKTERISIERUNG DES STOFFWECHSELS BEI MIKROORGANISMEN | 72 |
| 4.3.1 | <i>Ermittlung der Fluorophorverläufe durch Multikomponentenanalyse</i> | <i>72</i> |
| 4.3.2 | <i>Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</i> | <i>74</i> |
| 4.3.2.1 | Backhefe | 74 |
| 4.3.2.1.1 | <i>Aerobe Gärung.....</i> | <i>74</i> |
| 4.3.2.1.2 | <i>Atmung.....</i> | <i>78</i> |
| 4.3.2.2 | Bierhefe..... | 82 |
| 4.3.2.2.1 | <i>Aerobe Gärung (Propagation)</i> | <i>82</i> |
| 4.3.2.2.2 | <i>Gärung.....</i> | <i>85</i> |
| 4.3.2.3 | Fluoreszenzmuster bei Änderung der Umgebungsbedingungen..... | 87 |
| 4.3.2.3.1 | <i>Temperatur</i> | <i>88</i> |
| 4.3.2.3.2 | <i>pH-Wert.....</i> | <i>97</i> |
| 4.3.2.3.3 | <i>Sauerstoffversorgung.....</i> | <i>103</i> |
| 4.3.2.3.4 | <i>Substratangebot.....</i> | <i>106</i> |
| 4.3.2.4 | Stammspezifische Unterschiede..... | 108 |
| 4.3.3 | <i>Lagerstabilität von Backhefe.....</i> | <i>109</i> |
| 4.3.4 | <i>Kultivierung von <i>Escherichia coli</i></i> | <i>116</i> |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.4 | BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN | 120 |
| 4.4.1 | <i>Fluoreszenzdiagnostik bei Aktinischer Keratose.....</i> | 120 |
| 4.4.1.1 | Anreicherung des PPIX in neoplastischem Gewebe..... | 121 |
| 4.4.1.2 | Ausbleichen der PPIX-Fluoreszenz während der PDT..... | 127 |
| 4.4.2 | <i>Fluoreszenzdiagnostik beim Glioblastom im Mausmodell</i> | 129 |
| 4.5 | VERGLEICH DER FLUORESZENZMESSAUFBAUTEN..... | 131 |
| 5 | DISKUSSION | 136 |
| 5.1 | CHARAKTERISIERUNG DES ZELLMETABOLISMUS BEI MIKROORGANISMEN | 139 |
| 5.2 | BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN | 144 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 146 |
| 7 | QUELLENVERZEICHNIS | 148 |
| 8 | ANHANG..... | 155 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 2.1: Jablonski-Diagramm (Otto, 2000)..... | 4 |
| Abb. 2.2: Stokes Shift (Schmidt, 2005) | 5 |
| Abb. 2.3: Querschnitt einer Hefezelle (Rehm, 1980)..... | 11 |
| Abb. 2.4: Stoffbilanzen von Atmung und Gärung (verändert nach (Fritsche, 2002)) | 13 |
| Abb. 2.5: Porphyrinstoffwechsel von <i>S. cerevisiae</i> (verändert nach www.genome.jp und pathway.yeastgenome.org)..... | 15 |
| Abb. 2.6: Fluoreszenzanregungsspektren endogener Fluorophore (Wagnieres <i>et al.</i> , 1998)..... | 21 |
| Abb. 2.7: Fluoreszenzemissionsspektren endogener Fluorophore (Wagnieres <i>et al.</i> , 1998)..... | 21 |
| Abb. 3.1: Fluoreszenzmessaufbau mit CCD-Spektrometer..... | 23 |
| Abb. 3.2: Mehrkanal-Fluoreszenzsensor mit Fremdlichtunterdrückung..... | 25 |
| Abb. 3.3: Fluoreszenzmesssystem mit Fremdlichtunterdrückung | 26 |
| Abb. 3.4: Vergleich zwischen Fluoreszenzemissionsspektren und den zur Fluoreszenzdetektion verwendeten optischen Filtern..... | 27 |
| Abb. 3.5: Messtechnik am Bioreaktor | 29 |
| Abb. 3.6: Korrelation von IR-Bandenfläche (Ethanol im Abgas) und Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe, ermittelt durch HPLC..... | 30 |
| Abb. 3.7: Streulichtmessaufbau..... | 31 |
| Abb. 3.8: Korrelation von Streulichtintensität und Zelldichte | 32 |
| Abb. 3.9: Chromatogramm der Backhefe..... | 33 |
| Abb. 3.10: Chromatogramm der Bierhefe | 34 |
| Abb. 3.11: Chromatogramm von <i>E. coli</i> | 34 |
| Abb. 3.12: Relative Fluoreszenz-Messempfindlichkeit bei 469 nm in Abhängigkeit von der Biotrockenmasse | 36 |
| Abb. 3.13: Nacktmaus mit Rückenhautkammer, in die SF126 Tumorzellen implantiert sind | 45 |
| Abb. 3.14: Aufbau der Fluoreszenzmessung bei einer Nacktmaus..... | 46 |
| Abb. 4.1: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0 | 48 |
| Abb. 4.2: Pyridoxinfluoreszenzemissionsspektrum, bei 366 nm angeregt (Matrix VE-Wasser) | 49 |
| Abb. 4.3: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0 (Pyridoxin mit UV-LED bei 340 nm angeregt) | 49 |
| Abb. 4.4: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0 | 50 |
| Abb. 4.5: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0 | 51 |
| Abb. 4.6: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0 (Pyridoxin mit UV-LED bei 340 nm angeregt) | 52 |
| Abb. 4.7: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0 | 53 |
| Abb. 4.8: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in Ethanol | 54 |

| | |
|--|----|
| Abb. 4.9: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in Ethanol | 54 |
| Abb. 4.10: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in Ethanol | 55 |
| Abb. 4.11: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in DMSO..... | 56 |
| Abb. 4.12: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in DMSO..... | 57 |
| Abb. 4.13: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in DMSO..... | 57 |
| Abb. 4.14: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Coproporphyrin I in unterschiedlichen Matrices | 58 |
| Abb. 4.15: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Coproporphyrin III in unterschiedlichen Matrices | 59 |
| Abb. 4.16: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Protoporphyrin IX in unterschiedlichen Matrices | 60 |
| Abb. 4.17: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Uroporphyrin I in unterschiedlichen Matrices..... | 61 |
| Abb. 4.18: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Uroporphyrin III in unterschiedlichen Matrices | 62 |
| Abb. 4.19: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Zn-Protoporphyrin in unterschiedlichen Matrices | 63 |
| Abb. 4.20: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von NADH in unterschiedlichen Matrices..... | 64 |
| Abb. 4.21: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von FAD in unterschiedlichen Matrices | 65 |
| Abb. 4.22: Fluoreszenzemissionsspektrum einer Pilswürze..... | 66 |
| Abb. 4.23: Fluoreszenzemissionsspektren von Peptonen und BSA..... | 67 |
| Abb. 4.24: Fluoreszenzemissionsspektren von Würze, die mit Kieselgel, Proteinase K oder PVPP versetzt wurde..... | 68 |
| Abb. 4.25: Fluoreszenzemissionsspektren von Ferulasäure in unterschiedlichen Matrices .. | 69 |
| Abb. 4.26: Fluoreszenzemissionsspektren von Hopfenprodukten..... | 69 |
| Abb. 4.27: Vergleich der normierten Fluoreszenzemissionsspektren von gehopfter und ungehopfter Pilswürze | 70 |
| Abb. 4.28: Vergleich der Fluoreszenzemissionen von Würze und dem aus Mineralmedium, Lysin und Glucose nach 90 min Kochen hergestellten Maillardprodukt..... | 71 |
| Abb. 4.29: Fluoreszenzemissionsspektrum von geschroteter Sommergerste (Sorte Tipple).72 | |
| Abb. 4.30: Anwendung der Multikomponentenanalyse am Beispiel einer Backhefekultivierung (Spektrum nach 16 h Fermentationsdauer aufgenommen) | 73 |
| Abb. 4.31: Substrat- und Produktkonzentrationen während der aeroben Gärung, mittels HPLC bestimmt | 74 |
| Abb. 4.32: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Biofluorophore, Gelöstsauerstoffanteil und Substrate während der aeroben Gärung..... | 76 |
| Abb. 4.33: Fluorophorverläufe während der aeroben Gärung von Backhefe..... | 77 |
| Abb. 4.34: Vergleich zwischen online Streulichtmessung und offline Zellzählung (Neubauer- Zählkammer) | 78 |
| Abb. 4.35: Fluorophorverläufe während der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe | 79 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 4.36: Verläufe des Gelöstsauerstoffanteils, der Streulichtintensität, der aufintegrierten Antischaummittelzugabe, der Substratzulaufzeit sowie der Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe während der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe..... | 80 |
| Abb. 4.37: Vergleich zwischen Streulicht- und NAD(P)H-Fluoreszenzverlauf | 81 |
| Abb. 4.38: Vergleich zwischen online Streulichtmessung und offline Zellzählung (Neubauer-Zählkammer) | 81 |
| Abb. 4.39: Fluorophorverläufe der Bierhefe-Propagation..... | 83 |
| Abb. 4.40: Substrat- und Produktverläufe während der aeroben Gärung von Bierhefe..... | 84 |
| Abb. 4.41 Vergleich zwischen Streulichtmessung und Zellzählung während der Bierhefe-Propagation | 85 |
| Abb. 4.42: Fluorophorverläufe bei der Bierhefe-Gärung | 86 |
| Abb. 4.43: Substrat- und Produktverläufe bei der Bierhefe-Gärung | 87 |
| Abb. 4.44: Fluorophorverläufe während einer Standard Ethanol Red Kultivierung, bei der nach ca. 32 h eine Temperaturerhöhung von 22°C auf 32°C stattfand | 88 |
| Abb. 4.45: Vergleich von Zelldichte und Streulichtintensität während einer Standard Ethanol Red Kultivierung, bei der nach ca. 32 h eine Temperaturerhöhung von 22°C auf 32°C stattfand..... | 89 |
| Abb. 4.46: Fluorophorverläufe während einer Standard W-34/70 Kultivierung, bei der nach ca. 7 h die Temperatur von 25°C auf 35°C erhöht wurde..... | 90 |
| Abb. 4.47: Vergleich zwischen Zelldichte und Streulichtintensität während einer Standard W-34/70 Kultivierung, bei der nach ca. 7 h die Temperatur von 25°C auf 35°C erhöht wurde..... | 91 |
| Abb. 4.48: Zeitliche Verläufe des Gelöstsauerstoffanteils, der Temperatur, des pH-Werts, der Streulichtintensität und der Ethanolkonzentration im Abgas während der Kultivierung von W-34/70 | 92 |
| Abb. 4.49: Vergleich zwischen einer Standard-Kultivierung und einer Kultivierung, bei der zweimal eine Temperaturerhöhung von 32°C auf 37°C ausgelöst wurde (DHW Vital-Gold)..... | 93 |
| Abb. 4.50: Vergleich zwischen einer Standard-Kultivierung und einer Kultivierung, bei der dreimal eine Temperaturerhöhung ausgelöst wurde (Wieninger Frischhefe) | 94 |
| Abb. 4.51: Fluorophorverläufe der Gärung von Bierhefe (Rh), bei der nach ca. 51 h eine Temperaturerhöhung auftrat | 95 |
| Abb. 4.52: Fluorophorverläufe der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe, bei der im Zeitraum von ca. 8,5 bis 11,5 h ein pH-Sturz verursacht wurde | 97 |
| Abb. 4.53: Vergleich zwischen Streulicht- und NAD(P)H-Fluoreszenzverlauf, deren Schwankungen durch Gabe von Antischaummittel verursacht sind | 98 |
| Abb. 4.54: Sauerstoffkonzentration im Abgas und Substratzulauf während der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe, bei der ein pH-Sturz nach 8,5 h ausgelöst wurde..... | 98 |
| Abb. 4.55: Fluorophorverläufe sowie pH-Wert-Verlauf der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe, bei der ein pH-Wert Sturz von 5,9 auf 2,2 ausgelöst wurde..... | 99 |
| Abb. 4.56: Fluorophorverläufe einer aeroben Gärung von Backhefe, bei der mehrmals der pH-Wert geändert wurde..... | 100 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 4.57: Verläufe von Gelöstsauerstoff, pH-Wert und Streulichtintensität während der aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold)..... | 101 |
| Abb. 4.58: Verläufe von Sauerstoff- und CO ₂ -Konzentration im Abgas sowie Ethanolkonzentration während der aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold) | 102 |
| Abb. 4.59: Fluorophorverläufe der Batch-Kultivierung von Backhefe (DHW Vital-Gold), bei der im Zeitraum von ca. 6 - 9 h eine anoxische Umgebung vorlag..... | 103 |
| Abb. 4.60: Fluoreszenzverläufe der Porphyrine im Zeitraum 8,3 – 11,8 h; Spektren aus Multi-komponentenanalyse nach Subtraktion der NAD(P)H- und Flavinanteile..... | 104 |
| Abb. 4.61: Verläufe von Sauerstoff- und CO ₂ -Konzentration im Abgas sowie Ethanolkonzentration während der Batch-Kultivierung von Backhefe (DHW Vital-Gold) | 105 |
| Abb. 4.62: Fluorophorverläufe während einer aeroben Gärung von Backhefe, bei der nach 5,5 h erneut Saccharose zugegeben wurde..... | 106 |
| Abb. 4.63: Verläufe des Gelöstsauerstoffanteils, der CO ₂ - und der Ethanolkonzentration während der aeroben Gärung von Backhefe, bei der nach 5,5 h erneut Saccharose zugegeben wurde | 107 |
| Abb. 4.64: CO ₂ - (grün) und Ethanolkonzentrationsverläufe (lila) bei Batch-Kultivierungen von Wieninger-, DHW- und Uniform-Backhefe | 108 |
| Abb. 4.65: Fluorophorverläufe bei Batch-Kultivierungen von Wieninger-, DHW- und Uniform-Backhefe | 109 |
| Abb. 4.66: Fluoreszenzemissionsspektren der Wieninger Backhefe zu Beginn und nach sechs-stündiger Inkubation bei 50°C | 110 |
| Abb. 4.67: Fluorophorverläufe der Backhefewürfel während der Lagerung bei 50°C | 111 |
| Abb. 4.68: Plastizitätsverläufe der bei 50°C gelagerten Backhefewürfel | 112 |
| Abb. 4.69: Fluorophorverläufe der Backhefewürfel während der Lagerung bei 35°C | 113 |
| Abb. 4.70: Plastizitätsverläufe der bei 35°C gelagerten Backhefewürfel | 114 |
| Abb. 4.71: Fluorophorverläufe der Backhefewürfel während der Lagerung bei 4°C | 115 |
| Abb. 4.72: Plastizitätsverläufe der bei 4°C gelagerten Backhefewürfel..... | 115 |
| Abb. 4.73: Substrat- und Produktverläufe der aeroben Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> | 117 |
| Abb. 4.74: Fluorophorverläufe der aeroben Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> | 117 |
| Abb. 4.75: Verläufe der NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrinfluoreszenzintensität sowie des Gelöstsauerstoffanteils während der aeroben Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> | 119 |
| Abb. 4.76: Vergleich zwischen Streulichtmessung und Biotrockenmasse der <i>E. coli</i> Kultivierung..... | 119 |
| Abb. 4.77: Fluoreszenzspektroskopischer Vergleich zwischen intaktem (Hinterkopf) und keratösen Gewebe (Schläfe) nach Applikation von Metvix® | 120 |
| Abb. 4.78: Aufbaukinetik des PPIX nach Auftragen von Metvix® (Schläfe links unten, Patient 1) | 121 |
| Abb. 4.79: Aufbaukinetik des gebildeten PPIX in verschiedenen Hautstellen (Patient 1) | 122 |
| Abb. 4.80: Aufbaukinetik des PPIX nach Auftragen von Metvix® (Handgelenk links, Patient 2) | 123 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 4.81: Aufbaukinetik des gebildeten PPIX in verschiedenen Stellen der linken Hand (Patient 2)..... | 124 |
| Abb. 4.82: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand vor Bestrahlung mit Aktilite®-Lampe (Weißlicht-Aufnahme) | 125 |
| Abb. 4.83: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand vor Bestrahlung mit Aktilite®-Lampe (Woodlicht-Aufnahme) | 125 |
| Abb. 4.84: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand direkt nach Bestrahlung mit Aktilite®-Lampe (Woodlicht-Aufnahme) | 126 |
| Abb. 4.85: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand eine Woche nach Bestrahlung mit Aktilite®-Lampe (Weißlicht-Aufnahme) | 126 |
| Abb. 4.86: Abbaukinetik des PPIX an der mittels Aktilite®-Lampe bestrahlten Hautstelle (linke Hand) | 127 |
| Abb. 4.87: Fluoreszenzspektrum während der PDT, bei der das Abbauprodukt Photoproporphyrin entsteht; aufgenommen nach 100 s Bestrahlungsdauer | 128 |
| Abb. 4.88: Auf- und Abbaukinetik des gebildeten PPIX nach butyl-ALA Gabe bei Nacktmäusen..... | 130 |
| Abb. 4.89: Querempfindlichkeiten des Mehrkanalsensors (Matrix Phosphatpuffer pH 7,0) . | 131 |
| Abb. 4.90: Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für NADH | 132 |
| Abb. 4.91: Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für FAD | 133 |
| Abb. 4.92: Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für PPIX | 133 |
| Abb. 4.93: Vergleich zwischen CCD-Spektrometernaufbau und Mehrkanal-Fluoreszenzsensor anhand der zeitlichen Verläufe von NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrin-Fluoreszenz während der Kultivierung von Backhefe (DHW Vital-Gold)..... | 134 |
| Abb. 4.94: Vergleich zwischen CCD-Spektrometernaufbau und Mehrkanal-Fluoreszenzsensor anhand der zeitlichen Verläufe von NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrin-Fluoreszenz während der Kultivierung von Backhefe (Uniferm) | 135 |
| Abb. 8.1: Kalibrationsgerade für Acetat | 155 |
| Abb. 8.2: Kalibrationsgerade für Ethanol | 155 |
| Abb. 8.3: Kalibrationsgerade für Formiat | 156 |
| Abb. 8.4: Kalibrationsgerade für Fructose..... | 156 |
| Abb. 8.5: Kalibrationsgerade für Galactose | 157 |
| Abb. 8.6: Kalibrationsgerade für Glucose | 157 |
| Abb. 8.7: Kalibrationsgerade für Glycerin | 158 |
| Abb. 8.8: Kalibrationsgerade für Lactat..... | 158 |
| Abb. 8.9: Kalibrationsgerade für Lactose | 159 |
| Abb. 8.10: Kalibrationsgerade für Maltose | 159 |
| Abb. 8.11: Kalibrationsgerade für Saccharose..... | 160 |
| Abb. 8.12: Kalibrationsgerade für Succinat..... | 160 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2.1: Anregungs- und Emissionsmaxima einiger endogener Fluorophore (nach (Koenig & Schneckenburger, 1994; Ramanujam, 2000)) | 7 |
| Tabelle 2.2: Historische Entwicklung verschiedener Fluoreszenzmesssysteme zur Bioprozess-Überwachung (nach (Humphrey <i>et al.</i> , 1989))..... | 9 |
| Tabelle 2.3: Zusammenfassung der Abbaureaktionen bei Hefe und deren theoretische Energieausbeuten (Annemüller <i>et al.</i> , 2008)..... | 14 |
| Tabelle 3.1: Kanalbelegung des Mehrkanal-Fluoreszenzensors | 26 |
| Tabelle 3.2: Medium für Backhefe (Batch-Kultivierung) | 37 |
| Tabelle 3.3: Medium für Bier- und Brennereihefe (Batch-Kultivierung) | 39 |
| Tabelle 3.4: Mineralmedium für <i>E. coli</i> | 40 |
| Tabelle 3.5: Spurenelementlösung für <i>E. coli</i> | 40 |
| Tabelle 3.6: Vorkulturmedium für <i>E. coli</i> | 41 |
| Tabelle 3.7: Verwendete Chemikalien | 43 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| ADH | Alkoholdehydrogenase |
| ALA | 5-Aminolävulinsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CCD | Charge Coupled Device |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form) |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FMN | Flavinmononukleotid (oxidierte Form) |
| GFP | Grün-fluoreszierendes Protein |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatografie |
| IR | Infrarot |
| LED | Leuchtdiode |
| MCA | Mehrkomponentenanalyse |
| MIR | mittleres Infrarot |
| NADH | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form) |
| NADPH | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form) |
| NIR | nahes Infrarot |
| PAT | Prozessanalysetechnik |
| PBS | Phosphatgepufferte Saline |
| PDT | Photodynamische Therapie |
| PPIX | Protoporphyrin IX |
| PVPP | Polyvinylpolypyrrolidon |
| UV | Ultraviolett |
| VE-Wasser | vollentsalztes Wasser |
| VIS | sichtbarer Bereich des Lichtes |
| Zn-PP | Zink-Protoporphyrin |

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Bioprozesskontrolle ist ein wichtiges Instrument zur Qualitätssicherung von Kultivierungen. Dafür werden Messsysteme benötigt, die nicht nur die Umgebungsbedingungen, sondern auch den Zustand der Mikroorganismen erfassen (Ferreira *et al.*, 2005). Es ist wichtig, diese Informationen zeitnah zu erhalten, um rechtzeitig eingreifen zu können. Die online Bioprozesskontrolle ermöglicht es, auftretende Probleme früh zu erkennen und damit Produktivität, Produktstabilität sowie Produktqualität zu gewährleisten (Marose *et al.*, 1998). Daher besteht ein großer Bedarf an dafür geeigneten Messsystemen (Lim *et al.*, 2007; Skibsted *et al.*, 2001; Tahkoniemi *et al.*, 2006). Die online Überwachung von Größen wie pH-Wert, Temperatur, Gelöstsauerstoff oder CO₂ ist mittlerweile Routine und wird verwendet, um den physikalischen und chemischen Zustand der Zellen zu beschreiben. Im Gegensatz dazu mangelt es an Systemen, die es gestatten, biologische Parameter wie Zelldichte oder Änderungen im Stoffwechsel der Mikroorganismen online zu bestimmen (Clementschesch & Bayer, 2006; Vojinovic *et al.*, 2006). Diese sind nötig, um beispielsweise den optimalen Zeitpunkt zur Zellernte oder für die Induktion des gewünschten Produkts zu finden. Darüber hinaus gibt es regulatorische Anforderungen in Form der Prozessanalysetechnik-Initiative (PAT), die 2001 von der FDA erlassen wurde. Hauptziel der PAT ist es, das Verständnis und die Kontrolle von Bioprozessen zu verbessern (Clementschesch & Bayer, 2006; Dünnebieber & Tups, 2007). Zu den dafür geeigneten Systemen gehört die Fluoreszenzspektroskopie. Mit ihr können Biofluorophore, die im Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, nichtinvasiv und in Echtzeit analysiert werden (Skibsted *et al.*, 2001).

Ziel der Arbeit ist es, mittels Fluoreszenzspektroskopie den Stoffwechsel von Mikroorganismen während der Kultivierung zu charakterisieren. Der Fokus der Untersuchungen liegt in der Kultivierung von Back- und Bierhefe, da eine online Kontrolle der Hefevitalität z. B. während des Brauprozesses erwünscht ist. Dafür wird ein faseroptischer Messaufbau verwendet, der an der Hochschule Mannheim in Zusammenarbeit mit der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin entwickelt wurde. Der kompakte, robuste und auch kostengünstige Aufbau des Messsystems soll es ermöglichen, dass es u. a. in Brauereien und der Backhefeindustrie eingesetzt werden kann.

Zusätzlich wird die Eignung des faseroptischen Messaufbaus zur Fluoreszenzdiagnostik bei biomedizinischen Fragestellungen untersucht. Dazu werden Messungen an Patienten mit Aktinischer Keratose sowie an Mäusen, denen humane Glioblastomzellen implantiert sind, durchgeführt.

2 Stand des Wissens

2.1 Messsysteme zur online Bioprozessüberwachung

Zur online Überwachung von Bioprocessen sind verschiedene Systeme erhältlich. Zusätzlich zu den routinemäßig ermittelten Parametern wie pH-Wert, Gelöstsauerstoff und Temperatur gibt es zunehmend auch Sensoren, die Messgrößen wie Zelldichte, Substrat- oder Produktkonzentration sowie den physiologischen Status der verwendeten Mikroorganismen online erfassen können. Hierfür stehen unterschiedliche Messverfahren zur Verfügung. So kann die Biomassenkonzentration elektrisch mittels Kapazitätsmessungen bzw. optisch durch Streuung oder *in situ* Mikroskopie ermittelt werden (Harms *et al.*, 2002; Janelt *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2008). Optische Methoden, insbesondere faseroptische, werden in verstärktem Maße zur online Bioprozesskontrolle eingesetzt (Borisov & Wolfbeis, 2008; Stärk *et al.*, 2002; Wolfbeis, 2008), da viele biologische Moleküle optisch aktiv sind (Harms *et al.*, 2002). Durch die Messung von z. B. Zuckern, Aminosäuren oder Alkoholen mittels NIR-, MIR- oder Raman-Spektroskopie können - in Kombination mit multivariaten Auswertemethoden - vor allem Substrat- und Produktkonzentrationen ermittelt werden (Harms *et al.*, 2002; Jarute *et al.*, 2004; Mazarevica *et al.*, 2004; Schenk *et al.*, 2007; Sivakesava *et al.*, 2001). Eine weitere optische Methode ist die Fluoreszenzspektroskopie. Damit kann der physiologische Zustand der Zellen ermittelt werden, da einige am Metabolismus beteiligte Moleküle fluoreszieren (Marose *et al.*, 1998; Podrazký *et al.*, 2003). Auch hier greifen manche Autoren auf multivariate Methoden zurück (Boehl *et al.*, 2003; Clementschitsch *et al.*, 2005; Skibsted *et al.*, 2001). Des Weiteren wird GFP als Reportergen bei der rekombinanten Proteinherstellung verwendet, sodass mittels Fluoreszenzspektroskopie die Produktbildung verfolgt werden kann (DeLisa *et al.*, 1999; Reischer *et al.*, 2004). Im Folgenden soll auf die Fluoreszenzspektroskopie näher eingegangen werden.

2.2 Fluoreszenz

2.2.1 Grundlagen

Photolumineszenz bezeichnet die zeitverzögerte Emission von Licht nach vorangegangener Lichtabsorption (Schulman, 1985). Dabei werden je nach Zeitverzögerung der Lichtemission und Spinorientierung der Elektronen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Fluoreszenz tritt typischerweise ca. 10^{-9} bis 10^{-7} s nach der Lichtabsorption auf, während Phosphoreszenz deutlich langsamer erfolgt (ca. 10^{-3} bis 10 s) (Otto, 2000)

Die Intensität des Fluoreszenzlichtes I_{Fl} ist abhängig von der Intensität des eingestrahnten Lichtes und der Quantenausbeute. Sie ergibt sich durch

$$I_{\text{Fl}} = k \cdot I_0 \cdot A \cdot Q$$

Darin bezeichnet k einen geräteabhängigen Faktor, I_0 die Intensität des Anregungslichtes, A die Absorption des Anregungslichtes durch die Probe mit $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$ gemäß Lambert-Beer und Q die Quantenausbeute. Sie ist definiert als

$$Q = \frac{\text{Anzahl als Fluoreszenz emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}}$$

Die Energie eines absorbierten Photons hängt von dessen Frequenz bzw. Wellenlänge ab und ist gegeben durch

$$E = h \cdot \nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Hierin sind h das Planck'sche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit, ν die Frequenz und λ die Wellenlänge des absorbierten Lichtes.

Die Vorgänge der Photolumineszenz lassen sich im Jablonski-Diagramm veranschaulichen. Dieses stellt die elektronischen sowie vibronischen Energiezustände im Molekül dar (s. Abb. 2.1).

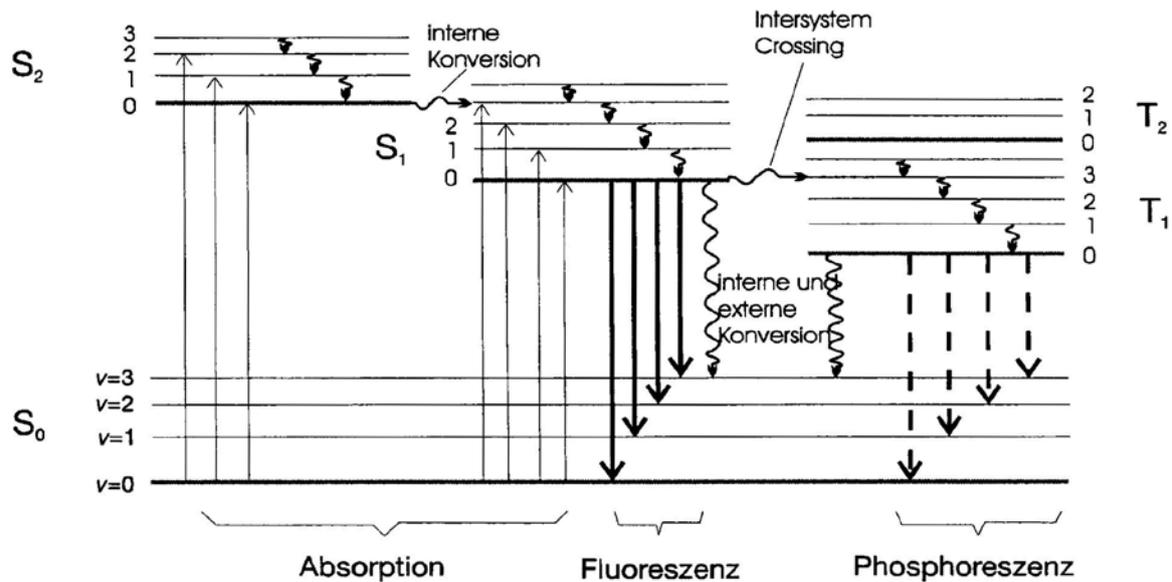


Abb. 2.1: Jablonski-Diagramm (Otto, 2000)

Im elektronischen Grundzustand befinden sich bei Raumtemperatur nahezu alle Moleküle im niedrigsten Schwingungsniveau ($v = 0$). Die Absorption von Licht im UV- oder VIS-Bereich führt zu einer Anregung von Elektronen. Dabei gelangen die Moleküle von dem Grundzustand S_0 (Singulett) in ein höheres Energieniveau (S_1, S_2, \dots) und können dort verschiedene Schwingungszustände besetzen ($v = 0, 1, 2, 3$). Von diesen ausgehend geraten die Moleküle anschließend über Schwingungsrelaxation (durch Kollision angeregter Moleküle mit Lösungsmittelmolekülen) und interne Konversion (strahlungsloser Übergang bei Änderung des Elektronenzustandes in Form von Wärme) in das energieärmste Niveau von S_1 (10^{-14} bis 10^{-12} s nach Anregung). Gemäß der Kasha-Regel sammeln sich dort die zuvor angeregten Moleküle nach strahlungsloser Desaktivierung an, um anschließend unter Aussendung von Fluoreszenz wieder in den Grundzustand S_0 zurückzukehren. Durch erneute Schwingungsrelaxation gelangen die Moleküle in den anfänglichen elektronischen Grundzustand (mit $v = 0$).

Als Konkurrenzreaktionen zur Fluoreszenz können interne Konversion und/oder Phosphoreszenz auftreten. Phosphoreszenz entsteht, indem die Moleküle zuvor unter Spinumkehr von S_1 nach T_1 (Triplet) übergehen (Intersystem Crossing) und von dort wieder in den Grundzustand S_0 gelangen. Die Wahrscheinlichkeit der Spinumkehr beträgt nur ein Millionstel der internen Konversion, bei der der Spin gleich bleibt. Daher tritt die Phosphoreszenz gegenüber der Fluoreszenz deutlich zeitverzögert auf (Schulman, 1985). Allerdings ist das Intersystem Crossing besonders dann wahrscheinlich, wenn energetisch ähnliche Schwingungszustände überlappen (Otto, 2000).

Verglichen mit dem Anregungslicht sind die Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-emissionsspektren langwellig verschoben, da die emittierte Energie geringer ist als die absorbierte. Dies wird als Stokes Shift bezeichnet. Des Weiteren sehen Absorptionsspektrum und Fluoreszenzemissionsspektrum je nach Molekülstruktur in etwa spiegelbildlich aus, wenn die jeweiligen Schwingungsniveaus in S_1 und S_0 annähernd gleiche Abstände besitzen (s. Abb. 2.2). Dies ist insbesondere bei starren, symmetrischen Molekülen der Fall (Schmidt, 2005).

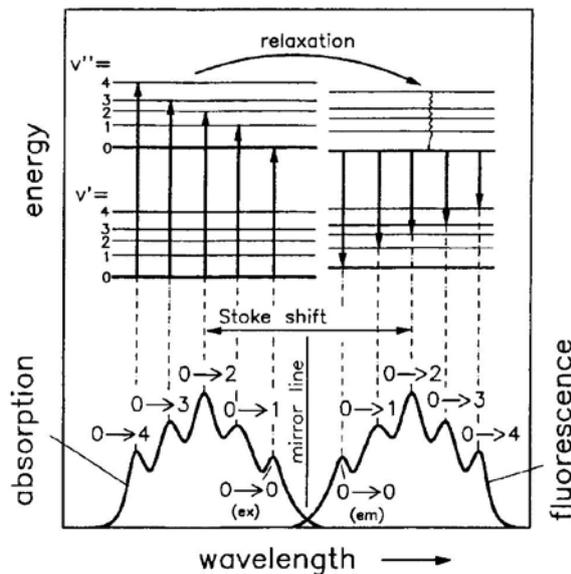


Abb. 2.2: Stokes Shift (Schmidt, 2005)

Wellenlänge und Intensität der Fluoreszenzemission hängen neben der Molekülstruktur auch von der Umgebung, insbesondere dem Lösungsmittel, ab. So beeinflussen u. a. Temperatur, Polarität und pH-Wert des Lösungsmittels die Fluoreszenzemission. Mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels nimmt z. B. die Fluoreszenzintensität bei Riboflavin ab und das Emissionsmaximum verschiebt sich langwellig. Allgemein lässt sich sagen, dass je polarer das Lösungsmittel und je höher die Polarisierbarkeit des Fluorophors ist, desto größer ist die Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums. Dies ist in den elektrostatischen Wechselwirkungen des Fluorophors mit den Lösungsmittelmolekülen begründet (Schmidt, 2005; Schulman, 1985).

Die Protonierung elektronenziehender Molekülstrukturen wie z. B. Carboxyl- und Carbonylgruppen sowie des Pyridinstickstoffes führt zu einer langwelligeren Verschiebung der Fluoreszenzemission, während ihre Dissoziation eine kurzwellige Verschiebung bewirkt. Dagegen verursacht die Protonierung elektronenspendender Molekülstrukturen wie Aminogruppen eine Verschiebung des Fluoreszenzemissionsspektrums in den kurzwelligeren Bereich (Schulman, 1985). Daher reagieren insbesondere Fluorophore, die

über saure bzw. basische Gruppen verfügen, (z. B. Aminosäuren, Pyridoxin) gegenüber pH-Wert-Änderungen mit einer deutlich veränderten Fluoreszenzemission, während die Fluoreszenzintensitäten von NADH und Riboflavin nahezu gleich bleiben (Li & Humphrey, 1992).

Durch Änderung der Temperatur werden die Energieniveaus des Grundzustandes bzw. der angeregten Zustände der Fluorophore verändert. Im Allgemeinen nimmt bei Temperaturerhöhungen die Fluoreszenzintensität ab. Dies ist z. B. bei NADH der Fall. Dennoch gibt es Fluorophore, deren Fluoreszenzintensität mit Temperaturerhöhung zunimmt, z. B. Riboflavin. Dies wird durch eine Erhöhung des Energieniveaus des angeregten Zustandes verursacht (Li & Humphrey, 1992).

2.2.2 Messung endogener Fluorophore

Einige im Zellmetabolismus vorhandene Moleküle besitzen eine Autofluoreszenz und lassen sich daher während der Zellkultivierung mittels einer *in situ* Fluoreszenzsonde beobachten (Hisiger & Jolicoeur, 2005). Als Beispiele seien Pyridinnukleotide (NADH, NADPH), Flavine (Riboflavin, FMN, FAD), Pyridoxine, Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) und Porphyrine genannt (s. Tabelle 2.1).

Die Flavine FMN und FAD sind wie die Pyridinnukleotide NAD^+ und NADP^+ als Wasserstoff- bzw. Elektronenüberträger an über hundert Redoxreaktionen beteiligt und spielen damit im Metabolismus eine zentrale Rolle (Michal, 1999). Dabei sind FMN und FAD gewöhnlich an Proteine gebunden, so genannte Flavoproteine, während NAD^+ und NADP^+ frei zwischen den Enzymen diffundieren können. Im Gegensatz zu NAD(P)^+ , das ein Hydrid-Ion - und damit zwei Elektronen - überträgt, können Flavoproteine an Ein- oder Zwei-Elektronen-Transfers teilnehmen (Lehninger *et al.*, 2005). Beispiele für Flavoproteine sind die im Citratzyklus vorkommende Succinat-Dehydrogenase mit FAD als prosthetischer Gruppe, oder die sich im Komplex I der Atmungskette befindliche NADH-Dehydrogenase, welche FMN enthält. NAD^+ liegt in der Zelle vorwiegend in der oxidierten Form vor, sodass die Hydridübertragung von einem Substrat auf NAD^+ begünstigt wird. Daher ist NAD^+ im Allgemeinen an Oxidationen beteiligt, die vorwiegend im Katabolismus auftreten. Anders verhält es sich bei NADP^+ . Hier ist überwiegend die reduzierte Form vorhanden. Dies führt dazu, dass die Hydridübertragung von NADPH auf ein Substrat begünstigt wird, was vor allem bei den Reduktionsreaktionen im Anabolismus eine Rolle spielt (Lehninger *et al.*, 2005). Als Beispiele für Pyridinnukleotid-abhängige Enzyme seien die in der Glykolyse vorkommende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ($\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$) und die zur Synthese von Fettsäuren notwendige Fettsäure-Synthase ($\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$) genannt

(Michal, 1999). Die während des Katabolismus reduzierten Elektronenüberträger werden an der Atmungskette wieder oxidiert und die dabei abgegebenen Elektronen zur Bildung von ATP genutzt.

Tabelle 2.1: Anregungs- und Emissionsmaxima einiger endogener Fluorophore (nach (Koenig & Schneckenburger, 1994; Ramanujam, 2000))

| Endogene Fluorophore | Anregungsmaximum in nm | Emissionsmaximum in nm |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Aminosäuren | | |
| • Tryptophan | 280 | 350 |
| • Tyrosin | 275 | 300 |
| • Phenylalanin | 260 | 280 |
| Strukturproteine | | |
| • Kollagen | 325 | 400, 405 |
| • Elastin | 290, 325 | 340, 400 |
| Enzyme und Coenzyme | | |
| • Flavine | 370, 450 | 520-530 |
| • NADH | 260, 340 | 460-470 |
| • NADPH | 260, 340 | 460-470 |
| Vitamine | | |
| • Vitamin A | 327 | 510 |
| • Vitamin K | 335 | 480 |
| • Vitamin D | 390 | 480 |
| Pyridoxine | | |
| • Pyridoxin | 332,340 | 400 |
| • Pyridoxamin | 335 | 400 |
| • Pyridoxal | 330 | 385 |
| • Pyridoxinsäure | 315 | 425 |
| • Pyridoxal-5'-Phosphat | 330 | 400 |
| • Vitamin B ₁₂ | 275 | 305 |
| Lipide | | |
| • Phospholipide | 436 | 540-560 |
| • Lipofuscin | 340-395 | 540, 430-460 |
| • Ceroid | 340-395 | 430-460, 540 |
| Porphyrine | | |
| • Uroporphyrin | 404 | 624 |
| • Coproporphyrin | 398 | 622 |
| • Protoporphyrin | 406 | 633 |
| • Zn-Protoporphyrin | 421 | 592 |

Es gilt zu beachten, dass bei den Flavinen nur die oxidierte Form (FAD, FMN) fluoresziert (Ramanujam, 2000). Die Emissionsspektren der drei Flavine (FAD, FMN und Riboflavin) sind identisch (Galland & Senger, 1988) und unterscheiden sich nur in ihrer Intensität. Der Intensitätsunterschied ist darin begründet, dass FMN und Riboflavin eine zehnfach höhere Quantenausbeute (0,25) im Vergleich zu FAD (0,025) besitzen (Weber, 1950). In dieser Arbeit wird die Fluoreszenzemission um 530 nm zusammenfassend als Flavinfluoreszenz bezeichnet.

Im Gegensatz zu den Flavinen fluoreszieren NADH und NADPH nur in ihrer reduzierten Form (Chance *et al.*, 1979). Auch sie sind fluoreszenzspektroskopisch nicht zu unterscheiden, sodass sie im Folgenden als NAD(P)H bezeichnet werden. Laut Siano & Mutharasan ist die NADH-Fluoreszenz bei Hefe überwiegend mitochondrialen Ursprungs (Siano & Mutharasan, 1989).

Durch die Messung von Fluoreszenzsignalen verschiedener Fluorophore in Mikroorganismen ist es möglich, deren biologischen Zustand zu charakterisieren (Stärk *et al.*, 2002). Insbesondere die NAD(P)H-Fluoreszenz hat sich in vielen Fällen als geeignetes Signal zur Charakterisierung des Zellzustandes erwiesen (Marose *et al.*, 1998; Scheper *et al.*, 1987; Tartakovsky *et al.*, 1996). In den 1950er Jahren entwickelten Duysens und Amesz als erste einen Fluoreszenzsensor, mit dem sie in der Lage waren, die NAD(P)H-Fluoreszenz *in vivo* zu beobachten (Duysens & Amesz, 1957). Seitdem wurden verschiedene Fluoreszenzmesssysteme entwickelt, um die Überwachung und Kontrolle von Bioprocessen online zu ermöglichen (Beyeler *et al.*, 1981; Chance *et al.*, 1964; Harrison & Chance, 1970; Horvath *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1991; Marose *et al.*, 1998; Scheper & Schügerl, 1986; Skibsted *et al.*, 2001; Zabriskie & Humphrey, 1978). All diesen Messsystemen ist gemein, dass sie zur Fluoreszenzanregung Xenon- oder Quecksilberlampen in Kombination mit Filtern benutzen. Des Weiteren detektieren sie nur Fluoreszenzemissionen unterhalb 600 nm. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Fluoreszenzmesssystem bestehend aus einer Hochleistungs-UV-LED zur Fluoreszenzanregung und einem CCD-Spektrometer zur Detektion (400-980 nm) soll überprüft werden, ob dieser miniaturisierte Aufbau ebenfalls in der Lage ist, den physiologischen Zustand von Zellen zu charakterisieren. Dafür werden neben der NAD(P)H- und Flavin-Fluoreszenz auch die hiermit detektierbare Porphyrinfluoreszenz herangezogen.

Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über die Entwicklung von Fluoreszenzsensoren der letzten fünfzig Jahre.

Tabelle 2.2: Historische Entwicklung verschiedener Fluoreszenzmesssysteme zur Bioprozess-Überwachung (nach (Humphrey *et al.*, 1989))

| Jahr | Autoren | Thema |
|------|------------------------|--|
| 1957 | Duysens & Ames | Fluoreszenzspektroskopische Erfassung von NADH in intakten Zellen |
| 1964 | Chance <i>et al.</i> | Oszillation der NAD(P)H-Fluoreszenz bei kontinuierlicher Hefekultivierung |
| 1970 | Harrison & Chance | Messung der NADH-Fluoreszenz bei kontinuierlicher Kultivierung von <i>Klebsiella</i> |
| 1978 | Zabriskie & Humphrey | Ermittlung von Biomasse und Wachstumsrate durch Kulturfluoreszenzmessungen |
| 1981 | Beyeler <i>et al.</i> | Messungen der NAD(P)H-Fluoreszenz während Kultivierungen mit einem miniaturisierten Aufbau |
| 1986 | Scheper & Schügerl | Charakterisierung von Bioreaktoren (u. a. Mischzeit) mittels Mikrofluorometer, das zwei Wellenlängen simultan detektieren kann |
| 1991 | Li <i>et al.</i> | Simultane Erfassung von Tryptophan, Pyridoxin, NAD(P)H und Riboflavin durch multiple Fluoreszenz-anregung bei Hefekultivierungen |
| 1993 | Horvath <i>et al.</i> | Bestimmung von Biomasse und Produktkonzentration durch intrazelluläre Tryptophan- und Pyridoxin-fluoreszenz bei Hefekultivierungen |
| 2001 | Skibsted <i>et al.</i> | Überwachung von <i>Pseudomonas</i> Kultivierungen mittels 2-D-Fluoreszenz und multivariater Kalibrierung |

Seitdem wird mittels Fluoreszenzmessung versucht, online die Zellvitalität zu bestimmen, die ein Maß dafür ist, ob die Zellen sich vermehren oder ein (gewünschtes) Produkt produzieren. Die Fluoreszenzintensität hängt dabei nicht nur von der Konzentration lebender Zellen und ihrem Stoffwechselzustand ab, sondern lässt sich auch von Umgebungsbedingungen wie Luftblasen oder fluoreszierenden Mediumsbestandteilen beeinflussen (Stärk *et al.*, 2002). Es ist daher wichtig, diese abiotischen Faktoren auszuschließen, z. B. durch Verwendung eines nicht fluoreszierenden Mediums, oder konstant zu halten (z. B. Rührerdrehzahl, Begasungsrate, Position der Messsonde) (Horvath & Spangler, 1992; Li & Humphrey, 1992).

2.3 Kultivierung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von Mikroorganismen oder höheren Zellen wird oft auch als Fermentation bezeichnet. Ursprünglich war damit nur die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen (Gärung) gemeint. Heute ist dieser Begriff aber allgemein im deutschen Sprachgebrauch üblich. Auch in dieser Arbeit werden Fermentation und Kultivierung synonym verwendet.

Die Kultivierung von Mikroorganismen findet im Batch-Verfahren (Satzverfahren), Fed-Batch-Verfahren (Zulaufverfahren) oder im kontinuierlichen Betrieb statt.

Beim Batchverfahren verläuft die Fermentation satzweise und diskontinuierlich. Das heißt, es findet weder ein Zulauf an Substrat noch ein Ablauf an Produkt während der Fermentation statt. Alle Komponenten werden vorgelegt und die Fermentation ist beendet, wenn alle Substrate verbraucht sind. In der Brauerei finden die Propagation der Bierhefe sowie die Gärung im Satzbetrieb statt.

Die Fed-Batch Kultivierung unterscheidet sich vom Batchverfahren durch einen kontinuierlichen Zulauf an Substrat(en). Somit können hohe Substratkonzentrationen zu Beginn der Fermentation vermieden werden, die z. B. zur Wachstumshemmung führen können. Das Reaktionsvolumen ist damit im Gegensatz zur Batch Kultivierung nicht konstant. Mit dem Fed-Batchverfahren lassen sich höhere Ausbeuten erzielen bzw. Hochzelldichtekultivierungen durchführen. Dieses Verfahren wird in der Backhefeindustrie eingesetzt, um eine möglichst hohe Biomasse zu erzielen.

In dieser Arbeit werden Kultivierungen im Batch- und im Fed-Batch-Betrieb durchgeführt, daher wird auf Kultivierungen im kontinuierlichen Betrieb nicht näher eingegangen.

Zur Charakterisierung des physiologischen Zustandes von Mikroorganismen während der Kultivierung werden neben der Fluoreszenzspektroskopie noch andere Messverfahren verwendet. Als Beispiel sei die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) bei Hefe genannt (Annemüller *et al.*, 2008). Der Nachteil dieser Methoden ist, dass Proben gezogen werden müssen, die anschließend *offline* und damit zeitverzögert zur Kultivierung analysiert werden.

2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ist ein Ascomycet, das heißt ein einzelliger sporenbildender Pilz ohne Fruchtkörper und Hyphen (s. Abb. 2.3). Die Hefezellen sind ellipsoid mit Durchmessern von etwa 5-10 µm auf der langen Seite und 1-7 µm für die kurze Seite. Mit zunehmendem Alter werden die Zellen größer. Bierhefen sind generell größer als Backhefen (Walker, 1998).

Hefezellen sind in der Regel diploid, wobei Brauhefen meist polyploid vorliegen. Sie pflanzen sich vorwiegend asexuell durch Knospung fort. Nach dem Abknospen der Tochterzelle bleibt

eine konvexe Narbe an der Mutterzelle zurück. Eine Mutterzelle kann bis zu dreißigmal knospen, typische Lebensspannen liegen bei etwa 25-mal (Walker, 1998). Die sexuelle Fortpflanzung findet nur unter bestimmten Bedingungen statt. So bildet die Hefe z. B. bei Nährstoffmangel haploide Ascosporen (meist vier) aus. Werden die Bedingungen wieder günstiger, verschmelzen zwei Ascosporen unterschiedlichen Geschlechtstyps zu einer diploiden Hefezelle (Annemüller *et al.*, 2008).

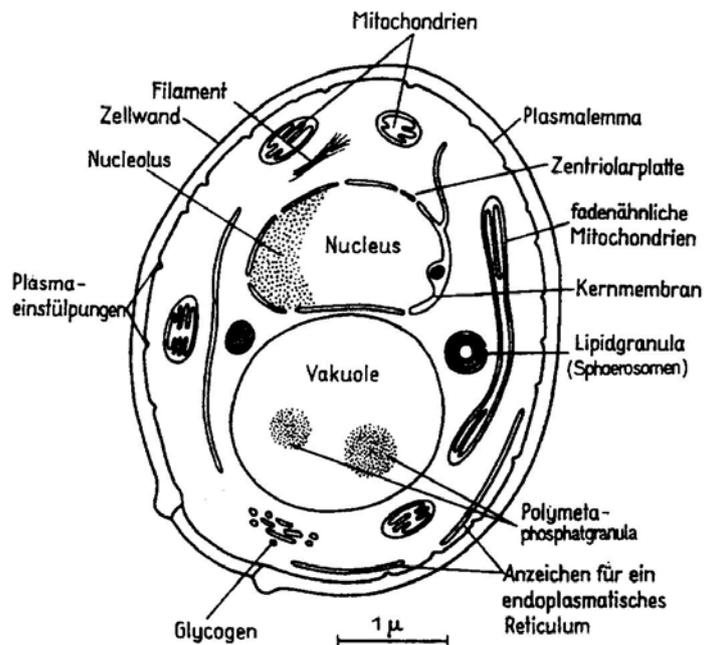


Abb. 2.3: Querschnitt einer Hefezelle (Rehm, 1980)

Die Zellumhüllung besteht aus Plasmamembran, Zellwand und dem dazwischen befindlichen Periplasma. Sie spielt eine wichtige Rolle beim Kontrollieren des osmotischen Drucks und der Permeabilität. Im Periplasma befinden sich vor allem Sekretionsproteine, die Substrate extrazellulär hydrolysieren, welche die Plasmamembran nicht durchdringen können. Zu diesen Proteinen gehört auch die Invertase, die Saccharose zu Glucose und Fructose hydrolysiert. Im Gegensatz zu Saccharose wird Maltose nach erfolgtem aktiven Transport (unter ATP-Verbrauch) intrazellulär durch Maltase (α -Glucosidase) hydrolysiert. Im Medium vorliegende Glucose und Fructose passieren durch erleichterte Diffusion die Plasmamembran.

Hefe ist fakultativ anaerob, das heißt, sie kann sowohl mit als auch unter Ausschluss von Sauerstoff leben. Allerdings kann Hefe anaerob nur wenige Zellteilungen durchführen, da sie zur Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Steroiden Sauerstoff benötigt (Fritsche, 2002). Insbesondere ist sie auxotroph für Ölsäure und Ergosterol (Walker, 1998).

Unter aeroben Bedingungen (Atmung) erfolgt die vollständige Oxidation einer Kohlenstoffquelle (z. B. Glucose) zu CO_2 und Wasser. Hexosen werden in der Glykolyse (auch als Fructose-diphosphat-Weg oder Embden-Meyerhof-Parnas-Weg bezeichnet) zu Pyruvat abgebaut. An die Glykolyse schließen sich der Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette an. Für eine detaillierte Beschreibung des Katabolismus sei an dieser Stelle auf die Lehrbücher der Biochemie verwiesen.

Die Glykolyse findet im Cytoplasma statt, während die Enzyme des Citratzyklus sich in der Mitochondrienmatrix befinden. Die Bestandteile der Atmungskette sind an der inneren Mitochondrienmembran zu finden.

In der Glykolyse und dem Citratzyklus werden Reduktionsäquivalente (Wasserstoffatome und Elektronen) gebildet. Diese werden auf Elektronentransport-Carrier übertragen. Als solche dienen $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ und FAD/FADH_2 . In der Atmungskette können unter aeroben Bedingungen die Elektronen der Carrier abgegeben werden, sodass sie wieder in ihrer oxidierten Form (NAD^+ und FAD) vorliegen und in der Glykolyse bzw. im Citratzyklus eingesetzt werden können. Letztlich wird ATP gebildet, das eine zentrale Rolle als Energieträger spielt. Unter aeroben Bedingungen entstehen 38 Mol ATP pro Mol Glucose.

Bei der aeroben Gärung tritt durch die hohe Glucosekonzentration der Crabtree-Effekt auf. Hier wird bei Glucosekonzentrationen >100 mg/L trotz des vorhandenen Sauerstoffs die vollständige Veratmung zu CO_2 und Wasser gehemmt und in nennenswertem Maße Ethanol produziert. Dies ist wahrscheinlich auf eine begrenzte Kapazität der Atmungskette zurückzuführen. Außerdem tritt Glucoserepression auf (Van Hoek *et al.*, 1998; Woehr, 1981). Hierbei reprimiert die Glucose bei hohen Konzentrationen die Transkription von Genen, die für Enzyme des respiratorischen Stoffwechsels, Bestandteile der Atmungskette und des Citratzyklus kodieren (Boumans *et al.*, 1998).

Die Ethanolbildung erfolgt ausgehend von dem in der Glykolyse gebildeten Pyruvat. Die Reaktion wird zunächst von der Pyruvat-Decarboxylase katalysiert, die aus Pyruvat CO_2 und Acetaldehyd herstellt. Das Acetaldehyd wird anschließend mittels Alkohol-Dehydrogenase (ADH, Isoenzym I) zu Ethanol reduziert. Dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert. Das so gewonnene NAD^+ kann wieder für Reaktionen der Glykolyse und des Citratzyklus verwendet werden. Ist die Glucose verbraucht, nutzt die Hefe das Ethanol als Kohlenstoffquelle. Dazu wird Ethanol zunächst durch ADH (Isoenzym II) zu Acetaldehyd oxidiert. Anschließend wird das Acetaldehyd mittels Aldehyd-Dehydrogenase zu Acetat oxidiert. Im Gegenzug werden zwei NAD(P)^+ reduziert. Das gebildete Acetat wird durch ATP-abhängige Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA aktiviert und als solches entweder in den Citratzyklus oder den Glyoxylatzyklus eingeschleust. Ausgehend vom Glyoxylatzyklus werden zwei Acetylgruppen

zu Succinat verbunden und dieses in den Citratzyklus transferiert (Wills, 1990). Während der Umstellung der Hefe von Glucoseabbau zu Ethanolabbau (Diauxic Shift), werden die zuvor transkribierten Gene für Glykolyse und Proteinbiosynthese abgeschaltet und im Gegenzug die Gene, deren Produkte für Atmung, Mitochondrienwachstum, Citratzyklus, Glyoxylatzyklus und Gluconeogenese kodieren, dereprimiert (Daran-Lapujade *et al.*, 2004; DeRisi & Iyer, 1997).

Unter anaeroben Bedingungen werden aus Glucose Ethanol und CO₂ gebildet. Dabei entstehen nur zwei Moleküle ATP durch Substratkettenphosphorylierung, da der Sauerstoff zur ATP-Bildung in der Atmungskette fehlt. Der Großteil der Kohlenstoffquelle dient der Energiegewinnung, nur etwa 2 % werden assimiliert (Fritsche, 2002). Für Hefe ist die anaerobe Gärung damit energetisch deutlich ineffizienter als Atmung oder aerobe Gärung (vgl. Tabelle 2.3).

Die Gärung lässt sich jedoch durch eine kräftige Durchlüftung des Substrates fast vollständig zugunsten des Wachstums unterdrücken (Pasteur-Effekt). Es werden kaum noch Ethanol und CO₂ gebildet, dafür aber von der Hefezelle 38 statt 2 Mol ATP pro Mol Glucose gewonnen, die zum Aufbau von Zellmaterial verwendet werden können (Rehm, 1980).

In Abb. 2.4 sind die Stoffbilanzen von Atmung und Gärung gegenübergestellt. Es ist erkennbar, dass unter anaeroben Bedingungen deutlich weniger Zellsubstanz gebildet werden kann als während der Atmung.

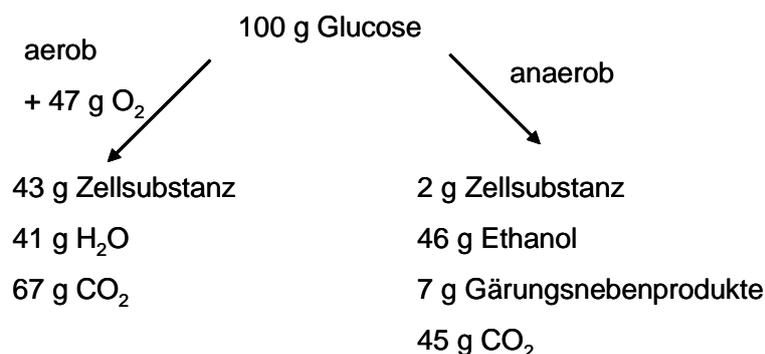


Abb. 2.4: Stoffbilanzen von Atmung und Gärung (verändert nach (Fritsche, 2002))

Tabelle 2.3 liefert einen Überblick über den Energiegewinn von Atmung und Gärung.

Tabelle 2.3: Zusammenfassung der Abbaureaktionen bei Hefe und deren theoretische Energieausbeuten (Annemüller *et al.*, 2008)

| Stoffwechselweg | Reaktion | $\Delta G_0'$ | ATP-Gewinn für die Hefezelle | |
|-----------------|--|---------------|------------------------------|---------|
| Atmung | $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$ | - 2880 kJ | 38 Mol | 1900 kJ |
| Atmung | $C_2H_5OH + 3 O_2 \rightarrow 2 CO_2 + 3 H_2O$ | - 1310 kJ | 17 Mol | 850 kJ |
| Gärung | $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$ | - 260 kJ | 2 Mol | 100 kJ |

Die folgende Abbildung zeigt stark schematisiert den Porphyrinstoffwechsel von *S. cerevisiae*. Porphyrine sind Derivate des Tetrapyrrols Porphin und werden in aeroben Lebewesen gebildet (Koenig & Schneckenburger, 1994). Protoporphyrin IX kommt in der Natur als Chromophor im Hämoglobin, Myoglobin und den meisten Cytochromen, die sich in der Atmungskette befinden, vor. Es ist in der Lage, mit Metallionen wie Eisen, Magnesium, Nickel, Kupfer oder Zink Komplexe zu bilden. Wichtige Metalloporphyrine sind Eisenporphyrine (Häm) und Magnesiumporphyrine (Chlorophyll) (Kleber & Schlee, 1991). Hefe ist in der Lage, die Porphyrine beider Isomerenreihen I und III zu synthetisieren. Unter günstigen Umgebungsbedingungen bildet sie vor allem Protoporphyrin IX (Stich, 1950). Das produzierte Protoporphyrin IX liegt dabei entweder frei oder mit Zinkionen komplexiert vor (Pretlow & Sherman, 1967).

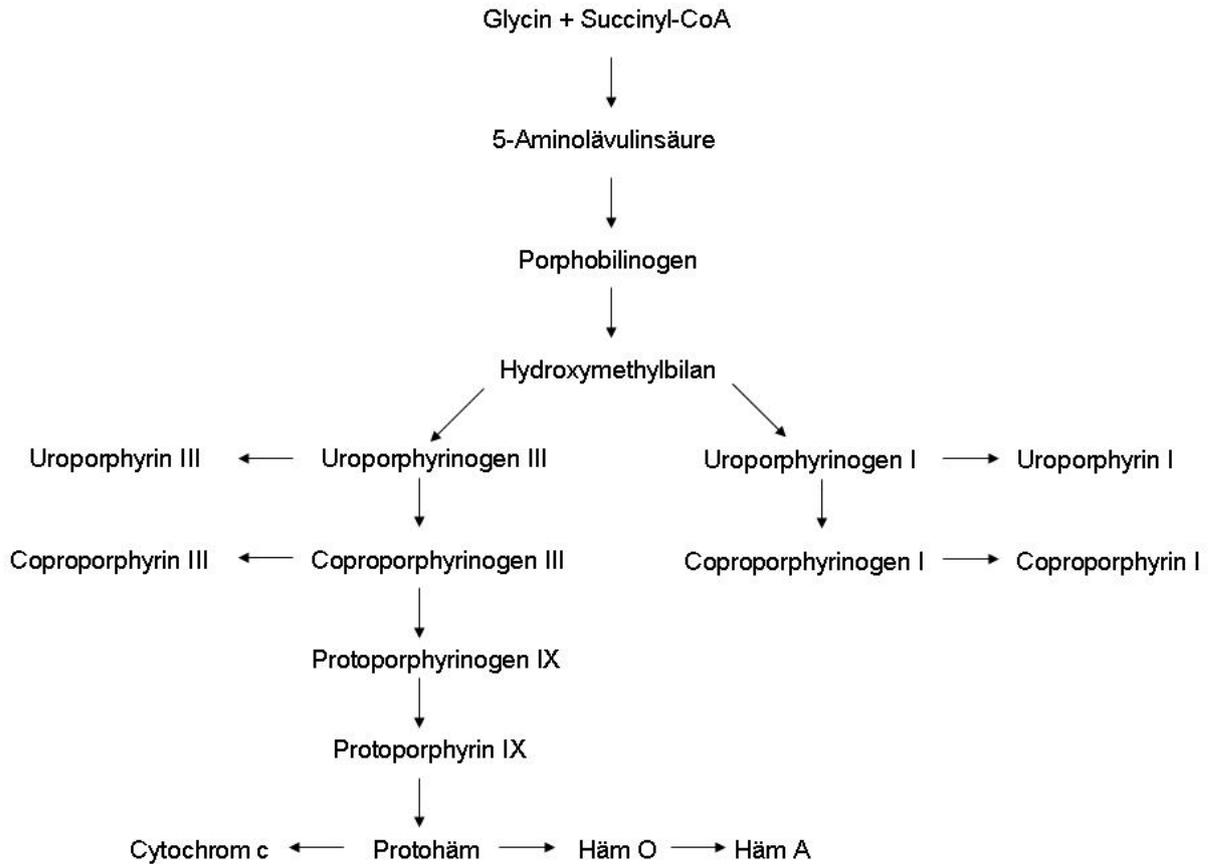


Abb. 2.5: Porphyrinstoffwechsel von *S. cerevisiae* (verändert nach www.genome.jp und pathway.yeastgenome.org)

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den am häufigsten verwendeten Mikroorganismen in der Industrie (Madigan *et al.*, 2003). Sie wird bereits seit Jahrtausenden zur Produktion von Lebens- und Genussmitteln wie Brot, Bier und Wein genutzt. Beispielsweise dient sie der Backindustrie durch entstehendes CO₂ zur Teiglockerung und vergärt in der Brauerei die in der Würze vorhandenen Zucker zu Ethanol und CO₂.

Weltweit werden 1700 Millionen Hektoliter Bier pro Jahr hergestellt, allein Deutschland produziert 107 Millionen Hektoliter und liegt damit auf dem dritten Platz hinter China und den USA (Stand 2006, (Kunze, 2007)). In der Europäischen Union werden ca. eine Million Tonnen Backhefe pro Jahr hergestellt, davon in Deutschland etwa 130 000 Tonnen (Bundesamt, 2009).

Verwendung in Brauereien

In der Brauerei wird Bierhefe zur Ethanolherstellung verwendet. Dies geschieht während der Gärung, bei der Hefe in Gärtanks zur vorher aus Malz, Wasser und Hopfen hergestellten Würze gegeben wird (Anstellen). Eine klassische Gärung dauert etwa acht bis neun Tage bei Temperaturen von ca. 10-14°C. Dabei beträgt die Hefekonzentration beim Anstellen ungefähr $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL und liegt am Ende der Gärung bei ca. $5-6 \cdot 10^7$ Zellen/mL (Annemüller *et al.*, 2008). In der Brauerei werden untergärige und obergärige Bierhefen unterschieden. Die untergärigen Bierhefen liegen vorwiegend als Einzelzellen oder Zellpaare vor und setzen sich im Laufe der Gärung am Gefäßboden ab. Im Gegensatz dazu bilden die Zellen der obergärigen Stämme Sprossverbände und sammeln sich während der Gärung an der Oberfläche an.

Als Kohlenstoffquellen dienen die in der Würze enthaltenen Zucker Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Maltotriose. Sie entstehen während der Würzeherstellung aus Gerste (ggf. Weizen). Zu Beginn wird die Gerste ein bis zwei Tage in Wasser eingeweicht, damit die vorhandenen Enzyme aktiviert werden können. Je nach Gerste und Malztyp ist dafür ein Wassergehalt von etwa 42-47 % erforderlich. Durch die Wasseraufnahme setzt die Atmung im Korn ein, sodass die Gerste während des Weichens mit Sauerstoff versorgt werden muss, damit die anschließende Keimung einwandfrei funktioniert. Bei der Keimung entwickeln sich der Blattkeim und die Wurzelkeime. Der Mehlkörper beginnt sich aufzulösen, da der Keimling von den dort enthaltenen Reservestoffen zehrt. In den Gerstenkeimlingen werden α -Amylasen gebildet und die im Korn bereits vorhandenen β -Amylasen freigesetzt. Dies führt zur Verzuckerung der im Mehlkörper enthaltenen Stärke (Amylose und Amylopektin). Dabei werden vor allem Maltose sowie etwas Saccharose erzeugt. Zusätzlich zu den Amylasen werden auch Glucanasen zum Abbau der Zellwand sowie Proteasen und Phosphatasen gebildet. Nach fünf bis acht Tagen Keimung ist das sogenannte Grünmalz fertig. Es hat einen Wassergehalt von 40-45 %. Beim anschließenden Darren wird die Keimung gestoppt, um Atmungsverluste zu minimieren. Zusätzlich wird durch Verringerung des Wassergehalts auf unter 5 % das Malz haltbar gemacht. Je nach Darverfahren entstehen unterschiedliche Malze, deren Farb- und Aromastoffe für den Geschmack und die Art des hergestellten Bieres von Bedeutung sind. So wird helles Malz bei 80-85°C abgedarrt, während die Abdarrtemperatur bei dunklem Malz 100–110°C beträgt. Nach dem Darren wird das Malz abgekühlt, von den Wurzelkeimen befreit und vor der Weiterverarbeitung mindestens vier Wochen gelagert. Zur Würzeherstellung wird das Malz geschrotet und anschließend mit Wasser eine Maische hergestellt. Ziel des Maischens ist es, die ungelösten Inhaltsstoffe des Malzes in lösliche Stoffe - den Extrakt - zu überführen. Hierbei ist der vollständige Stärkeabbau der wichtigste enzymatische Vorgang. Die Maische wird hierfür erhitzt, dabei werden zwei Verfahren unterschieden: Das Infusions- und das

Dekoktionsverfahren. Beim Infusionsverfahren wird die gesamte Maische erwärmt und bei bestimmten Temperaturen werden Rasten eingehalten. Für das Dekoktionsverfahren wird ein Teil der Maische entnommen, zum Kochen gebracht und anschließend wieder der restlichen Maische zugefügt. Dieser Vorgang wird ein- bis dreimal zur Maischeherstellung durchgeführt. Im Folgenden wird die Maischeherstellung nach dem Infusionsverfahren beschrieben. Während des Aufheizens der Maische werden Verkleisterung, Verflüssigung und Verzuckerung unterschieden. Die Verkleisterung der Stärke ist kein enzymatischer Prozess. Sie findet bei etwa 60-65°C statt, dabei quellen die Stärkekörner auf und platzen. Dadurch wird die in ihnen enthaltene Stärke für Amylasen angreifbar. Dieser Vorgang findet während der Verflüssigung statt. Die Stärke wird endogen durch α -Amylase in kürzere Ketten gespalten, dabei nimmt die Viskosität rasch ab. Der Abbau der Stärke setzt sich in der Verzuckerung fort. Die durch die α -Amylase gebildeten Bruchstücke können von der β -Amylase exogen weiter abgebaut werden. Dabei spaltet sie Maltosereste von der Stärkekette ab. Damit der Stärkeabbau restlos erfolgen kann, müssen bei den Optimaltemperaturen der Amylasen Rasten eingelegt werden. Dies ist zum einen die Maltosebildungsrast bei 60-65°C, hier wirkt die β -Amylase optimal. Die Verzuckerungsrast für die α -Amylase findet bei 70-75°C statt. Nach erfolgter Verzuckerung wird die Maischetemperatur auf 75-78°C erhöht (Abmischtemperatur). Am Ende befinden sich in der Maische hauptsächlich die vergärbaren Zucker Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Maltotriose sowie einige nicht vergärbare Grenzdextrine; zudem sind Proteine und unlösliche Bestandteile wie Spelzen vorhanden. Beim anschließenden Abläutern wird die Würze von den Feststoffen, so genannte Treber, getrennt. Danach wird die Würze gekocht und mit Hopfen versetzt. Hierbei werden alle Enzyme inaktiviert und hitzeunlösliche Protein-Gerbstoff-Verbindungen abgetrennt. Darüber hinaus werden die Bestandteile des Hopfens, vor allem Bitterstoffe, gelöst und die Würze sterilisiert. Bevor die Würze zur Gärung verwendet werden kann, muss sie auf Gärtemperatur abgekühlt werden. Diese beträgt bei untergärigen Bierhefen ca. 5-10°C, bei obergärigen Bierhefen liegt sie bei etwa 12-15°C (Back, 2005; Kunze, 2007; Narziss, 2005; Rehm, 1980).

Vor dem Anstellen erfolgt die Hefepropagation, damit eine ausreichende Hefekonzentration für die Gärung erzielt wird. Hierfür wird die sich in der Würze befindliche Hefe belüftet, damit sie sich vermehren kann.

Herstellung von Backhefe

Ziel der Backhefeherstellung ist ein hoher Gehalt an Biomasse verbunden mit einer guten Triebkraft der Hefe, die auch nach längerer Lagerung bei kühlen Temperaturen noch gegeben sein soll (Nilsson *et al.*, 2001). Um einen möglichst hohen Gehalt an Biomasse

produzieren zu können, wird die Hefeanzucht im Zulaufverfahren durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle dient vor allem Melasse, die während der Zuckerherstellung aus Zuckerrüben bzw. Zuckerrohr anfällt. Sie muss für die Verwendung in der Backhefeindustrie allerdings noch aufbereitet werden. Die Melasse wird während des Fed-Batch so zudosiert, dass kein bzw. nur geringe Mengen Ethanol produziert werden und durch eine kräftige Belüftung die Zellvermehrung begünstigt wird (Rehm, 1980). Dabei werden beim Durchlaufen der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette 38 Mol ATP pro Mol Glucose produziert. Nach der Wachstumsphase werden die Hefezellen durch Zentrifugation geerntet und gewaschen. Die Backhefe kommt hauptsächlich in zwei Varianten, nämlich als Press- oder Trockenhefe in den Handel. Während die Presshefe noch einen Feuchtegehalt von ca. 70 % aufweist, ist der der Trockenhefe auf etwa 8 % reduziert (Madigan *et al.*, 2003). Zusätzlich zu diesen beiden Formen wird neuerdings auch Flüssighefe an Bäckereien vertrieben (Michael Quantz, pers. Mitteilung).

Die Hefequalität wird neben ihrer Triebkraft auch durch ihre Lagerfähigkeit bestimmt. Das Zulaufverfahren ermöglicht oxidatives Wachstum, welches zu einem geringen Protein- und einem hohen Kohlenhydratgehalt der Hefezellen führt. Dies fördert die Lagerstabilität (Schügerl, 1997). Für gute Triebkraft ist hingegen die Fähigkeit zu anaeroben Wachstum erforderlich (Nilsson *et al.*, 2001). Dies steht im Gegensatz zur oben beschriebenen gut belüfteten Hochzelldichtekultivierung. Durch Anpassung der Fütterungsstrategie kann ein Kompromiss zwischen beiden Qualitätsmerkmalen gefunden werden (Zamani *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist es wichtig, die Lagerstabilität der Hefe einschätzen zu können. Hierfür gibt es verschiedene Methoden. So wird zum einen die Konsistenz der Hefe vor und nach Lagerung bei 4 bzw. 25°C gemessen. Zum anderen wird der Triebkraftverlust nach Lagerung bei diesen Temperaturen bestimmt. Eine weitere in der Hefeindustrie gebräuchliche Methode ist die Thermostatprüfung. Hierbei wird die Frischbackhefe in einen Eierbecher gedrückt und bei 35°C inkubiert, bis sie infolge der Autolyse weich wird. Dies kann 2-10 Tage dauern. All den Verfahren ist gemein, dass ihre Ergebnisse erst vorliegen, wenn die produzierte Hefe bereits im Handel ist. Außerdem sind die gewonnenen Daten nicht zweifelsfrei mit der Lagerstabilität korrelierbar. Daher mangelt es gegenwärtig an Verfahren, die schnell und zuverlässig die Lagerstabilität der Backhefe bestimmen können (Fischer & Rahn, 2005).

2.3.2 *Escherichia coli*

Das Gram negative Bakterium *Escherichia coli* gehört zu den Enterobakterien. Es ist der am besten erforschte Prokaryot und dient als Modellorganismus. Wie bei *S. cerevisiae* ist auch sein Genom vollständig entschlüsselt (Madigan *et al.*, 2003). Daher wird *E. coli* bevorzugt und in großem Umfang zur Produktion rekombinanter Proteine verwendet (Riesenberg, 1991). Beispielsweise werden gentechnisch veränderte *E. coli* Stämme in der pharmazeutischen Industrie zur Herstellung pharmazeutisch aktiver Proteine (z. B. Humaninsulin) eingesetzt.

Wie *S. cerevisiae* ist auch *E. coli* fakultativ anaerob. Unter aeroben Bedingungen wird die Kohlenstoffquelle vollständig zu CO₂ und Wasser oxidiert. *E. coli* nutzt im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* nicht nur die Glykolyse zum Abbau von Hexosen, sondern metabolisiert etwa ein Viertel der Hexosen alternativ über den Pentosephosphatweg (Rehm, 1980). Des Weiteren unterscheidet sich auch die Atmungskette bei *E. coli* von Hefe. Da *E. coli* als Prokaryot keine Mitochondrien besitzt, findet die oxidative Phosphorylierung an der Cytoplasmamembran statt. Pro Molekül Glucose kann *E. coli* etwa 20 ATP bilden (Fritsche, 2002). Bei hohen Glucosekonzentrationen häuft sich gebildetes Citrat an. Dies führt zur Bildung von Lactat, Ethanol und Acetat als Nebenprodukte der aeroben Glucosedissimilation. Die Acetatbildung bei hohen Glucosekonzentrationen wird auch als „bakterieller Crabtree-Effekt“ bezeichnet (Lischke *et al.*, 1993).

Auch bei *E. coli* tritt Katabolitrepression auf. So werden beim Vorhandensein mehrerer Kohlenstoffquellen diese sequenziell genutzt (diauxisches Wachstum). Ein Beispiel für Katabolitrepression ist das Lactose-Operon (*lac*-Operon). Befinden sich sowohl Glucose und Lactose im Medium, so hemmt die Glucose die Synthese der Lactose-abbauenden Enzyme durch Repression des *lac*-Operons (Bindung eines Repressors an den Operator). Erst wenn die Glucose aufgebraucht ist, wird die Hemmung aufgehoben und gleichzeitig durch Substratinduktion der Lactose (mittels Bindung des Katabolit-Aktivator-Proteins CAP an das Operon) die Enzyme des *lac*-Operons transkribiert. Durch diese sowohl positive als auch negative Regulation des Operons stellt *E. coli* sicher, dass die Lactose-abbauenden Enzyme sehr effizient transkribiert werden (Alberts *et al.*, 1995).

Bei anaeroben Verhältnissen führt *E. coli* gemischte Säuregärung durch. Hierbei entstehen Acetat, Lactat, Succinat, Formiat und Ethanol. Aus dem Formiat können mittels Formiat-Hydrogen-Lyase CO₂ und Wasserstoff gebildet werden (Fritsche, 2002).

2.4 Biomedizinische Anwendungen

In der Medizin werden Fluoreszenzmessungen zu diagnostischen Zwecken durchgeführt. Die Fluoreszenzdiagnostik wird beispielsweise bei tumorösen Erkrankungen der Haut, Blase, Lunge oder Cervix eingesetzt (Baumgartner *et al.*, 1996; Fritsch *et al.*, 1997; Kriegmair *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1989). Das Prinzip der Fluoreszenzdiagnostik beruht darauf, dass sich gesunde und erkrankte Gewebe in ihrer Fluorophorzusammensetzung unterscheiden (Richards-Kortum & Sevick-Muraca, 1996). Insbesondere die Porphyrinfluoreszenz wird zur Diagnose herangezogen, weil Tumorzellen meist mehr Protoporphyrin IX akkumulieren als gesundes Gewebe. Die genauen Ursachen hierfür sind noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass eine Kombination verschiedener Faktoren wie z. B. eine verminderte Ferrochelatase-Aktivität oder geringere Eisenionenkonzentration im Tumorgewebe verantwortlich ist (Juzenas *et al.*, 2002). Die Akkumulation der Porphyrine (v. a. Protoporphyrin IX) führt zu einer roten Autofluoreszenz des erkrankten Gewebes (Koenig & Schneckenburger, 1994). In manchen Fällen reicht die Autofluoreszenz des Tumors aus, um die Fluoreszenzdiagnostik durchführen zu können (Moesta *et al.*, 2001). Üblicherweise wird aber für die Fluoreszenzdiagnostik ein Marker verwendet, z. B. 5-Aminolävulinsäure (ALA) oder deren Derivate (Ackermann *et al.*, 2000; Juzeniene *et al.*, 2002; Zenzen & Zankl, 2003). Die 5-Aminolävulinsäure ist das natürliche Ausgangsprodukt der intrazellulären Hämbiosynthese, in deren Verlauf fluoreszierendes Protoporphyrin IX (PPIX) in den Zellen gebildet wird (Fritsch *et al.*, 1998). Durch äußere Zugabe von ALA wird die negative Feedback-Kontrolle der Hämbiosynthese umgangen, sodass die selektive Anreicherung von PPIX in malignem Gewebe zusätzlich gesteigert wird (Kennedy & Pottier, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wird der faseroptische Fluoreszenzmessaufbau zur Fluoreszenzdiagnostik bei Patienten mit Aktinischer Keratose sowie bei humanen Glioblastomen im Mausmodell verwendet. Als Marker dienen dabei der Methylester (Aktinische Keratose) bzw. der Butylester (Glioblastom) der 5-Aminolävulinsäure.

In Ergänzung zu Tabelle 2.1 sind in Abb. 2.6 und Abb. 2.7 die Anregungs- bzw. Fluoreszenzemissionsspektren der endogenen Fluorophore in menschlichem Gewebe dargestellt.

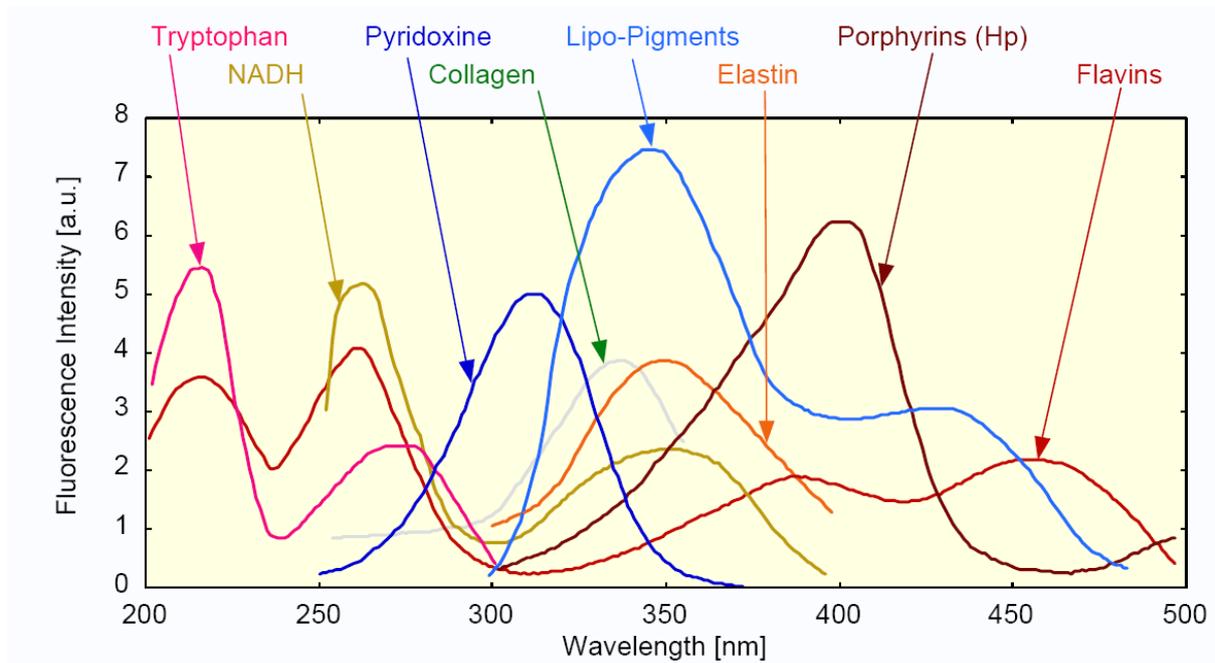


Abb. 2.6: Fluoreszenzanregungsspektren endogener Fluorophore (Wagnieres *et al.*, 1998)

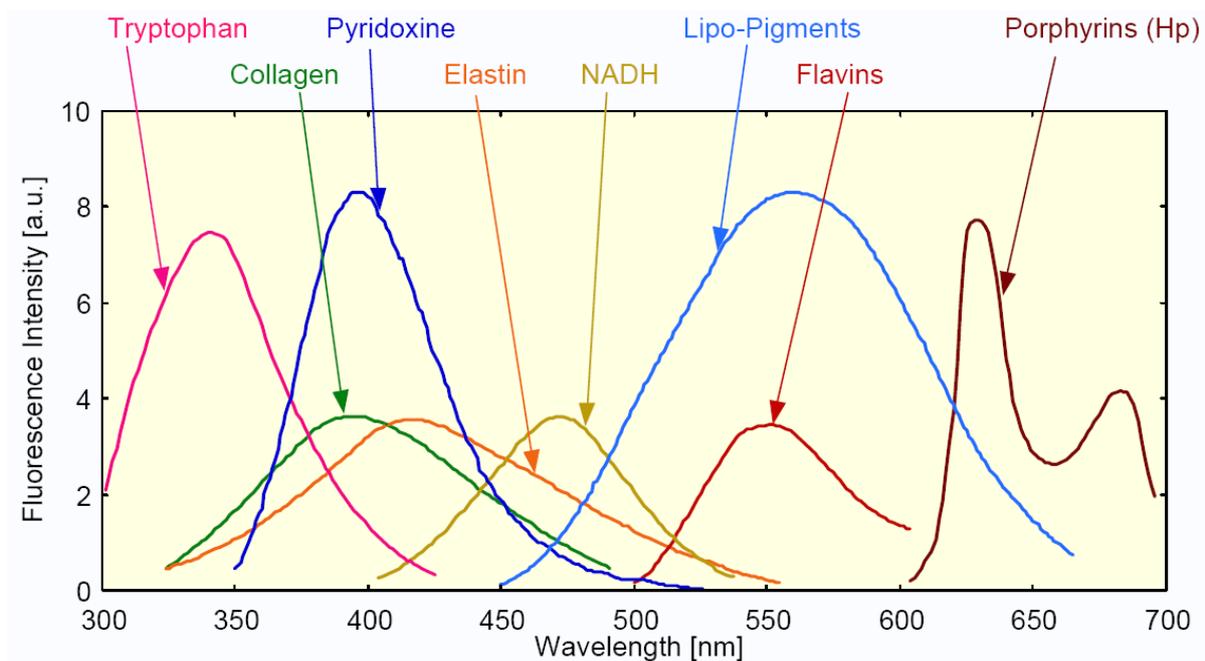


Abb. 2.7: Fluoreszenzemissionsspektren endogener Fluorophore (Wagnieres *et al.*, 1998)

2.4.1 Fluoreszenzdiagnostik bei Aktinischer Keratose

Aktinische Keratose wird durch chronische Lichteinwirkung in der Haut ausgelöst und gilt als Präkanzerose. Insbesondere sind verstärkt dem Sonnenlicht ausgesetzte Körperstellen wie Kopf (Stirn, Nasenrücken, Glatze) und Handrücken betroffen. Unbehandelt kann aus der Aktinischen Keratose Hautkrebs entstehen (Oppel & Korting, 2004). Zur

Fluoreszenzdiagnose wird topisch eine (methyl-)ALA-haltige Salbe auf die zu untersuchende Haut appliziert und lichtdicht verbunden. Nach einer gewissen Einwirkdauer kann mit blauem Licht das gebildete PPIX zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei besitzt der Methylester eine höhere Selektivität als die freie Säure; dies führt zu einer höheren Akkumulation des gebildeten PPIX in neoplastischem Gewebe (Lehmann, 2007; Pariser *et al.*, 2003). Daher fluoreszieren erkrankte Hautpartien rötlich, während gesundes Gewebe bläulich erscheint. Im Anschluss daran kann die Photodynamische Therapie (PDT) durchgeführt werden (Dragieva *et al.*, 2004).

2.4.2 Photodynamische Therapie

Die PDT ist eine Form der Photochemotherapie, bei der die Bestrahlung eines Photosensibilisators mit Licht unter Vorhandensein von Sauerstoff zur Bildung zytotoxischer Substanzen (vor allem Singulett-Sauerstoff), und damit zur Zerstörung des umliegenden Gewebes führt (Moan *et al.*, 1998). Als Photosensibilisator dient z. B. das durch vorherige ALA-Zugabe gebildete PPIX. Zur Durchführung der PDT wird das Gewebe mit Rotlicht bestrahlt. Dies führt dazu, dass PPIX in den ersten angeregten Singulett-Zustand übergeht, um von dort aus per Intersystem Crossing in den Triplett-Zustand zu gelangen. Dort überträgt es seine Energie auf den im Gewebe vorhandenen molekularen Sauerstoff. Durch diese Energieübertragung bildet sich für das Gewebe toxischer Singulett-Sauerstoff (Koenig & Schneckenburger, 1994). Die Photodynamische Therapie führt daher zu einer selektiven Zerstörung des Tumorgewebes, ohne umliegende, gesunde Zellen stark zu schädigen. Während der PDT werden ca. 70-95 % des gebildeten PPIX durch die Rotlichtbestrahlung abgebaut (Juzenas *et al.*, 2002; Moan *et al.*, 1997). Einen guten Überblick über die Photodynamische Therapie und ihre Erfolge liefern Dougherty *et al.* (Dougherty *et al.*, 1998).

Der Singulett-Sauerstoff ist auch an der Bildung von Photoprodukten aus PPIX während der PDT beteiligt. Photoporphyrin ist ein solches Photoprodukt, dessen Fluoreszenzemissionsmaximum um 670-675 nm liegt (Juzenas *et al.*, 2001; Moan *et al.*, 1997). Es werden noch weitere Photoprodukte gebildet, deren Fluoreszenzmissionen kurzweilig verschoben sind (Bagdonas *et al.*, 2000; Juzenas *et al.*, 2001). Daher kann durch Fluoreszenzmessungen während der PDT (Detektion der gebildeten Photoprodukte bzw. Abnahme der PPIX-Fluoreszenz) die Wirksamkeit der Behandlung überprüft werden (Koenig & Schneckenburger, 1994).

Die Photodynamische Therapie wird vor allem zur Behandlung von hellem Hautkrebs bzw. dessen Vorstufen, aber auch z. B. bei Cervix- oder Blasenkarzinomen eingesetzt (Dolmans *et al.*, 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Fluoreszenzmessung

3.1.1 Fluoreszenzmessaufbau mit CCD-Spektrometer

Der faseroptische Fluoreszenzmessaufbau bestand aus einer UV-LED-Lichtquelle (NCCU033 bzw. NCSU033A, Nichia, Tokyo), einer Tauchsonde (Eigenbau des „Instituts für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme“ der Hochschule Mannheim) und einem CCD-Spektrometer (MCS CCD, Carl Zeiss Jena GmbH) (siehe Abb. 3.1).

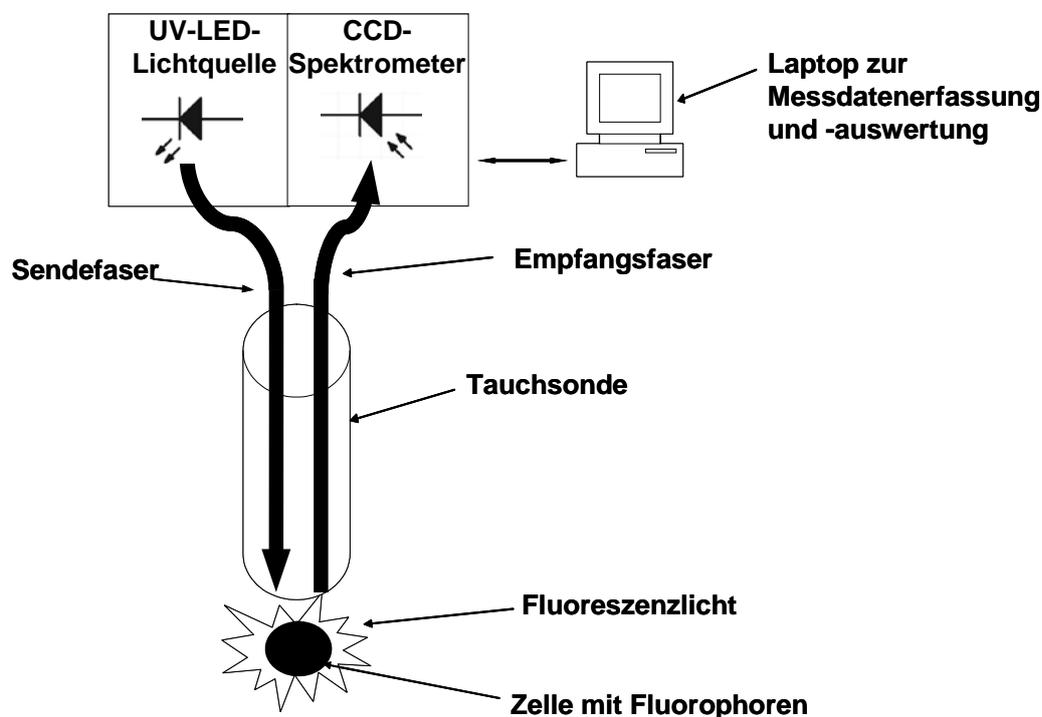


Abb. 3.1: Fluoreszenzmessaufbau mit CCD-Spektrometer

Die UV-LED hatte eine Emissionswellenlänge von 366 nm und eine Lichtleistung von ca. 130 mW. Das Licht der UV-LED gelangte durch die Sendefaser, die sich in einer Tauchsonde befand, zu den Zellen. Die darin enthaltenen Fluorophore wurden zur Fluoreszenz angeregt und die Fluoreszenzemission über die Empfangsfaser zum CCD-Spektrometer geleitet. Die Tauchsonde war eine Reflexionssonde in 180°-Anordnung, die zur Fluoreszenzmessung verwendet wurde. Die Detektion der Fluoreszenzspektren erfolgte mit dem CCD-Spektrometer in einem Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 980 nm.

Zur Aufnahme und Analyse der Fluoreszenzemissionsspektren wurde in der spektrometereigenen Software Aspect Plus[®] (Version 1.76) ein Mess- und Auswertemakro

mit integrierter Multikomponentenanalyse erstellt. Die Ausarbeitung einer Multikomponentenanalyse war notwendig, da sich die Emissionsspektren der detektierten Biofluorophore teilweise überlagerten (siehe z. B. Abb. 4.3). Die Multikomponentenanalyse gestattete es, aus der online gemessenen (Gesamt-)Kulturfluoreszenz direkt die zeitlichen Verläufe der NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrin-Fluoreszenz zu ermitteln.

3.1.2 Mehrkanal-Fluoreszenzsensor

Alternativ zu dem in 3.1.1 beschriebenen CCD-Spektrometer wurde ein am „Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme“ der Hochschule Mannheim entwickelter Sechskanalsensor verwendet (Geoerg, 2007). Der Aufbau ist in Abb. 3.2 schematisch dargestellt. Es wurde die gleiche UV-LED wie in Aufbau 3.1.1 verwendet. Die Reflexionssonde (180°-Anordnung) war mit einer zentralen Beleuchtungsfaser (Sendefaser) und sechs konzentrisch angeordneten Empfangsfasern ausgestattet. Das UV-Licht gelangte durch die Sendefaser zu den Zellen. Die sechs Empfangsfasern leiteten das emittierte Fluoreszenzlicht zu den sechs Detektoren, wobei jeder Detektor mit einer Empfangsfaser verbunden war. Anstelle der Detektion mittels CCD-Zeile wurde in diesem Sechskanalsensor die Fluoreszenzemission über optische Filter, die für jeweils einen definierten Wellenlängenbereich durchlässig waren, auf Photodetektoren geleitet. Außerdem besaß der Sensor im Gegensatz zum CCD-Spektrometer eine Fremdlichtunterdrückung, die durch Modulation der UV-LED-Lichtquelle und der Fluoreszenzemission erzielt wurde. Dadurch wurde in der Umgebung vorhandenes Licht, hervorgerufen durch z. B. Glühlampen oder Sonnenlicht, nicht mehr detektiert, sondern ausschließlich Fluoreszenzlicht.

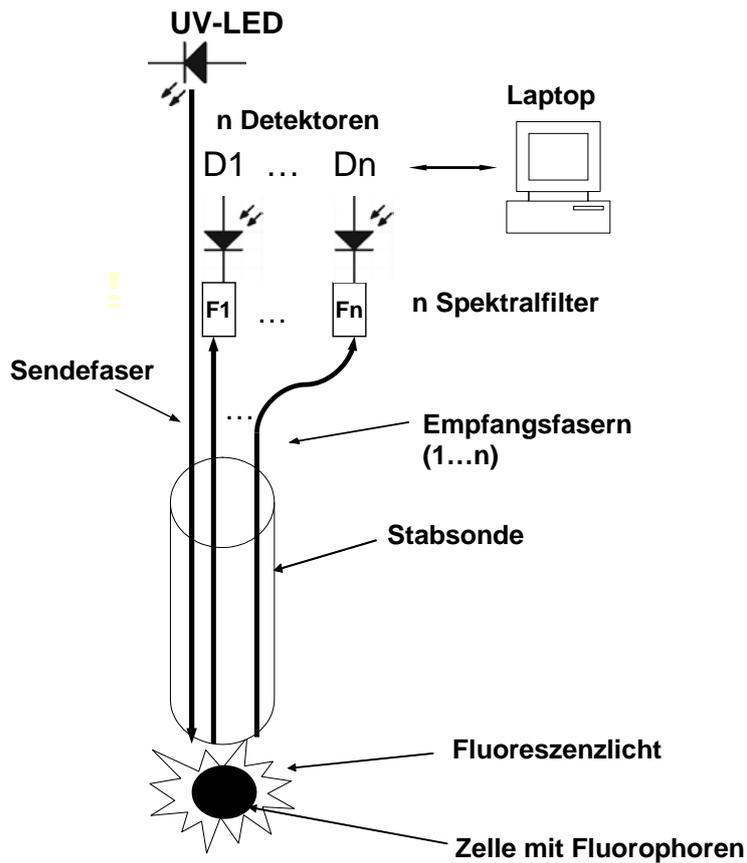


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau des Mehrkanal-Fluoreszenzensors mit Fremdlichtunterdrückung

Dieser Sechskanal-Fluoreszenzsensor stellte zusammen mit der UV-LED-Lichtquelle und Tauchsonde ein neu entwickeltes, kompaktes und kostengünstiges Fluoreszenzmesssystem dar (s. Abb. 3.3).

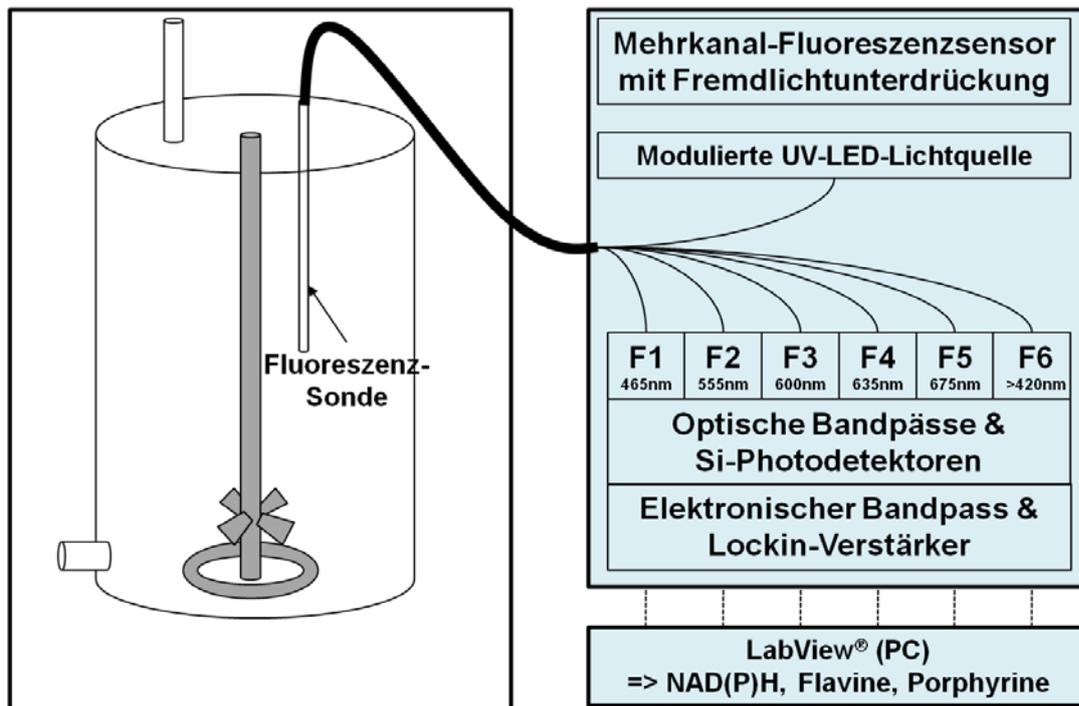


Abb. 3.3: Einbau des Fluoreszenzsensors mit Fremdlichtunterdrückung in den Bioreaktor und Prinzip der Messdatenerfassung

Die Zuordnungen der einzelnen Kanäle sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Die Angabe ± 15 nm bezeichnet die spektrale Bandbreite des optischen Filters. Damit bedeutet $465 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, dass der Filter einen Durchlassbereich von $450 - 480 \text{ nm}$ besitzt.

Tabelle 3.1: Kanalbelegung des Mehrkanal-Fluoreszenzsensors

| Filtername | Kanal | Funktion |
|------------|---|-----------------------|
| 465AF30 | F1 ($465 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$) | NAD(P)H-Fluoreszenz |
| 555AF70 | F2 ($555 \text{ nm} \pm 35 \text{ nm}$) | Flavin-Fluoreszenz |
| 600AF20 | F3 ($600 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) | Referenz 1 |
| 635AF30 | F4 ($635 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$) | Porphyrin-Fluoreszenz |
| 675BP30 | F5 ($675 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$) | Referenz 2 |
| GG420 | F6 ($>420 \text{ nm}$) | Gesamtfluoreszenz |

Die folgende Abbildung zeigt die Transmission der verwendeten optischen Filter im Vergleich zu den Fluoreszenzemissionsspektren der zu detektierenden Fluorophore NADH, FAD und Protoporphyrin IX (s. Abb. 3.4).

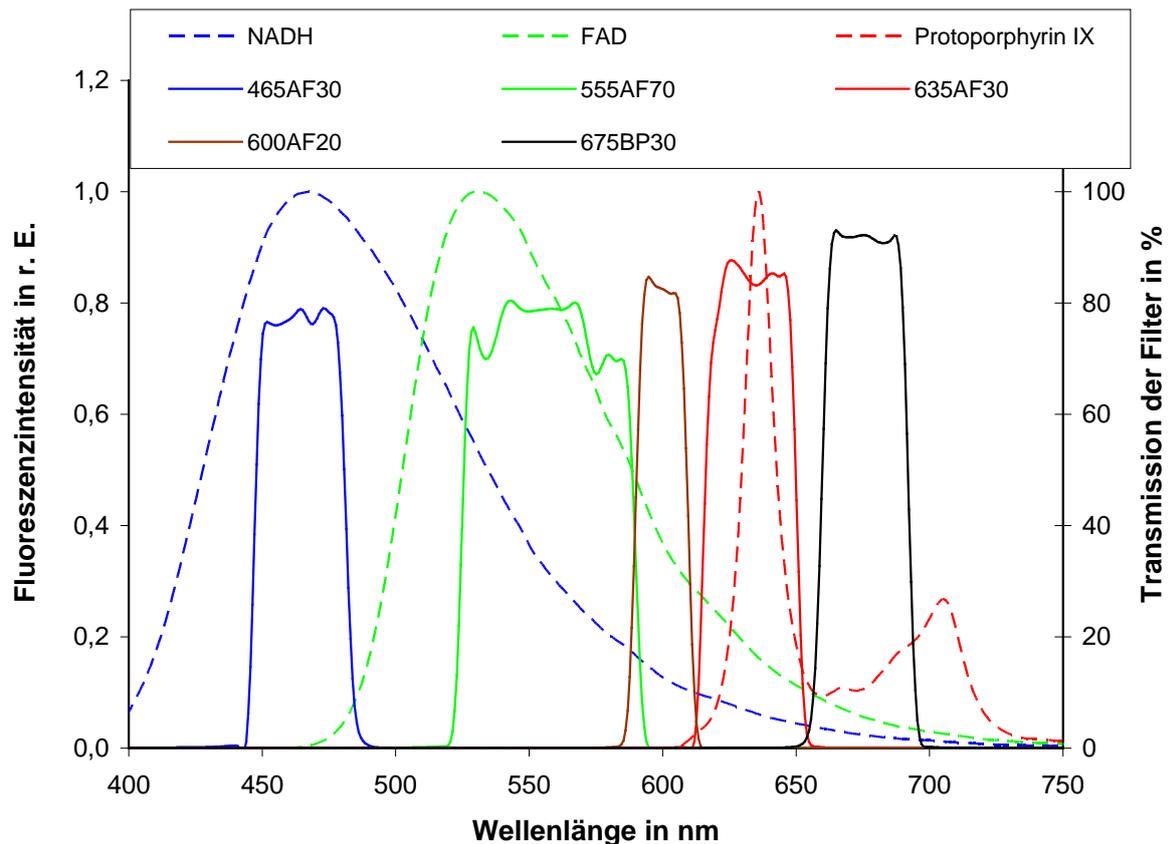


Abb. 3.4: Vergleich zwischen Fluoreszenzemissionsspektren und den zur Fluoreszenzdetektion verwendeten optischen Filtern

3.1.3 Absorptionsspektren und Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore

Um die Biofluorophore während der Kultivierung von Mikroorganismen identifizieren zu können, wurden mit dem in 3.1.1 beschriebenen Fluoreszenzmessaufbau Fluoreszenzemissionsspektren von NADH, FAD, Protoporphyrin IX, Coproporphyrin I, Coproporphyrin III, Uroporphyrin I, Uroporphyrin III, Zn-Protoporphyrin und Pyridoxin in verschiedenen Matrices aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden Phosphatpuffer pH 7,0, Phosphatpuffer pH 5,0, Backhefemedium pH 5,2, Ethanol und DMSO verwendet.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzemissionsspektren wurden auch Absorptionsspektren in diesen Matrices mit einem UV/VIS-Spektrometer (Cary 1, Varian, Palo Alto, USA) aufgenommen.

Der Phosphatpuffer pH 7,0 bestand aus 7,27 g/L Na_2HPO_4 und 3,52 g/L KH_2PO_4 . Für den Phosphatpuffer pH 5,0 wurden 0,11 g/L Na_2HPO_4 und 8,99 g/L KH_2PO_4 vermengt.

3.2 Bioreaktor

Zur Batch-Kultivierung von Mikroorganismen wurde ein Biostat M Bioreaktor (B. Braun, Melsungen) verwendet. Das Kulturgefäß hatte ein Volumen von 2 L und war mit einem Begasungsring sowie einem zweistufigen Scheibenrührer ausgestattet. Zur Durchführung und Steuerung der Kultivierung war der Biostat M herstellerseitig mit einem Pt 100 Temperaturmessfühler, Rührerdrehzahlmesser, Gasdurchflussmesser für die Begasungsrate, einer pH-Wert-Elektrode (405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo, Schweiz) mit pH-Regelung durch angeschlossenen Säure- und Alkali-Zulauf sowie einer Gelöstsauerstoff-Elektrode (322 756701, Ingold, Schweiz) instrumentiert.

Seitens des „Instituts für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme“ der Hochschule Mannheim wurden weitere Messgeräte für die Prozesskontrolle implementiert. Dazu gehören neben den beschriebenen Fluoreszenzmessaufbauten ein Rückstreumessaufbau zur online Bestimmung der Zelldichte, eine Abgasanalytik, bestehend aus einem amperometrischen Sauerstoffsensoren auf Zirkonoxid-Basis, sowie je einem photometrischen CO₂- und Ethanolensoren. Alternativ wurde zur Bestimmung der CO₂- und Ethanolkonzentration ein IR-Spektrometer eingesetzt. Die Geräte sind unter 3.3 näher beschrieben.

Die erhaltenen Messdaten, außer Fluoreszenzmessung und Abgasanalytik mittels IR-Spektrometer, wurden fortlaufend mit der Software LabVIEW (Version 7.0, National Instruments) aufgezeichnet. Die dafür notwendige Programmerstellung erfolgte ebenfalls am „Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme“ der Hochschule Mannheim. Einen Überblick über die Messtechnik am Bioreaktor liefert Abb. 3.5.

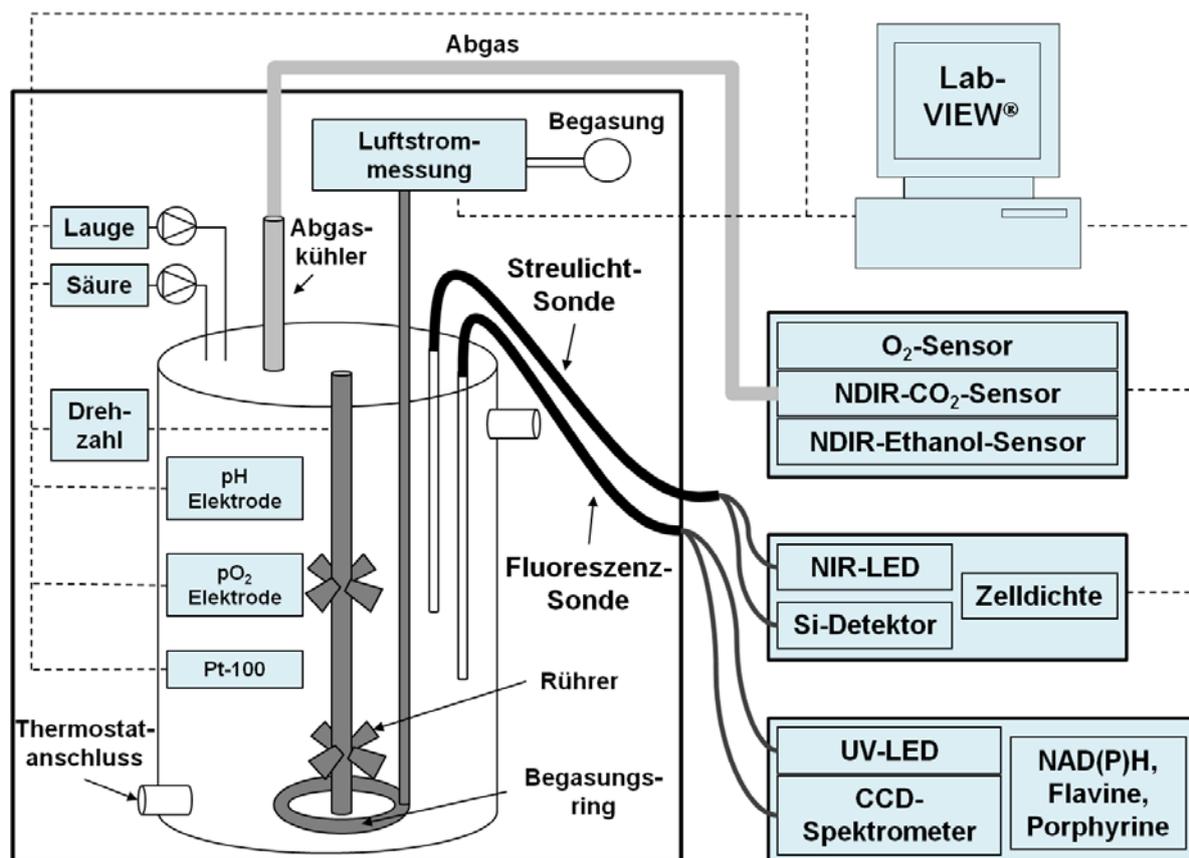


Abb. 3.5: Messtechnik am Bioreaktor

3.3 Fermentationsanalytik

3.3.1 Abgasanalytik

Das Abgas wurde, nachdem es den Abgaskühler passiert hatte, quantitativ über eine Schlauchverbindung in ein Infrarot-Spektrometer (IR-Spektrometer) überführt. Daran schloss sich noch ein Sauerstoffsensor an. Alternativ passierte das Abgas anstelle des IR-Spektrometers einen CO₂- sowie einen Ethanol-Sensor.

3.3.1.1 CO₂-Messung

Zur online Bestimmung der CO₂-Konzentration im Abgas wurde ein IR-Spektrometer (Equinox 55, Bruker, Ettlingen) verwendet. Nach Kalibration mit Prüfgasen konnte über die Auswertung der IR-Extinktion im Absorptionsmaximum bei 2360 cm⁻¹ bzw. der Fläche zwischen 2380 und 2310 cm⁻¹ die CO₂-Konzentration erhalten werden. Die Auswertung erfolgte mit der gerätezugehörigen Software Opus (Version 2.04). Anstelle des IR-Spektrometers wurde teilweise ein photometrischer CO₂-Sensor (nicht-dispersive IR-Absorption; BlueSens, Herten) verwendet.

3.3.1.2 Sauerstoff-Messung

Zusätzlich zur CO₂-Messung im Abgas befand sich ein Sauerstoffsensor (SO-D0-250-A087A, Unitronic, Düsseldorf), der die Sauerstoffkonzentration im Abgas ermittelt. Aus diesen beiden Werten konnte der Respiratorische Quotient (RQ) berechnet werden.

3.3.1.3 Ethanol-Messung

Um das von der Hefe gebildete Ethanol ebenfalls online erfassen zu können, wurde ein Ethanolsensor (BlueSens, Herten) in den Abgasstrom montiert. Aus der dort gemessenen Konzentration konnte durch einen Kalibrierungsfaktor direkt auf die Ethanolkonzentration in der Flüssigphase geschlossen werden. Alternativ konnte die Ethanolkonzentration im Abgas durch Auswertung der Fläche zwischen 3000 und 2860 cm⁻¹ unter Verwendung des IR-Spektrometers bestimmt werden (s. Abb. 3.6).

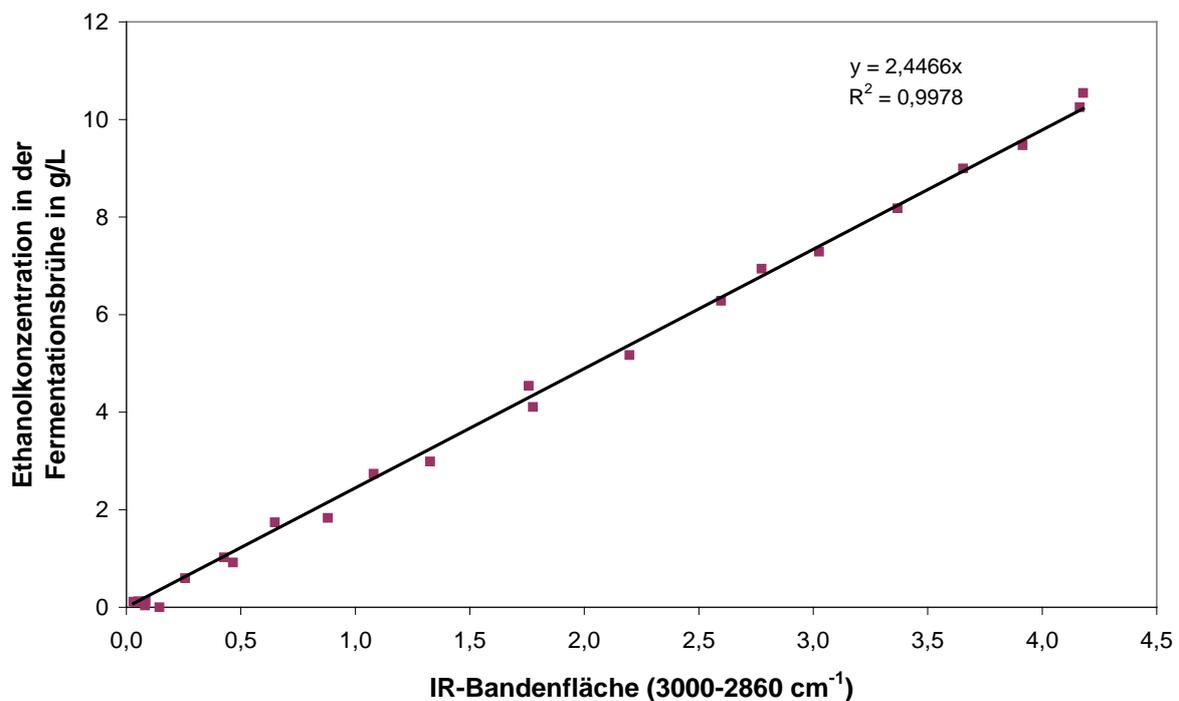


Abb. 3.6: Korrelation von IR-Bandenfläche (Ethanol im Abgas) und Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe, ermittelt durch HPLC

3.3.2 Zelldichtebestimmung

Die Zelldichte wurde auf zwei Arten ermittelt, zum einen online durch Streulichtmessung, zum anderen mittels Neubauer-Zählkammer als Referenzmethode.

3.3.2.1 Streulicht

Zur online Bestimmung der Zelldichte wurde ein am „Institut für Prozessmesstechnik und innovative Energiesysteme“ der Hochschule Mannheim entwickelter Streulichtsensor verwendet (siehe Abb. 3.7). Dieser war ähnlich aufgebaut wie die faseroptische Fluoreszenzmessung. Als Lichtquelle diente hier eine Nahinfrarot-LED (NIR-LED) mit einer Emissionswellenlänge von 830 nm. Dieses Licht gelangte über eine Sendefaser, die sich in einer Tauchsonde befand, in die Fermentationsbrühe. Dort vorhandene Zellen, z. B. Hefezellen, streuten das Licht zurück. Das rückgestreute Licht wurde von einer Empfangsfaser zum Photodetektor (Si-Photodiode) geleitet.

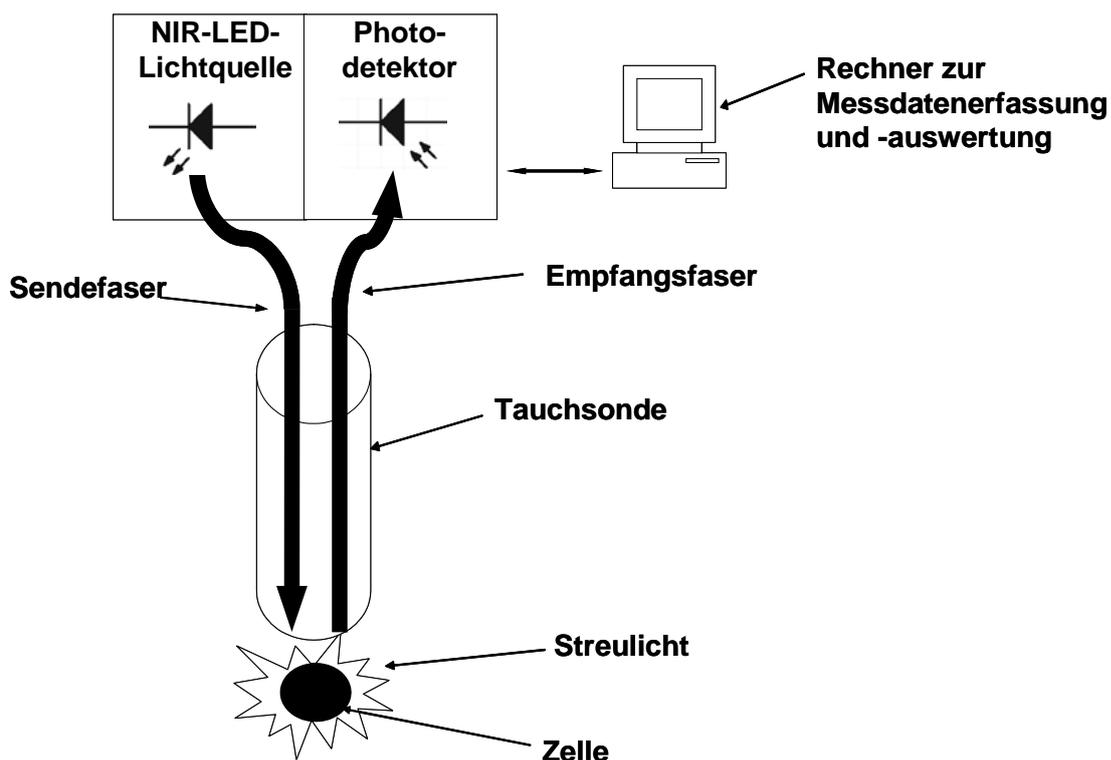


Abb. 3.7: Streulichtmessaufbau

Das von den Zellen gestreute Licht war proportional zur Zelldichte. Der lineare Zusammenhang ist in Abb. 3.8 gezeigt. Die Kalibriergerade wurde anhand wässriger Backhefesuspensionen erstellt.

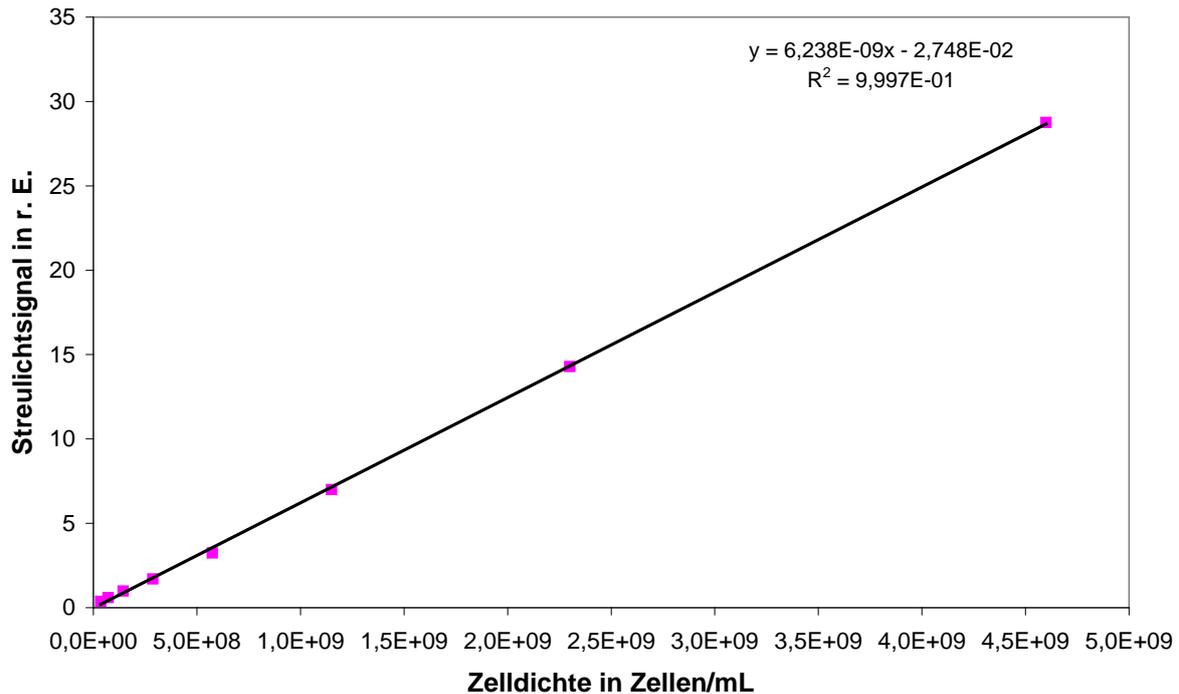


Abb. 3.8: Korrelation von Streulichtintensität und Zelldichte

3.3.2.2 Neubauer-Zählkammer

Zusätzlich zu der online Streulichtmessung wurde die Zelldichte offline mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden während der Kultivierung in bestimmten Zeitabständen Proben der Zellsuspension genommen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden in der oberen und unteren Kammer jeweils zehn Großquadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert pro Großquadrat sowie die Standardabweichung bestimmt. Aus dem erhaltenen Mittelwert \bar{x} wurde unter Berücksichtigung des Kammervolumens die Zellzahl/mL erhalten. Die Tiefe der Zählkammer betrug 0,02 mm, die Fläche eines Kleinquadrates 0,0025 mm². Da ein Großquadrat aus 16 Kleinquadraten bestand, war das Volumen eines Großquadrates mit $8 \cdot 10^{-7}$ mL gegeben.

$$\text{Zelldichte} = \frac{\bar{x}}{8 \cdot 10^{-7} \text{ mL}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.3.3 Bestimmung der Substrat- und Produktverläufe

Mittels HPLC konnten die Substrat- und Produktverläufe während der Kultivierung offline verfolgt werden. Die HPLC-Einheit (880-PU, Jasco, Japan) bestand aus einer 20 μ L Probenschleife und einer Ionenaustauschersäule (AT 300-6.5 Polysphere[®] OA HY Säule,

Merck, Darmstadt) mit nachfolgendem Refraktometer (Differential-Refractometer, Knauer, Hamburg). Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mit einem angeschlossenen Schreiber (HP 3394A Integrator, Hewlett Packard, USA). Als Laufmittel wurde Schwefelsäure (0,005 mol/L) verwendet, die Durchflussrate betrug 0,5 mL/min.

Zur Kalibrierung der HPLC wurden Standards von Saccharose, Glucose, Fructose, Maltose, Glycerin und Ethanol (Hefe) bzw. Lactose, Glucose, Galactose, Acetat, Lactat, Ethanol, Formiat und Succinat (*E. coli*) hergestellt. Aus den daraus ermittelten Retentionszeiten und Flächen konnten die Konzentrationen dieser Substanzen während der Kultivierung bestimmt werden. Die Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur für Hefe bzw. bei 80°C für *E. coli*. Die Chromatogramme der detektierten Substrate und Produkte während der Kultivierungen sind den folgenden Abbildungen zu entnehmen (s. Abb. 3.9, Abb. 3.10, Abb. 3.11). Die Kalibrationsgeraden der Standards befinden sich im Anhang.

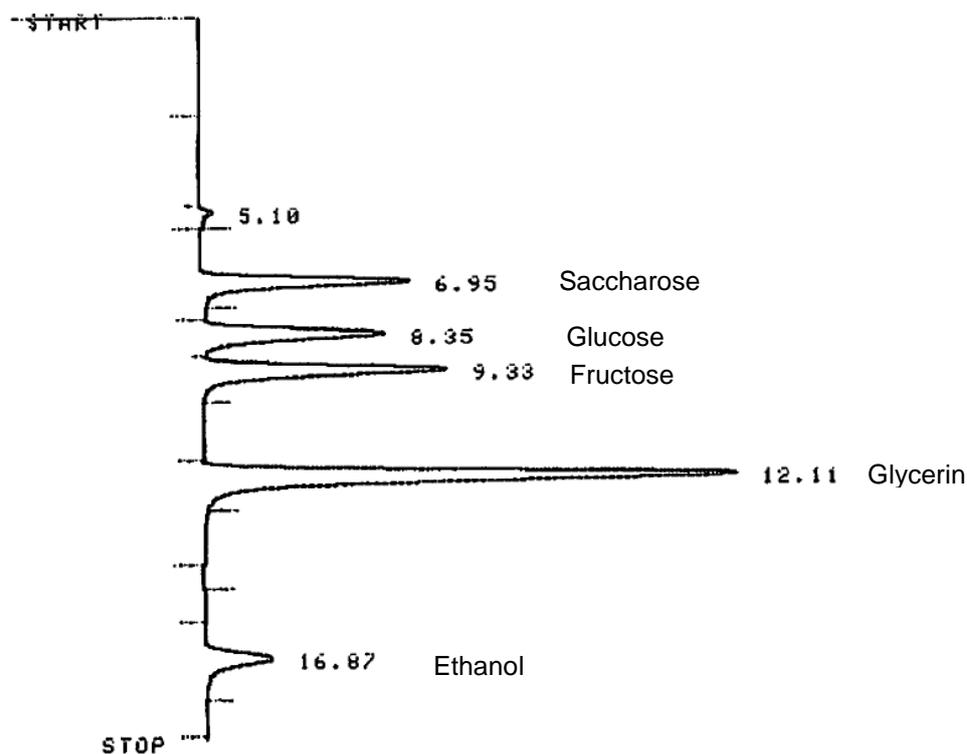


Abb. 3.9: Chromatogramm der Substrate und Produkte während der Backhefekultivierung

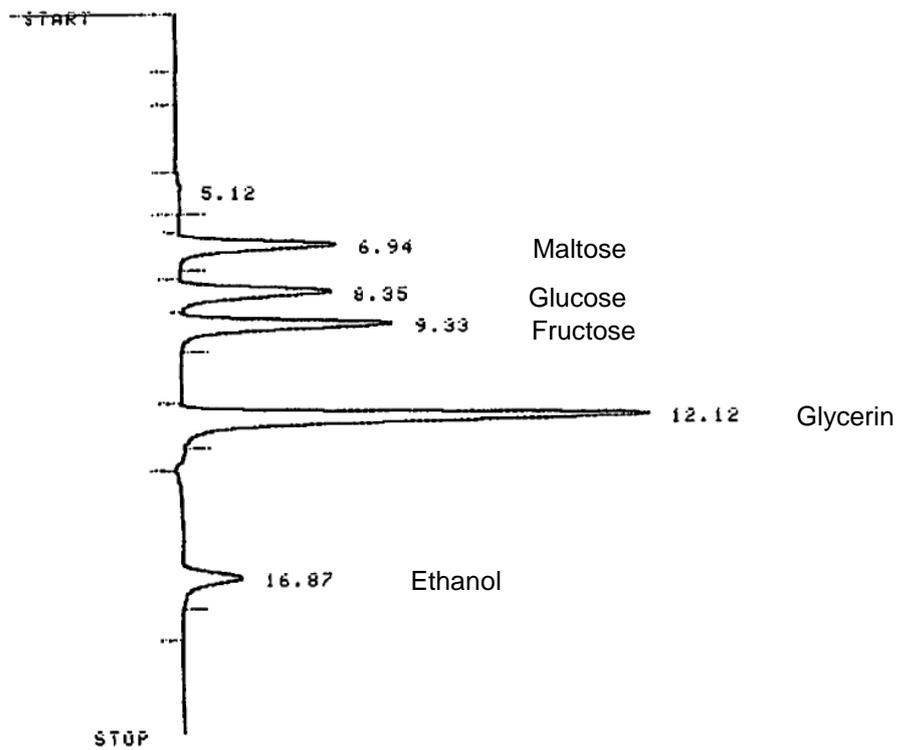


Abb. 3.10: Chromatogramm der Substrate und Produkte während der Bierhefekultivierung

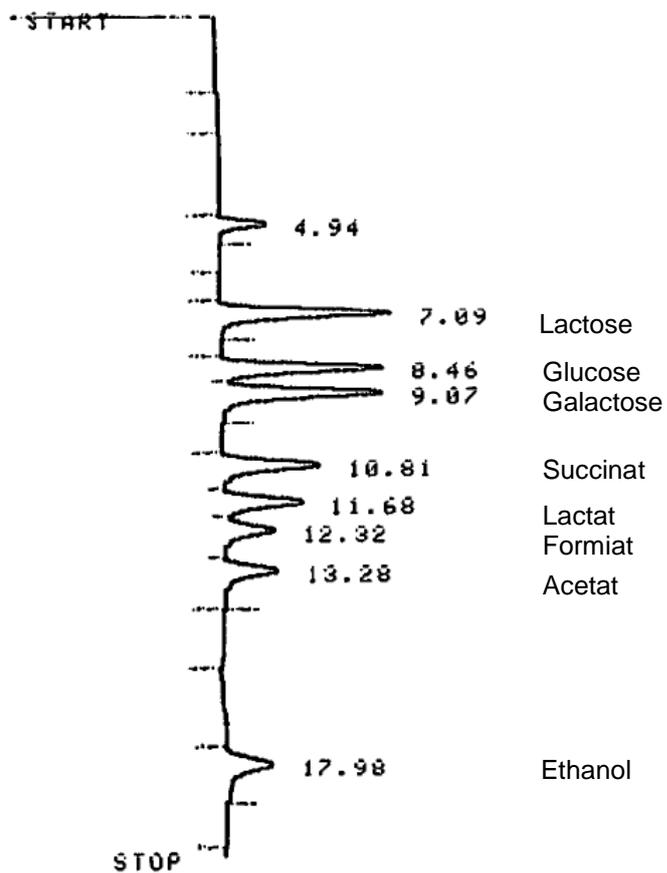


Abb. 3.11: Chromatogramm der Substrate und Produkte während der *E. coli* - Kultivierung

Probenvorbereitung

Die während der Kultivierung stündlich gezogenen Proben wurden direkt nach Probennahme bei -20°C gelagert. Um sie für die HPLC zu verwenden, wurden sie nach dem Auftauen bei 4°C und 13200 rpm 5 min lang zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand mit einem Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert (0,2 µm Celluloseacetat-Membran, VWR, Bruchsal).

3.3.4 Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung der Fluorophore bei Kultivierungen

Zusätzlich zur Fluoreszenzmessung in der Zellsuspension während der Kultivierung wurden auch Messungen an der von Zellen separierten Fermentationsbrühe sowie den Zellen durchgeführt. Dies hatte zum Ziel, die intra- und extrazelluläre Verteilung der Fluorophore zu bestimmen. Dafür wurden bei einigen Kultivierungen zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer 50 mL Spritze Proben entnommen und bei 4°C und 4000 rpm 5 min zentrifugiert (Rotanta/RP, Hettich, Schweiz). Nach Abtrennung des Überstandes, das heißt der Fermentationsbrühe, wurde das Zellpellet in NaCl-Lösung (0,9 %) auf das ursprüngliche Probenvolumen resuspendiert. Konnten die Proben nicht direkt im Anschluss vermessen werden, wurden sie bis zu 16 h bei 4°C gelagert. Zur Ermittlung der Fluorophorverteilung von NAD(P)H, Flavinen und Porphyrinen wurden die gemessenen Intensitäten des Zellpellets sowie des Überstandes so addiert, dass näherungsweise die Intensität der Kulturfluoreszenz erhalten wurde.

$$x(\text{Pelletfluoreszenz}) + y(\text{Überstandsfluoreszenz}) \approx \text{Suspensionsfluoreszenz}$$

Hierbei musste die unterschiedliche Eindringtiefe des Anregungslichtes berücksichtigt werden. Messungen in Backhefesuspensionen zeigten, dass mit abnehmender Zelldichte bzw. Biotrockenmasse das Fluoreszenzsignal relativ zunahm. Ursächlich hierfür war ein relativer Schichtdickenzuwachs vor der Sonde, das heißt eine höhere Eindringtiefe des UV-Lichts. So war die Eindringtiefe im zellfreien Überstand bei 469 nm etwa um den Faktor zwei größer als in der Zellsuspension (s. Abb. 3.12). Daher wurden die Fluoreszenzintensitäten des Zellpellets und des Überstandes jeweils mit einem Faktor x bzw. y versehen, der so gewählt wurde, dass die Abweichung der gebildeten Summe aus Pellet- und Überstandfluoreszenzintensität zur ursprünglichen Kulturfluoreszenzintensität minimal wurde.

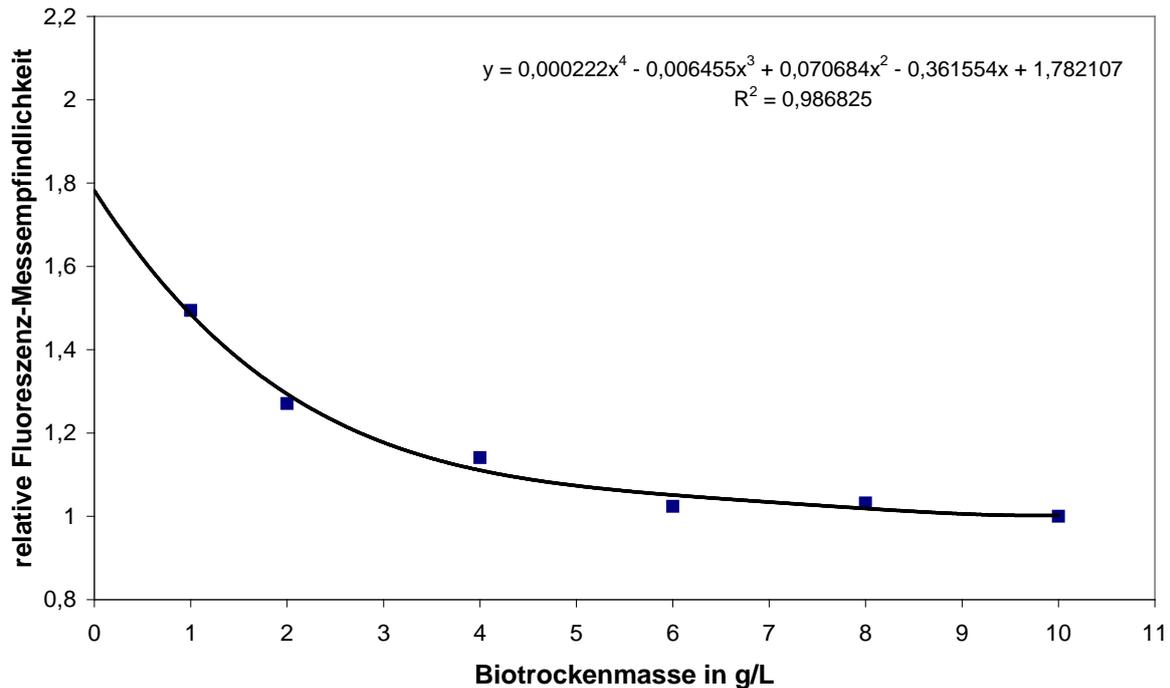


Abb. 3.12: Relative Fluoreszenz-Messempfindlichkeit bei 469 nm in Abhängigkeit von der Biotrockenmasse

3.4 Kultivierung von Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden kultiviert:

| | |
|-----------------------|--|
| Backhefe | Vital-Gold (Deutsche Hefewerke, Nürnberg) Uniform Frischbackhefe (Uniform, Werne) Wieninger Hefe (Wieninger, Passau) |
| Bierhefe | Saflager W-34/70 (untergärige Trockenhefe, Fermentis, Marcq-en-Baroeul cedex) Rh Frischhefe (VLB, Berlin) |
| Brennereihefe | Ethanol Red™ (Trockenhefe, Fermentis, Marcq-en-Baroeul cedex) |
| <i>E. coli</i> | DSM 613 |

Der Trockensubstanzgehalt der Frischhefe betrug bei Deutsche Hefewerke (DHW) 28 % bzw. 30 % bei Uniform; für Wieninger wurden 31 % ermittelt.

3.4.1 Versuchsbedingungen

Wichtig für die Durchführung der Fluoreszenzmessungen war die Verwendung nicht fluoreszierender Medien. Als Basis diente ein Medium, das im „Institut für Mikrobiologie“ der Hochschule Mannheim entwickelt wurde. Daneben war die Mineralsalzzusammensetzung für die Backhefe propagation an Schatzmann angelehnt (Schatzmann, 1975). Bier- und

Brennereihefe wurden in einem würzeähnlichen synthetischen Medium kultiviert. Auch das Medium für die Anzucht von *E. coli*, das ebenfalls im „Institut für Mikrobiologie“ der Hochschule Mannheim entwickelt wurde, zeigte keine Fluoreszenz. Zur Begasung wurde, soweit nicht anders erwähnt, Druckluft verwendet.

3.4.1.1 Batch-Kultivierung von Backhefe

Alle Substanzen (s. Tabelle 3.2) außer Saccharose wurden in 1,7 L VE-Wasser gelöst. Anschließend wurden 100 mL des Mediums entnommen und die Backhefe (1,5 g/L bzw. 10 g/L) in diesem Aliquot suspendiert. In dem restlichen Medium wurde die Saccharose gelöst. Nach Temperierung auf 32°C im Bioreaktor und Einstellen des pH-Wertes auf 5,2 wurde mit der Backhefesuspension angeimpft. Während der Kultivierung wurde der pH-Wert mit Natronlauge (5 mol/L) und Salzsäure (1 mol/L) geregelt. Die Begasungsrate betrug 1 vvm und die Rührerdrehzahl 1000 rpm.

Tabelle 3.2: Medium für Backhefe (Batch-Kultivierung)

| Komponente | Konzentration |
|---|---------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 16,0 g/L |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 1,15 g/L |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ | 1,25 g/L |
| KCl | 5,0 g/L |
| Calcium-D(+)-pantothenat | 10,0 mg/L |
| myo-Inosit | 105,0 mg/L |
| D(+)-Biotin | 1,0 mg/L |
| $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 420,0 mg/L |
| $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 15,3 mg/L |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 8,8 mg/L |
| $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 10,5 mg/L |
| $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ | 2,4 mg/L |
| Polypropylenglykol | 1,0 mL/L |
| D(+)-Saccharose | 30,0 g/L |

3.4.1.2 Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe

Die Hochzelldichtekultivierung von Backhefe mittels Fed-Batch wurde in Zusammenarbeit mit der Versuchsanstalt der Hefeindustrie in Berlin durchgeführt. Auch hier wurde ein synthetisches, nicht fluoreszierendes Medium verwendet, das von der Versuchsanstalt der Hefeindustrie entwickelt wurde. Die genaue Zusammensetzung des Mediums unterliegt der Geheimhaltung. Als Kohlenstoffquelle wurde Saccharose kontinuierlich so zudosiert, dass

die Ethanolkonzentration unter 0,3 Vol% lag. Damit wurde sichergestellt, dass hohe Zelldichten von bis zu $2 \cdot 10^9$ Zellen/mL erreicht werden konnten. Während der Kultivierung wurde bei Bedarf über eine Antischaumsonde Antischaummittel (Struktol J 673, Schill+Seilacher, Hamburg) in Dosen von 0,02 mL zugegeben. Dies war insbesondere während der exponentiellen Wachstumsphase im Zeitraum 9 - 13 h der Fall. Der Reaktor hatte ein Volumen von 30 L. Das Startvolumen lag bei 9 L, nach Zugabe der Saccharoselösung waren zum Ende der Hochzelldichtekultivierung ca. 13 L Hefesuspension vorhanden. Die Begasungsrate betrug 1,2 vvm und wurde mit einem Inferator (Escher-Wyss, Ravensbrück) durchgeführt. Die Steuerung der Saccharosezugabe erfolgte mittels SPS (Biotechnologie Kempe, Kleinmachnow, Version 8 Rel. 9.5).

3.4.1.3 Batch-Kultivierung von Bier- bzw. Brennereihefe

Es wurden alle Substanzen (siehe Tabelle 3.3) in 1,7 L VE-Wasser gelöst. Die Trockenhefe wurde vor dem Animpfen in einer Konzentration von 1 g/L (W-34/70) bzw. 0,5 g/L (Ethanol Red™) – dies entspricht jeweils ca. 10^7 Zellen/mL – in 10 mL VE-Wasser 15 Minuten quellen gelassen. Die Frischhefe Rh wurde mit NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen, bis sie frei von Würze war (farbloser Überstand). Die Animpfkonzentration betrug ca. 5,5 g/L, dies entsprach einer Zelldichte von etwa 10^7 Zellen/mL. Die Kultivierung (aerobe Gärung oder Gärung) wurde bei 20°C oder 23°C durchgeführt. Der pH-Wert wurde zu Beginn mit Natronlauge (5 mol/L) auf 5,3 eingestellt und musste durch die puffernde Wirkung der zugesetzten Aminosäuren nicht geregelt werden. Die Begasungsrate betrug 1 vvm und die Rührerdrehzahl 1000 rpm. Während der Gärung wurde mit Stickstoff 5.0 begast (0,3 vvm) und mit 200 rpm gerührt, um ein Absetzen der Hefe zu verhindern.

Tabelle 3.3: Medium für Bier- und Brennereihefe (Batch-Kultivierung)

| Komponente | Konzentration |
|--|----------------------|
| Maltose-Monohydrat | 62,1 g/L |
| D(-)-Fructose | 3,0 g/L |
| D(+)-Glucose-Monohydrat | 13,2 g/L |
| D(+)-Saccharose | 4,0 g/L |
| L-Glutaminsäure | 1,2 g/L |
| L-Asparaginsäure | 1,5 g/L |
| DL-Methionin | 30,0 mg/L |
| L-Histidin | 10,0 mg/L |
| KCl | 5,0 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 1,65 g/L |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 420,0 mg/L |
| FeCl ₃ x 6 H ₂ O | 15,0 mg/L |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 2,4 mg/L |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 1,15 g/L |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 10,5 mg/L |
| NaCl | 76,3 mg/L |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 9,0 mg/L |
| Calcium-D(+)-pantothenat | 10,0 mg/L |
| D(+)-Biotin | 1,0 mg/L |
| myo-Inosit | 105,0 mg/L |
| Polypropylenglykol | 1,0 mL/L |

3.4.1.4 Batch-Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Batch-Kultivierung von *E. coli* wurde ein Medium, das als Kohlenstoffquellen Glucose und Lactose enthielt, verwendet (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Mineralmedium für *E. coli*

| Komponente | Konzentration |
|---|---------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 12,0 g/L |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g/L |
| KH_2PO_4 | 2,0 g/L |
| K_2SO_4 | 0,1 g/L |
| $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,1 g/L |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 50,0 mg/L |
| DL-Methionin | 50,0 mg/L |
| Polypropylenglykol | 1,0 mL/L |
| D(+)-Glucose | 10,0 g/L |
| Lactose | 20,0 g/L |
| Spurenelementlösung | 1,0 mL/L |

Die Spurenelementlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 3.5: Spurenelementlösung für *E. coli*

| Komponente | Konzentration |
|--|---------------|
| $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 40,0 mg/L |
| $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 16,0 mg/L |
| $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ | 4,0 mg/L |
| $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 4,0 mg/L |
| H_3BO_3 | 2,0 mg/L |
| KI | 40,0 mg/L |
| $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 40,0 mg/L |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 8,0 mg/L |
| $\text{NiSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 1,8 mg/L |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 8,0 mg/L |
| mit H_2SO_4 pH-Wert auf 1 stellen | |

Zunächst wurde eine Vorkultur von *E. coli* hergestellt, die im Schikanekolben über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubiert wurde. Diese enthielt im Gegensatz zum Mineralmedium nur Glucose, aber keine Lactose (s. Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Vorkulturmedium für *E. coli*

| Komponente | Konzentration |
|---|---------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 12,0 g/L |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g/L |
| KH_2PO_4 | 2,0 g/L |
| K_2SO_4 | 0,1 g/L |
| $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,1 g/L |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 50,0 mg/L |
| DL-Methionin | 50,0 mg/L |
| Fleischextrakt | 3,0 g/L |
| Fleischpepton | 5,0 g/L |
| D(+)-Glucose | 10,0 g/L |
| Spurenelementlösung | 1,0 mL/L |

Nach Temperierung des Mineralmediums (1,6 L) auf 37°C im Bioreaktor und Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 wurde mit der Vorkultur (100 mL) angeimpft. Während der Kultivierung wurde der pH-Wert mit Natronlauge (5 mol/L) und Salzsäure (1 mol/L) geregelt. Die Begasungsrate betrug 1 vvm und die Rührerdrehzahl 1000 rpm.

3.5 Untersuchungen an Bierwürze

Die Fluoreszenzmessungen an Bierwürze wurden in Zusammenarbeit mit der fermtec GmbH durchgeführt. Hierfür wurde eine Pilswürze hergestellt. Es wurden 10 kg Pilsner Malz bei 1 mm Spaltbreite geschrotet. Die Maischeherstellung wurde nach dem Infusionsverfahren durchgeführt. Es erfolgte ein Hauptguss von 38 L. Das Einmaischen fand bei 55°C statt, gefolgt von einer 15-minütigen Rast. Anschließend wurde auf 62°C aufgeheizt und zur Maltosebildung eine Rast von 30 min eingelegt. Danach erfolgte weiteres Aufheizen auf 72°C mit 20 min Rast zur Verzuckerung. Abschließend wurde die Verzuckerung kontrolliert und bei 76°C abgemaischt. Beim Läutern wurde 10 min lang Trübwürze im Kreis gepumpt; die Läuterdauer der Vorderwürze betrug 30 min. Anschließend erfolgten zehn Nachgüsse á 5 L bei 76°C. Der Zeitabstand zwischen zwei Nachgüssen betrug 7 min. Danach wurde die Würze 90 min lang in der Würzepfanne gekocht. Der Hopfen wurde bei Kochbeginn dazugegeben. Dabei handelte es sich um die Sorte „Hallertauer Magnum“ mit 16,4 % α -Säure.

Es wurden nach dem Einmaischen sowie vor und nach dem Würzekochen Proben genommen. Diese Proben wurden fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Außerdem wurden verschiedene Gerstensorten (Tipple, Vanessa) mit einer Handmühle (Bühler Universal) geschrotet und in Wasser im Verhältnis 1:4 (v/v) eingeweicht. Nach einer Stunde

wurde die Maische über einen Faltenfilter abfiltriert (10311851, Whatman, Großbritannien) und die Fluoreszenz des Filtrats bestimmt.

Des Weiteren wurden Maillardprodukte mit dem für Bierhefe entwickelten Medium hergestellt (s. Tabelle 3.3). Dafür wurden alle Medienbestandteile außer Zuckern und Aminosäuren eingesetzt, der pH-Wert mit Natronlauge auf 5,6 eingestellt und mit 10 g/L Lysin sowie 10 g/L Glucose versetzt. Das Medium wurde 90 min lang gekocht und anschließend die Fluoreszenz gemessen. Zu den Kontrollen wurde jeweils nur Lysin oder nur Glucose zugegeben

3.6 Versuche zur Lagerstabilität von Backhefe

Die Versuche zur Lagerstabilität von Backhefe wurden in Zusammenarbeit mit der Versuchsanstalt der Hefeindustrie durchgeführt. Hierzu wurden Backhefewürfel bei verschiedenen Temperaturen (4°C, 35°C und 50°C) gelagert und zu bestimmten Zeitpunkten die Fluoreszenz der Hefewürfel gemessen. Es wurden die gleichen Backhefestämme wie für die Kultivierungen verwendet. Zusätzlich zur Fluoreszenz wurde die Plastizität der Hefe gemessen (Texture Analyser TA.XTplus, Stable Microsystems, Großbritannien). Die Textur wurde durch die Aufnahme von Kraftwerten während der Penetration eines Würfels durch einen Stempel mit einer Grundfläche von 2 mm² abgebildet. Die Eindringgeschwindigkeit des Stempels betrug 1 mm/s. Nach einer Messtiefe von 10 mm drehte sich die Messrichtung um und der Stempel wurde aus der Hefe gezogen. Bei Rückfahrt des Stempels zur Ausgangsposition erfolgte eine weitere Messung der Schubkraft. Die Plastizitätsmessungen wurden mit der geräteeigenen Software Texture Exponent (TEE 32) aufgezeichnet und ausgewertet. Es wurden jeweils drei Messungen pro Hefewürfel durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt.

3.7 Verwendete Chemikalien

Die für die Kultivierungen und HPLC-Analysen eingesetzten Chemikalien besaßen die jeweils höchste verfügbare Reinheit (s. Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Herstellerinformation |
|---|----------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | AppliChem A3598 |
| $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck 1.01084 |
| Aminolävulinsäure-Butylester | Innochemie EALA004G1 |
| Bernsteinsäure | Merck 1.00682 |
| BSA | Fluka 05479 |
| $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck 1.02382 |
| Calcium-D(+)-pantothenat | Alfa Aesar A16609 |
| Calcium-L-Lactat | Fluka 21185 |
| $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck 1.02539 |
| Coproporphyrin III-Dihydrochlorid | Frontier Scientific C654-3 |
| Coproporphyrin I-Dihydrochlorid | Frontier Scientific C654-1 |
| $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck 1.02733 |
| $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck 1.02790 |
| D(-)-Fructose | Merck 1.04007 |
| D(+)-Biotin | AppliChem A0969 |
| D(+)-Galactose | Fluka 48260 |
| D(+)-Glucose-Monohydrat | AppliChem A1349 |
| D(+)-Saccharose | Merck 1.07687 |
| DL-Methionin | Fluka 64340 |
| DMSO | Merck 1.02952 |
| Ethanol | Merck 1.00983 |
| FAD-Dinatriumsalz | Sigma Aldrich F-6625 |
| $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ | Alfa Aesar A16231 |
| Ferulasäure | Fluka 46280 |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck 1.03963 |
| Fleischextrakt | Bernd Euler 19022 |
| Fleischpepton | Bernd Euler 19518 |
| Glycerin | AppliChem A3552 |
| H_3BO_3 | Merck 1.00165 |
| K_2SO_4 | Merck 1.05153 |
| KCl | AppliChem A3582 |
| $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ | Fluka 60152 |
| KH_2PO_4 | Merck 1.04873 |
| KI | Merck 1.05043 |
| Lactose $\times \text{H}_2\text{O}$ | Roth 6868 |
| L-Asparaginsäure | Merck 1.00126 |

| Chemikalie | Herstellerinformation |
|---|-----------------------------|
| L-Glutaminsäure | Merck 1.00291 |
| L-Histidin | Merck 1.04351 |
| Maltose-Monohydrat | AppliChem A3891 |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | Merck 1.05886 |
| MnSO ₄ x H ₂ O | Merck 1.05941 |
| myo-Inosit | Merck 1.04507 |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | Merck 1.06580 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | Fluka 71756 |
| NaCl | Riedel - de Haën 31434 |
| NADH-Dinatriumsalz | Calbiochem 481913 |
| Natriumacetat | AppliChem A1522 |
| Natriumformiat | Merck 1.06443 |
| Natriumhydroxid-Plätzchen | Merck 1.06498 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | Merck 1.01126 |
| NiSO ₄ x 6 H ₂ O | Merck 1.06727 |
| PBS | PAA Laboratories H15-002 |
| Polypropylenglykol | Alfa Aesar L14699 |
| Proteinase K | Merck 1.24568 |
| Protoporphyrin IX | Sigma Aldrich 258385 |
| PVPP | Merck 1.07302 |
| Pyridoxin | Sigma Aldrich P-5669 |
| Salzsäure | Fluka 84422 |
| Schwefelsäure | Merck 1.00731 |
| Uroporphyrin I-Dihydrochlorid | Frontier Scientific U830-1 |
| Uroporphyrin III-Dihydrochlorid | Frontier Scientific U830-3 |
| Zn-Protoporphyrin IX | Frontier Scientific Zn625-9 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | Merck 1.08883 |

3.8 Patienten mit Aktinischer Keratose

Bei den Patienten handelte es sich um zwei männliche Probanden im Alter zwischen 65 und 80 Jahren. Beide befanden sich wegen ausgeprägter Aktinischer Keratose in Behandlung am Klinikum Mannheim und erklärten sich mit den Fluoreszenzmessungen einverstanden. Betroffene Körperstellen waren Kopf (Schläfe, Stirn) und Handrücken. Zur Photodynamischen Therapie wurden diese Regionen mit Metvix[®] (1 g enthält 160 mg Methyl (5-amino-4-oxopentanoat) als Hydrochlorid; entspricht methyl-ALA) eingecremt und lichtdicht verbunden (Okklusionsverband). Drei Stunden nach dem Auftragen der Creme begann die ca. siebenminütige Bestrahlung mit der Aktilite[®]-Lichtquelle (Wellenlänge 630 nm; Leistung 37 J/cm²).

Die Fluoreszenzmessungen fanden vor dem Auftragen der Creme zur Bestimmung der endogenen Fluoreszenz, direkt nach dem Eincremen (0 h), sowie nach ein, zwei und drei Stunden Einwirkzeit statt. Dies wurde gemacht, um den Aufbau des Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PPIX) zu verfolgen. Zusätzlich wurde während der Bestrahlung der Abbau des Protoporphyrin IX fluoreszenzspektroskopisch erfasst.

3.9 Mäuse mit implantierten Glioblastomzellen

Nacktmäusen wurde ein Tumor der Zelllinie SF126 (humanes Glioblastom) in eine Rückenhautkammer implantiert (s. Abb. 3.13). Des Weiteren wurden Mäuse mit Rückenhautkammer ohne Tumor als Kontrollen verwendet. Die Messungen fanden acht Tage nach der Tumorimplantation statt. Die Präparation der Mäuse und Fluoreszenzmessungen fanden am Klinikum Mannheim statt.

Zur Anreicherung des Protoporphyrin IX in tumorösem Gewebe wurden 100 μ L einer 3,3%igen butyl-ALA-Lösung als Präkursor in sterilem PBS der Maus in die Schwanzvene appliziert. Dies entsprach einer Konzentration von ca. 100 mg ALA/kg Körpergewicht. Um den zeitlichen Auf- und Abbau des daraus gebildeten Fluorophors Protoporphyrin IX verfolgen zu können, wurden zu Beginn der Applikation sowie nach einer, zwei und drei Stunden Messungen am Tumor bzw. tumorfreien Gewebe in der Rückenhautkammer durchgeführt (s. Abb. 3.14). Zusätzlich wurden Messungen vor der Gabe des butyl-ALA durchgeführt, um Hinweise auf eine evtl. schon bestehende endogene PPIX-Fluoreszenz zu erhalten. Zwischen den Messungen wurden die Mäuse im Dunkeln gehalten, da sich das Protoporphyrin IX bei Bestrahlung mit sichtbarem oder UV-Licht im Laufe der Zeit abbaut. Dies würde zu einem Rückgang der Fluoreszenz und damit zu einer Verfälschung der Messwerte führen.



Abb. 3.13: Nacktmaus mit Rückenhautkammer, in die SF126 Tumorzellen implantiert sind

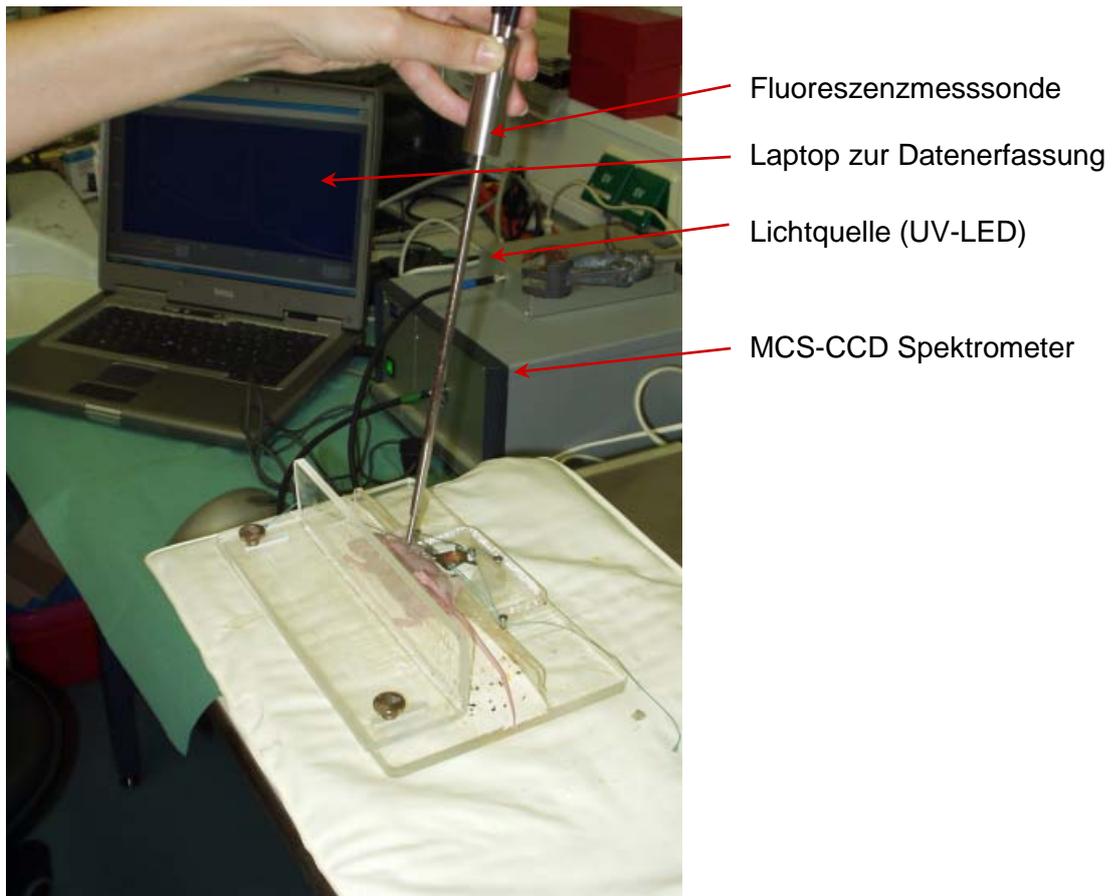


Abb. 3.14: Darstellung des Messaufbaus zur Durchführung von Fluoreszenzmessungen bei einer Nacktmaus

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzmessaufbau mit CCD-Spektrometer

Zur qualitativen Bestimmung der Fluorophore während der Kultivierung von Mikroorganismen bzw. biomedizinischen Anwendungen war es unerlässlich, die Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der beobachteten Fluorophore in unterschiedlichen Matrices zu ermitteln. Ein Schwerpunkt hierbei war die Differenzierung der Porphyrine, die in Hefe und Haut vorhanden sind, und deren Fluoreszenzemissionen mit dem hier vorgestellten Messaufbau detektierbar sind. Zn-Protoporphyrin wurde zu Vergleichszwecken nur in DMSO und Ethanol untersucht, da sich in diesen beiden Matrices alle Porphyrine sehr gut lösten. Zur Bestimmung der Fluoreszenzemission der einzelnen Biofluorophore in den unterschiedlichen Matrices wurde der unter 3.1.1 beschriebene Fluoreszenzmessaufbau verwendet.

4.1.1 Absorptionsspektren und Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore

Die Biofluorophore wurden in verschiedenen Matrices gelöst und ihre Absorptions- bzw. Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Generell wurden die Konzentrationen so gewählt, dass die Absorption im Bereich um 366 nm kleiner als 0,1 war und somit die Fluoreszenzintensität linear mit der Fluoreszenzkonzentration anstieg.

Im Folgenden sind die Ergebnisse für Phosphatpuffer pH 7,0, Phosphatpuffer pH 5,0, Backhefemedium pH 5,2 (nur Porphyrine), Ethanol und DMSO gezeigt. Es werden die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten, die normierten Fluoreszenzemissionsspektren sowie die Nachweisempfindlichkeit bei Fluoreszenzanregung betrachtet. Abschließend werden die Fluoreszenzemissionsspektren der einzelnen Biofluorophore in den unterschiedlichen Matrices gegenübergestellt.

Aus vorigen Arbeiten mit dem in 3.1.1 beschriebenen Aufbau ist bekannt, dass sich NADPH und NADH bzw. FAD, FMN und Riboflavin in der Lage ihrer Emissionsspektren nicht voneinander unterscheiden. Lediglich die relative Nachweisempfindlichkeit ist unterschiedlich (Brakel, 2006; Huebner & Klug, 2005). Daher wurden in dieser Arbeit stellvertretend nur NADH und FAD untersucht.

4.1.1.1 Messungen in Phosphatpuffer pH 7,0

Abb. 4.1 zeigt die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten der betrachteten Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0.

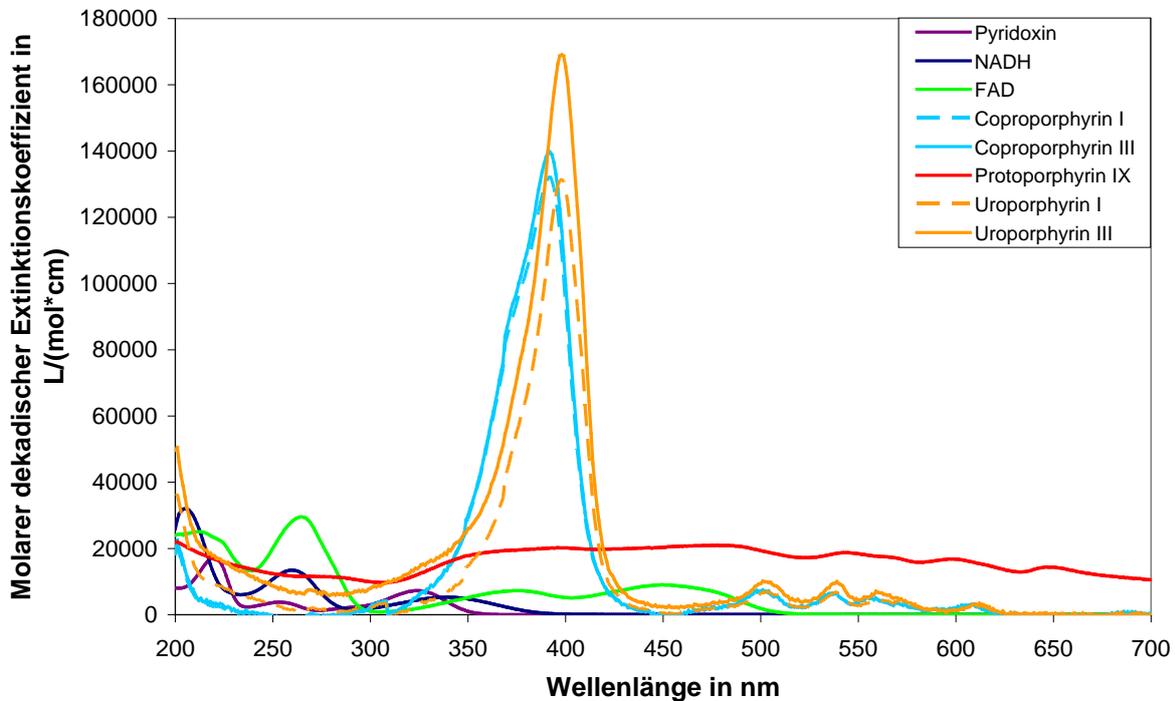


Abb. 4.1: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0

Hier ist zu erkennen, dass sich Protoporphyrin IX nur sehr schlecht in Phosphatpuffer pH 7,0 löst und daher kein klares Maximum wie bei den anderen Porphyrinen (um 400 nm) erkennbar ist.

Des Weiteren folgt aus den Absorptionsspektren, dass die betrachteten Biofluorophore außer Pyridoxin mit dem Fluoreszenzmessaufbau bei 366 nm effektiv angeregt werden können. Aufgrund der hohen Intensität der 366 nm UV-LED ist es dennoch möglich, auch mit dem in 3.1.1 beschriebenen Aufbau Pyridoxin zur Fluoreszenz anzuregen. Allerdings überlagert dessen Fluoreszenzemission teilweise mit der Reflexion der Lichtquelle (s. Abb. 4.2). Daher wurde zu Testzwecken für die Fluoreszenzanregung von Pyridoxin eine UV-LED mit einer Emissionswellenlänge von 340 nm verwendet, die allerdings eine deutlich geringere Leistung (300 μ W) aufwies als die verwendete UV-LED mit 366 nm Emissionswellenlänge (130 mW). Ziel dabei war, ein Fluoreszenzemissionsspektrum ohne störende Überlagerung zu erhalten. Dieser Test wurde nur in Phosphatpuffer durchgeführt. Messungen in anderen Matrices wurden nicht gemacht, da aufgrund der Überlagerung mit der für Kultivierungen bzw. biomedizinischen Anwendungen verwendeten UV-LED dieser Bereich nicht auswertbar war.

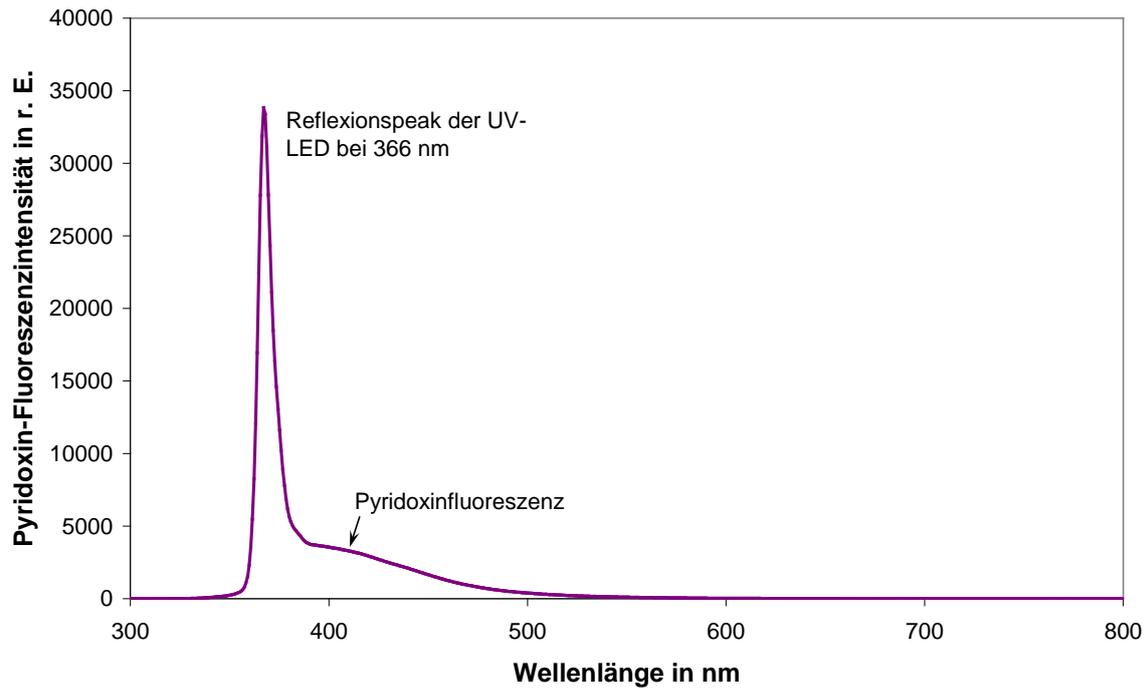


Abb. 4.2: Pyridoxinfluoreszenzemissionsspektrum, bei 366 nm angeregt (Matrix VE-Wasser)

In den folgenden Abbildungen sind die auf das Emissionsmaximum normierten Fluoreszenzemissionsspektren und die Nachweisempfindlichkeit der beobachteten Biofluorophore dargestellt.

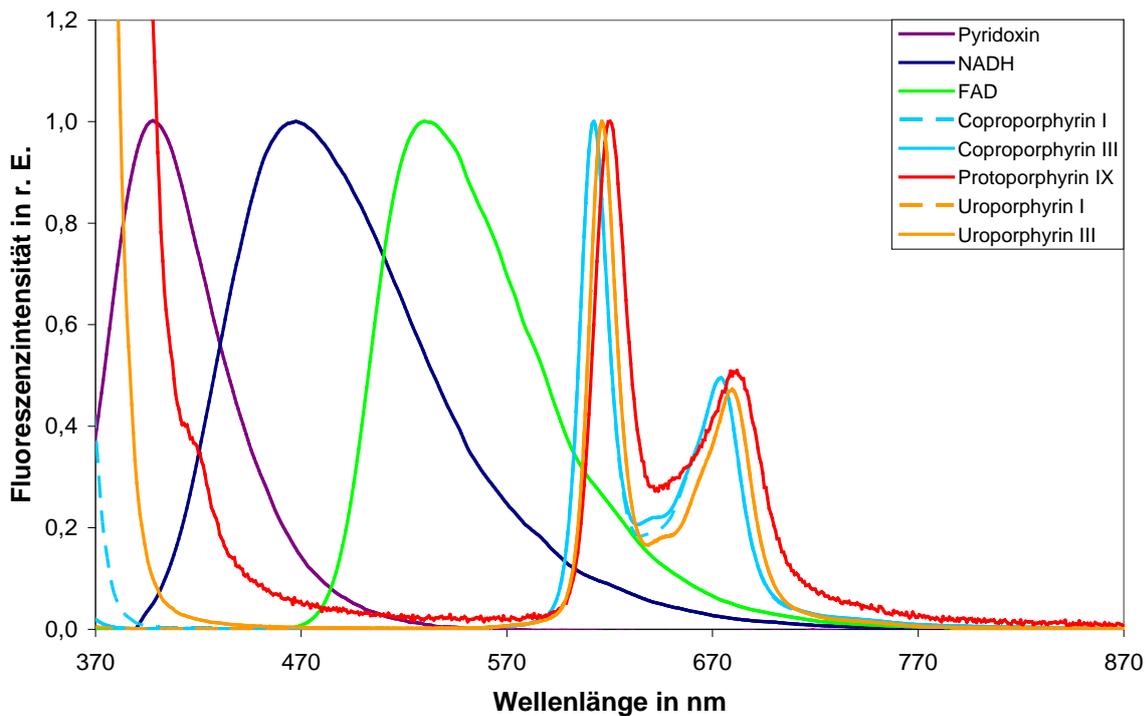


Abb. 4.3: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0 (Pyridoxin mit UV-LED bei 340 nm angeregt)

Es ist zu erkennen, dass sowohl die beiden Coproporphyrine als auch beide Uroporphyrine fluoreszieren und jeweils nahezu identische Fluoreszenzemissionsspektren besitzen. Die kurzwellige Flanke der Porphyrine um 400 nm resultiert aus der Reflexion der Lichtquelle, die ebenfalls mit dem CCD-Spektrometer detektiert wird.

Innerhalb einer Messreihe wurden die Nachweisempfindlichkeiten der Biofluorophore ermittelt, indem mit gleicher Belichtungszeit die Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen wurden und die resultierende Fluoreszenzintensität auf 1 $\mu\text{mol/L}$ des jeweiligen Fluorophors normiert wurde. Es ist zu erkennen, dass die Copro- und Uroporphyrine wesentlich höhere Nachweisempfindlichkeiten besitzen als die anderen Biofluorophore (s. Abb. 4.4). Die Nachweisempfindlichkeit von Pyridoxin ist hier nicht aufgeführt, da sie durch die Verwendung der intensitätsschwachen UV-LED nicht mit den anderen Werten vergleichbar ist.

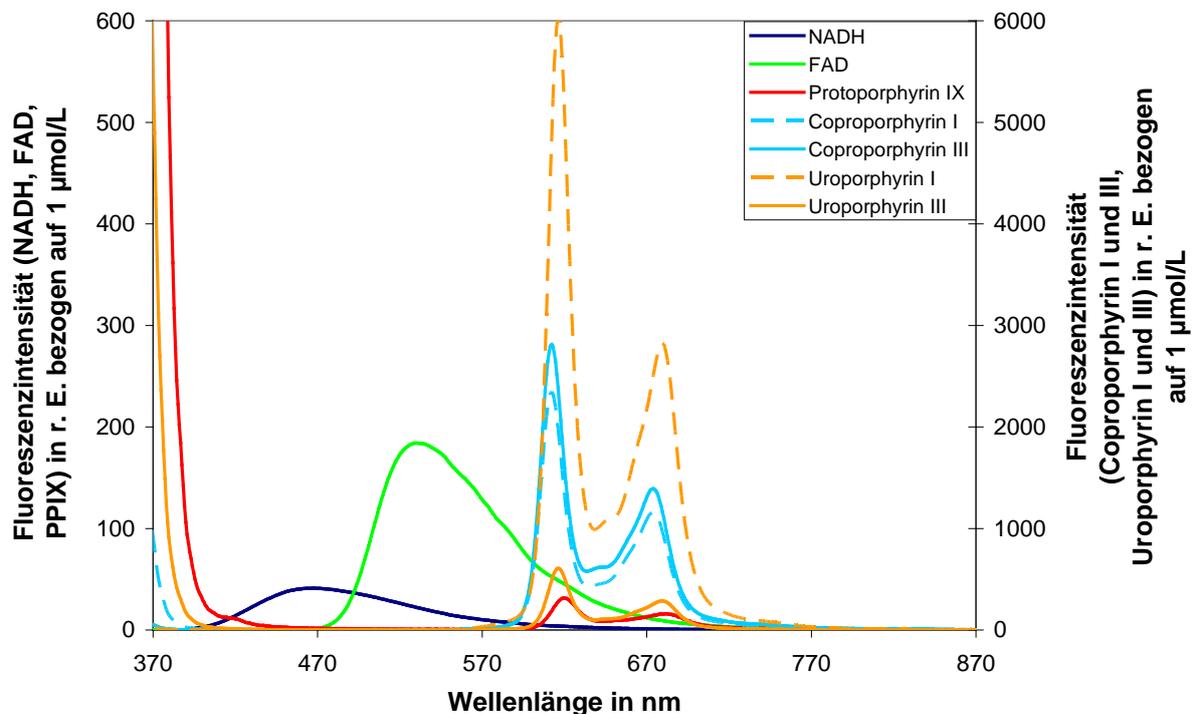


Abb. 4.4: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 7,0

4.1.1.2 Messungen in Phosphatpuffer pH 5,0

Auch in Phosphatpuffer pH 5,0 lässt sich Protoporphyrin IX nur mäßig lösen. Insbesondere die Coproporphyrine haben gegenüber pH 7,0 einen deutlich geringeren molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten, aber auch bei den anderen Fluorophoren (außer FAD) halbieren sich die Werte ungefähr (s. Abb. 4.5).

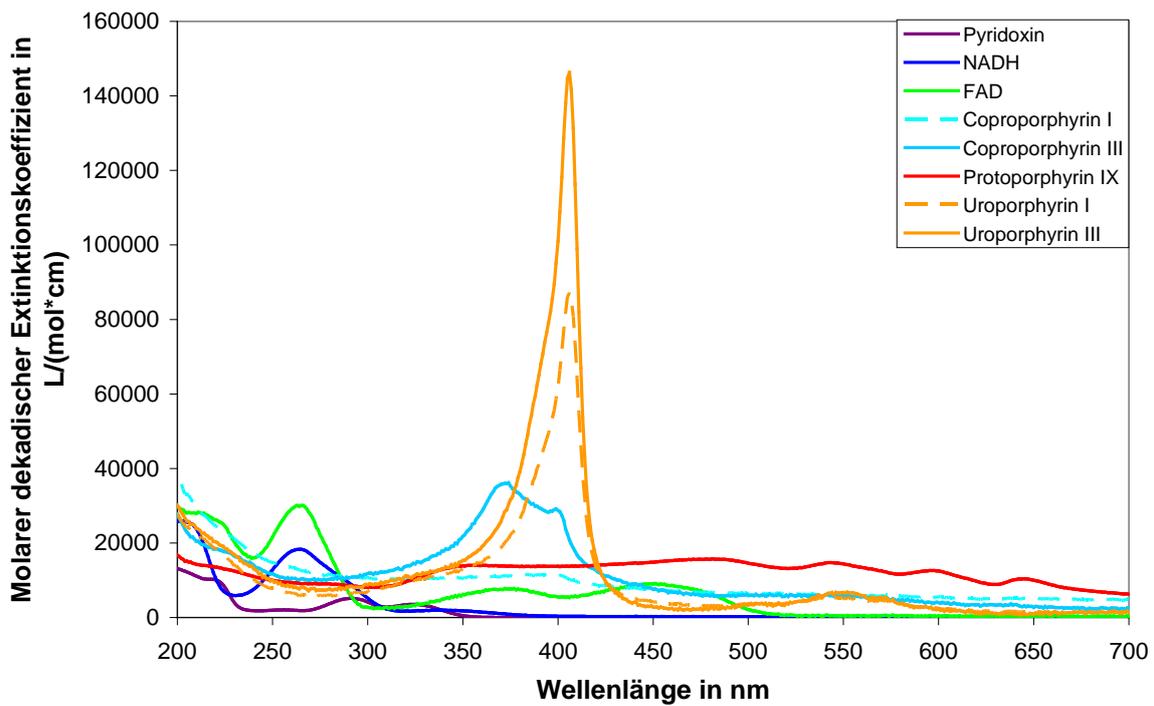


Abb. 4.5: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0

Es ist zu erwarten, dass sich die normierten Fluoreszenzemissionsspektren gegenüber pH 7,0 nur gering ändern. Dies ist in Abbildung Abb. 4.6 zu erkennen. Einzig die Spektrenform von Protoporphyrin IX unterscheidet sich und weist ein zusätzliches Nebenmaximum um 620 nm auf.

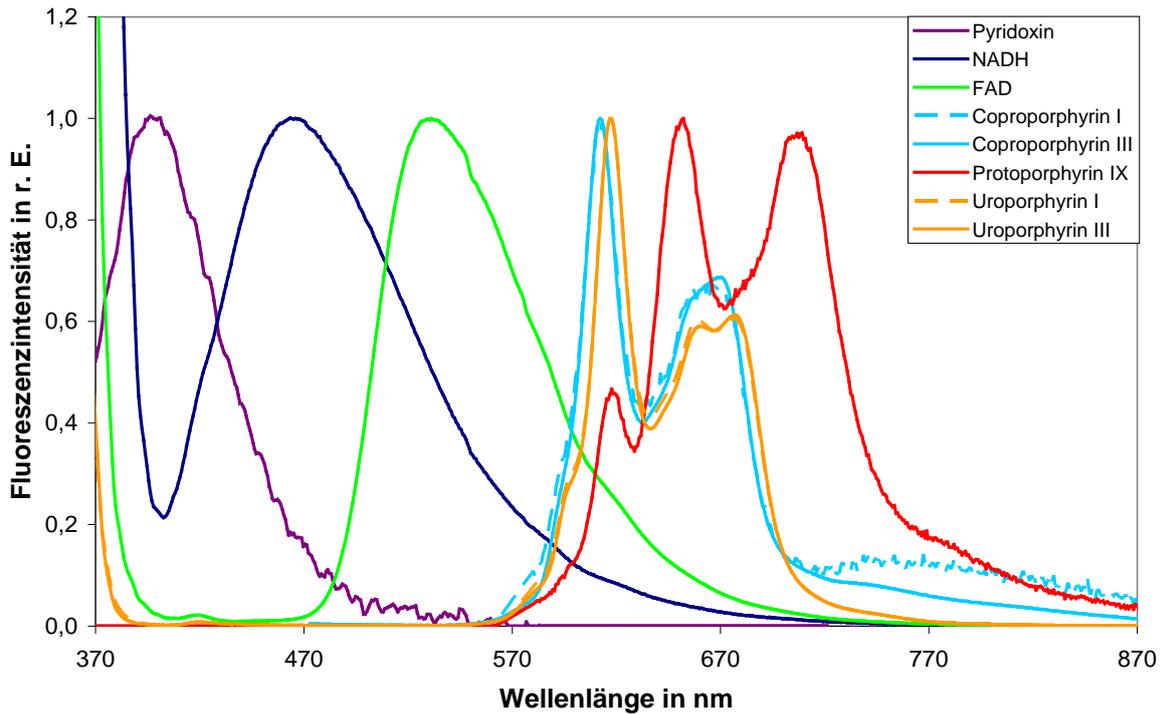


Abb. 4.6: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0 (Pyridoxin mit UV-LED bei 340 nm angeregt)

Abb. 4.7 zeigt die Nachweisempfindlichkeit der Fluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0. Hier erhöht sich die Nachweisempfindlichkeit des NADH gegenüber FAD deutlich (vgl. Abb. 4.4). Aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit ist die Nachweisempfindlichkeit des Pyridoxins nicht aufgeführt.

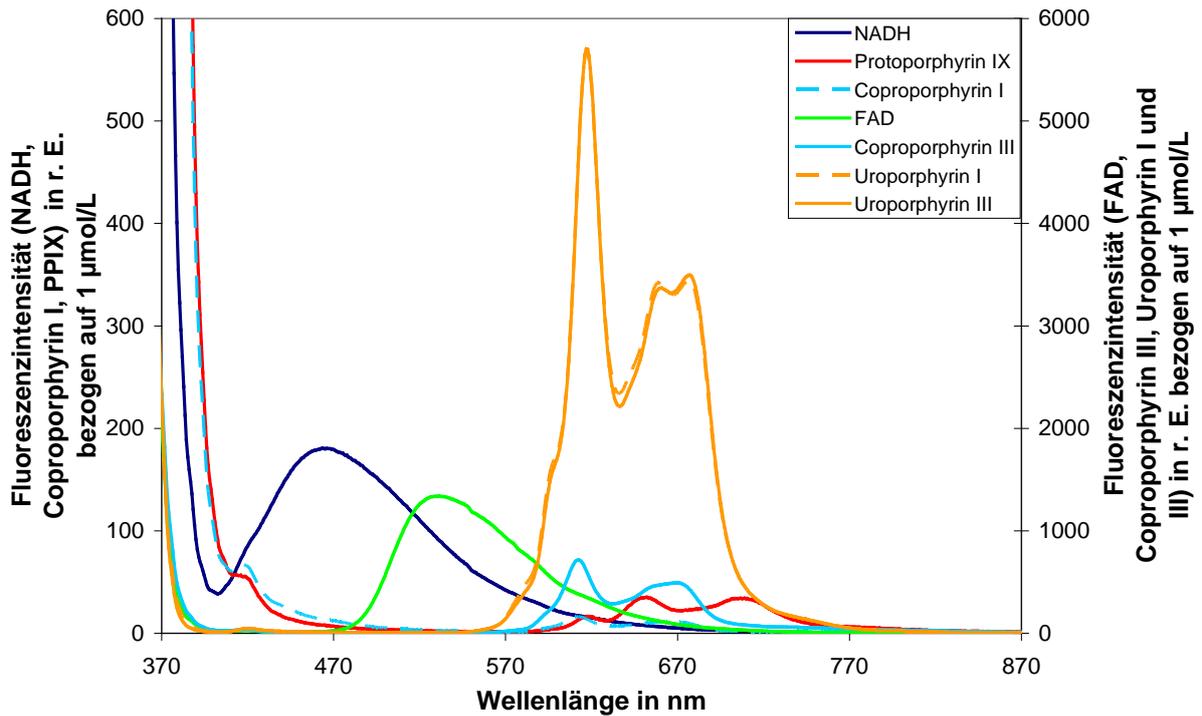


Abb. 4.7: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in Phosphatpuffer pH 5,0

4.1.1.3 Messungen in Ethanol

In Ethanol lösen sich die Porphyrine sehr gut, während NADH und insbesondere FAD nur eine sehr geringe Löslichkeit aufweisen. Die Nebenbanden der Porphyrine, vor allem des PPIX, sind in dieser Matrix deutlich ausgeprägt, die Soretbande um 400 nm ist gegenüber dem Phosphatpuffer kurzweilig verschoben (s. Abb. 4.8).

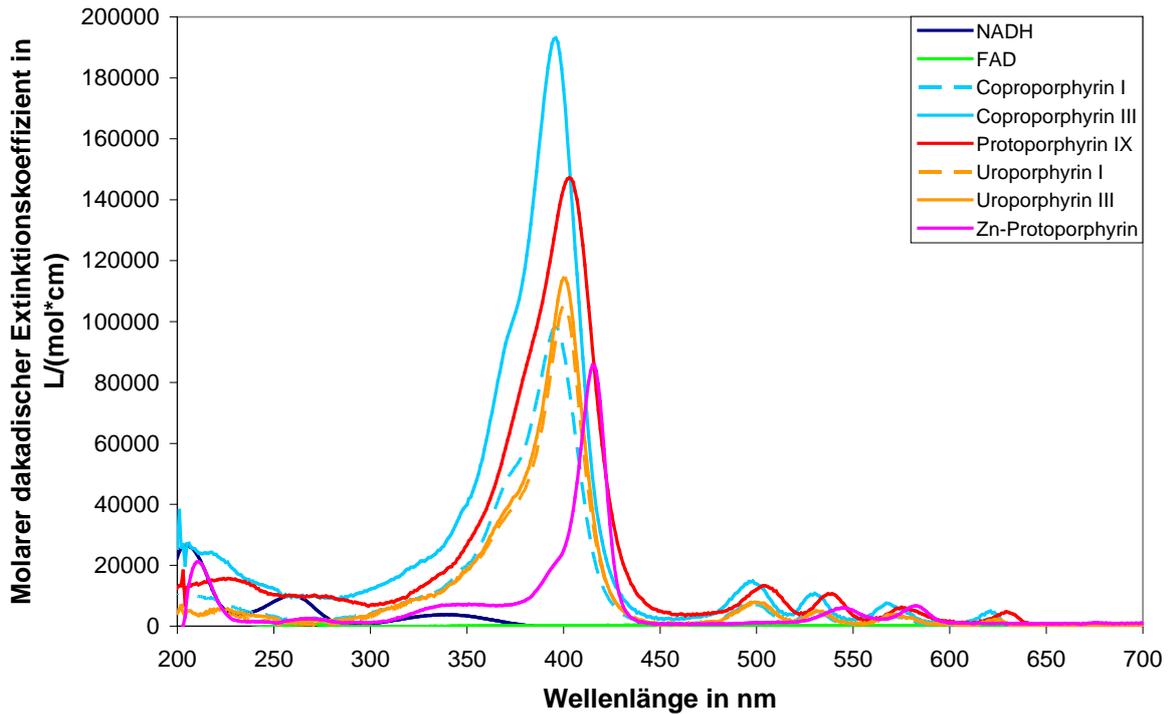


Abb. 4.8: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in Ethanol

Die Fluoreszenzemissionsspektren und Nachweisempfindlichkeiten sind in Abb. 4.9 und Abb. 4.10 aufgeführt. Wie eingangs erwähnt, führt die schlechte Löslichkeit des NADH und FAD hier zu geringeren Nachweisempfindlichkeiten im Verhältnis zu den Porphyrinen.

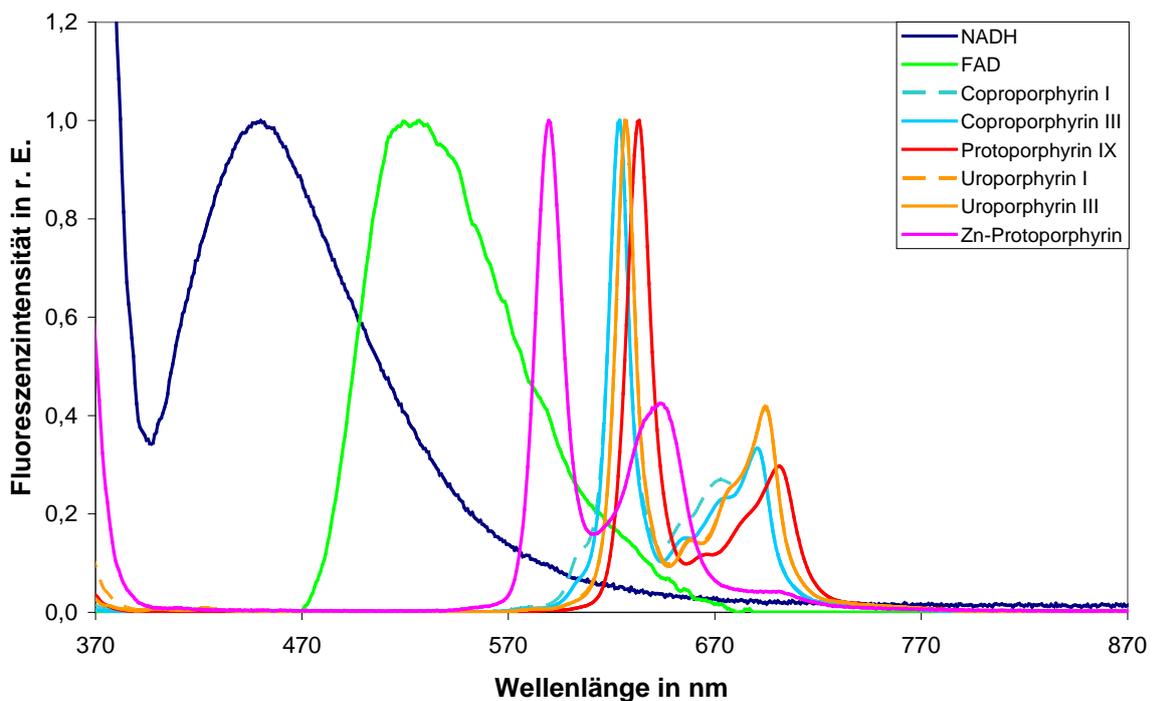


Abb. 4.9: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in Ethanol

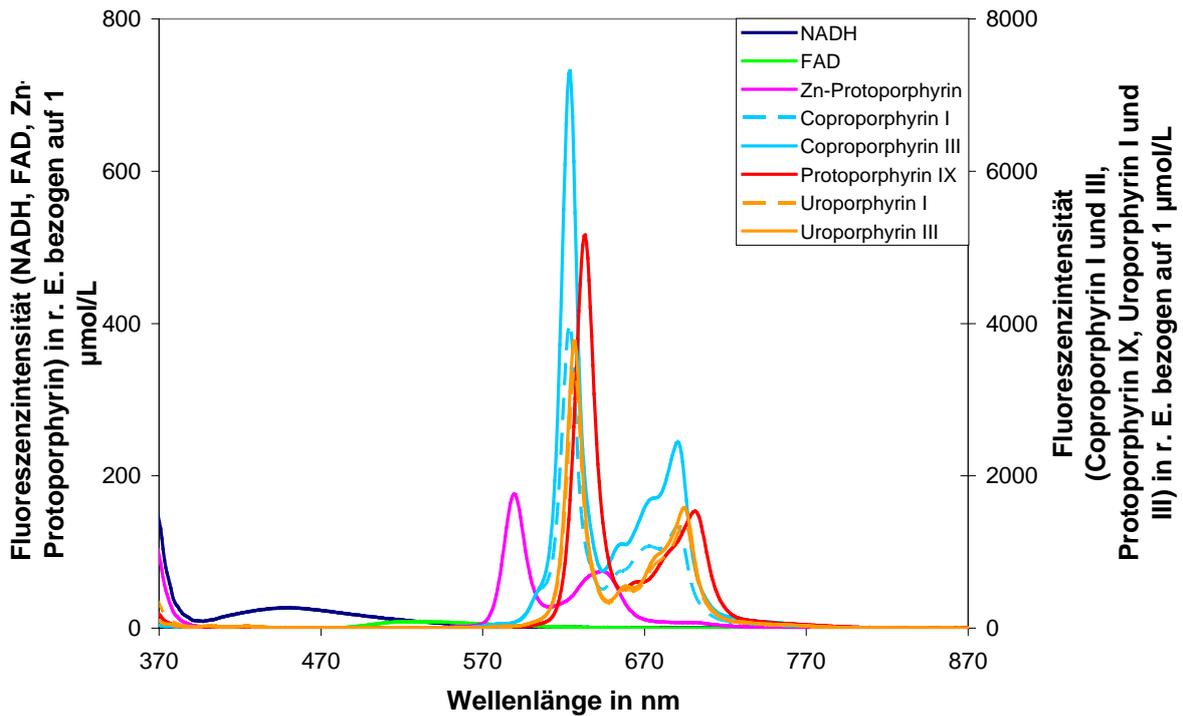


Abb. 4.10: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in Ethanol

4.1.1.4 Messungen in DMSO

In DMSO sind alle Biofluorophore sehr gut löslich. Auch hier sind die Nebenbanden der Porphyrine im Absorptionsspektrum gut zu erkennen. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient des Zn-Protoporphyrins vervierfacht sich gegenüber Ethanol, während die der anderen Porphyrine in etwa gleich bleiben (s. Abb. 4.11).

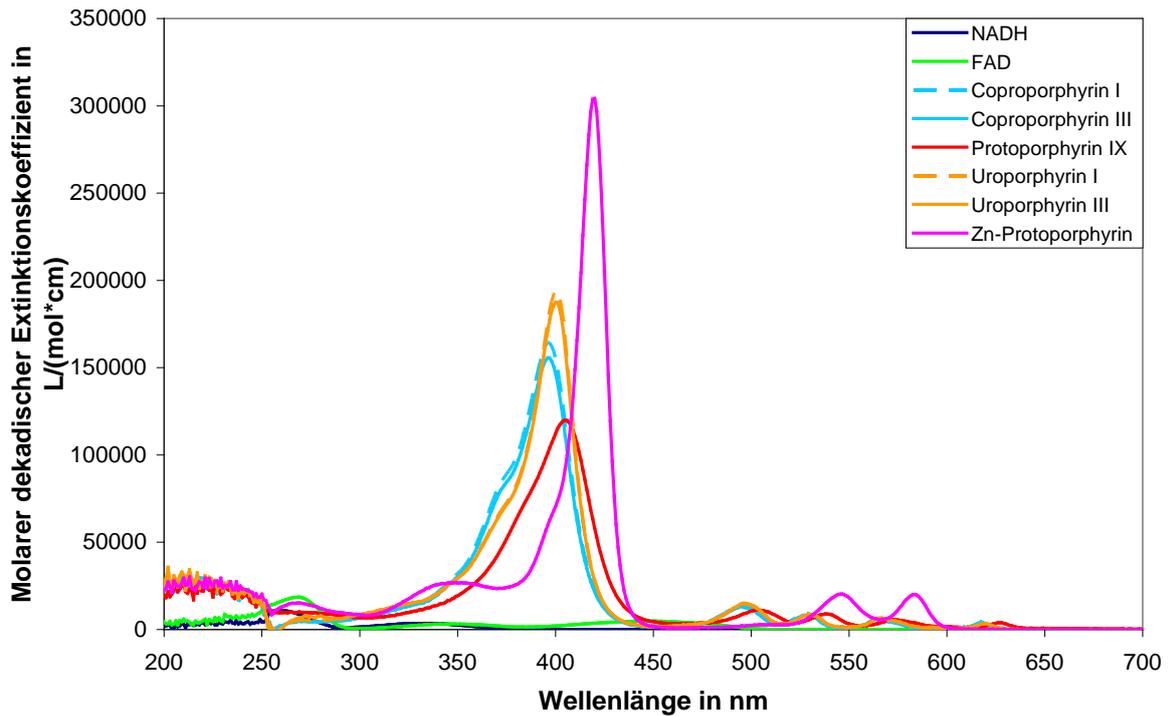


Abb. 4.11: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der Biofluorophore in DMSO

Bei den Fluoreszenzemissionsspektren in DMSO fällt auf, dass sich die Spektrenform des FAD ändert. Hier ist eine Schulter um ca. 540 nm erkennbar, die in den anderen verwendeten Matrices nicht auftritt (s. Abb. 4.12). Die Nachweisempfindlichkeit des FAD gegenüber NADH beträgt etwa das Fünffache (s. Abb. 4.13).

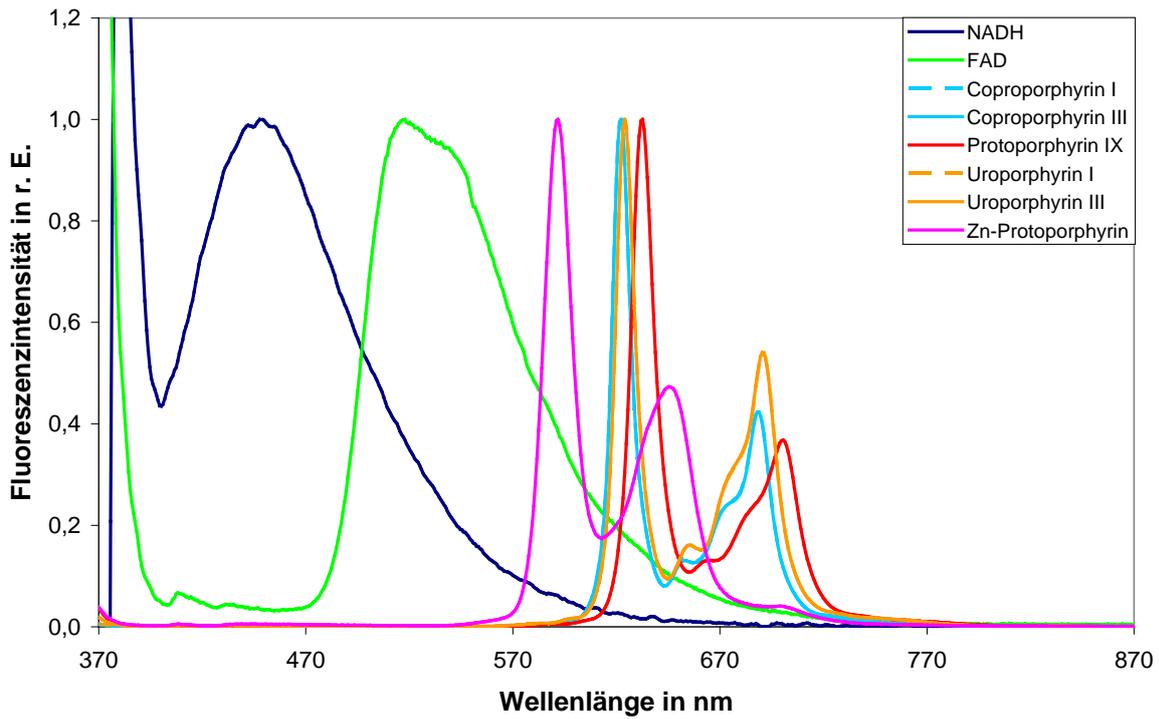


Abb. 4.12: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren der Biofluorophore in DMSO

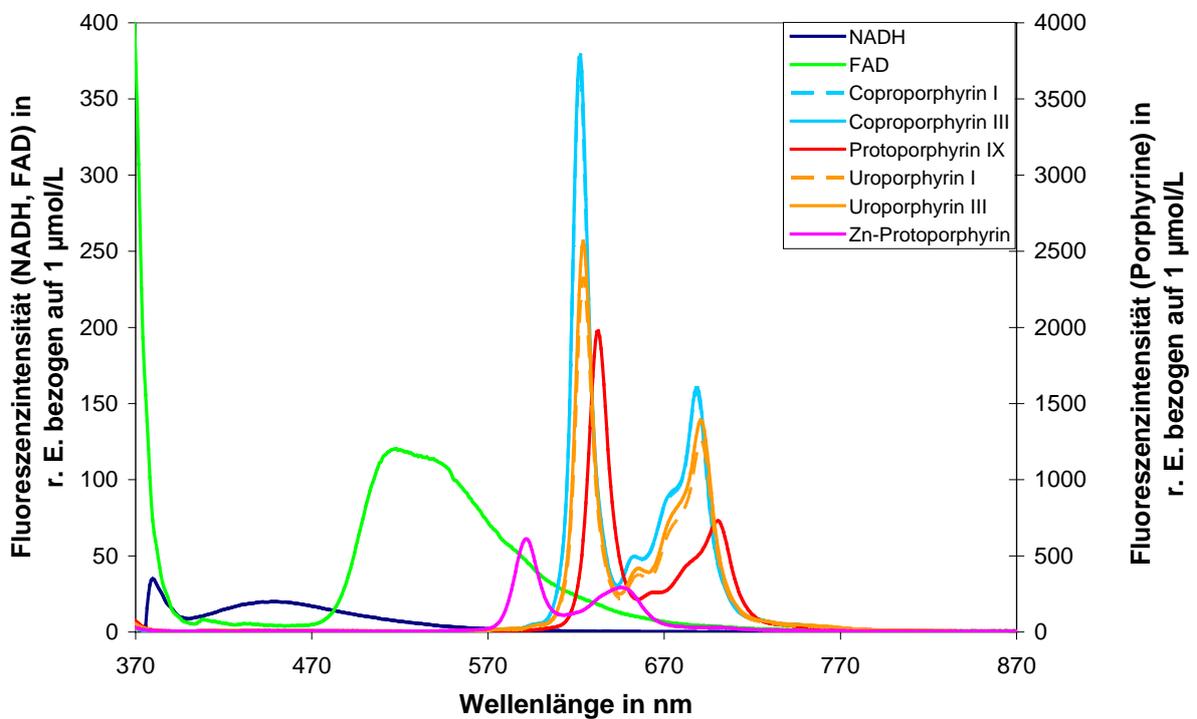


Abb. 4.13: Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit der Biofluorophore in DMSO

4.1.1.5 Fluoreszenzemissionsspektren in verschiedenen Matrices

In den folgenden Abbildungen sind die normierten Fluoreszenzemissionsspektren in den verschiedenen Matrices für jeden Biofluorophor zusammengefasst.

Coproporphyrin I und III

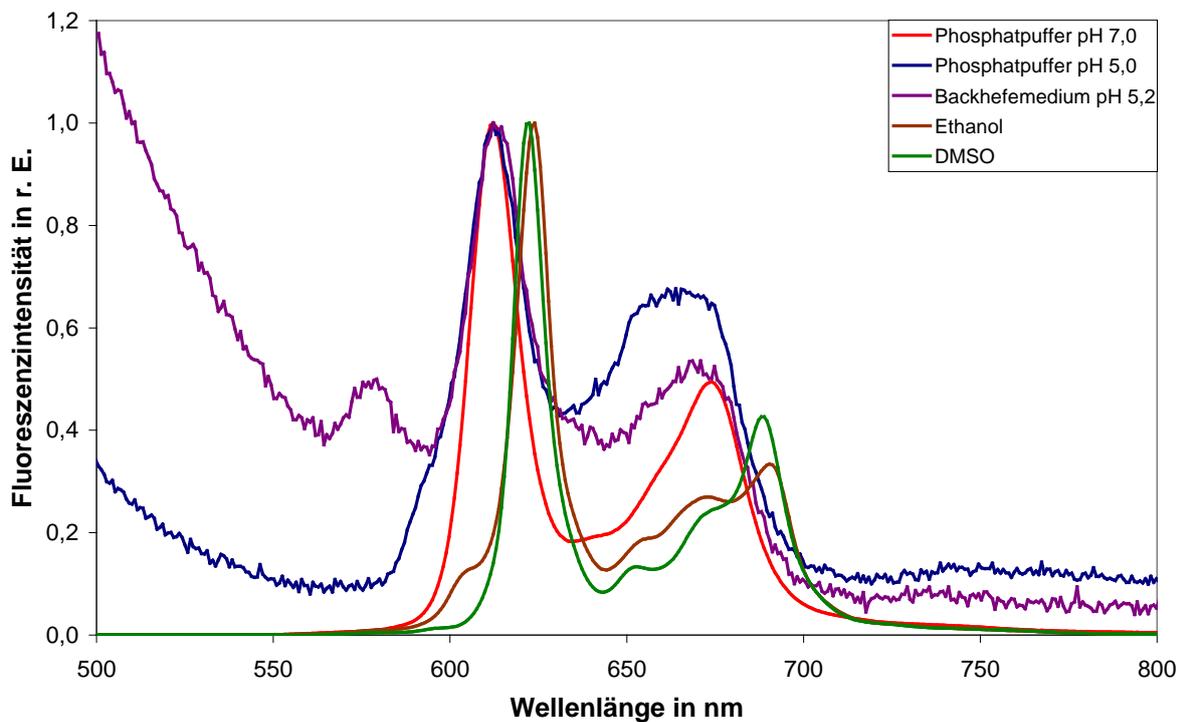


Abb. 4.14: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Coproporphyrin I in unterschiedlichen Matrices

Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis der Spektren geht mit einer geringen Fluoreszenzintensität einher, die durch die schlechte Löslichkeit des Coproporphyrins in diesen Matrices zustande kommt. Zusätzlich zu den Verschiebungen im Emissionsmaximum ist zu erkennen, dass sich die Anzahl und Lage der Nebenmaxima im Bereich zwischen 650 und 700 nm je nach Lösungsmittel deutlich unterscheiden.

Die Ergebnisse für Coproporphyrin III sind erwartungsgemäß denen von Coproporphyrin I sehr ähnlich (s. Abb. 4.15).

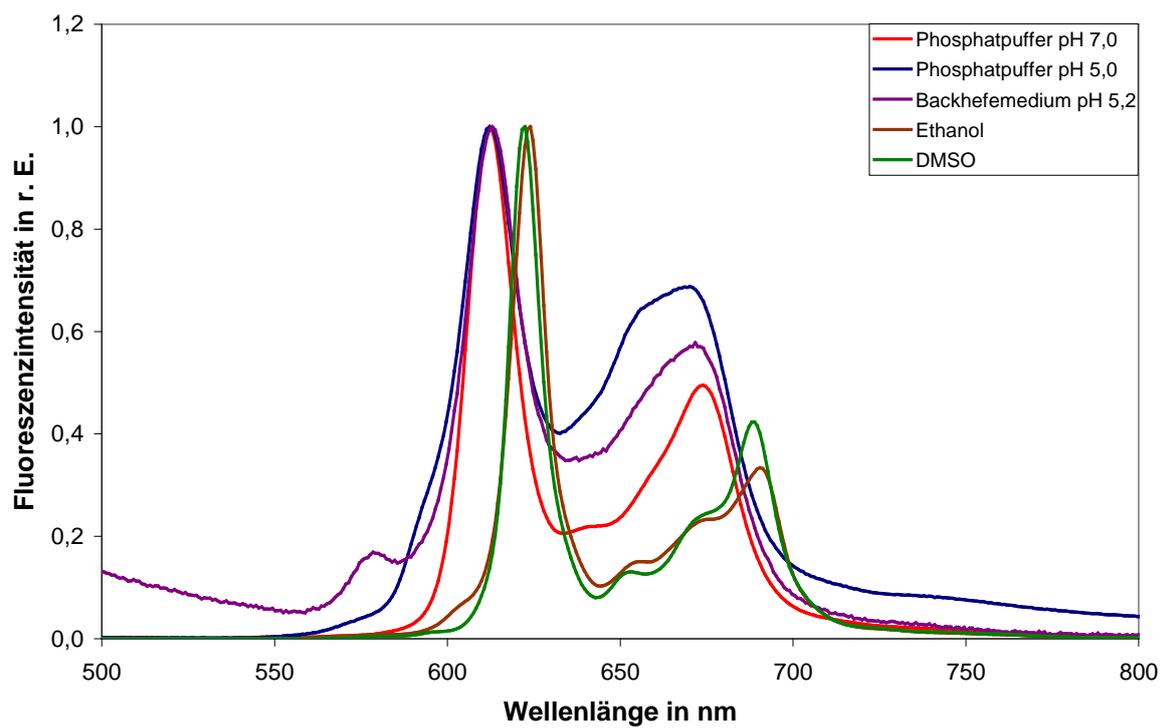


Abb. 4.15: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Coproporphyrin III in unterschiedlichen Matrices

Protoporphyrin IX

Auch bei PPIX zeigen sich teils verrauschte Spektren, die auf die schlechte Löslichkeit in diesen Matrices zurückzuführen sind. Die Unterschiede in der Anzahl und Lage der Nebenmaxima sind stärker ausgeprägt als bei den Coproporphyrinen (s. Abb. 4.16).

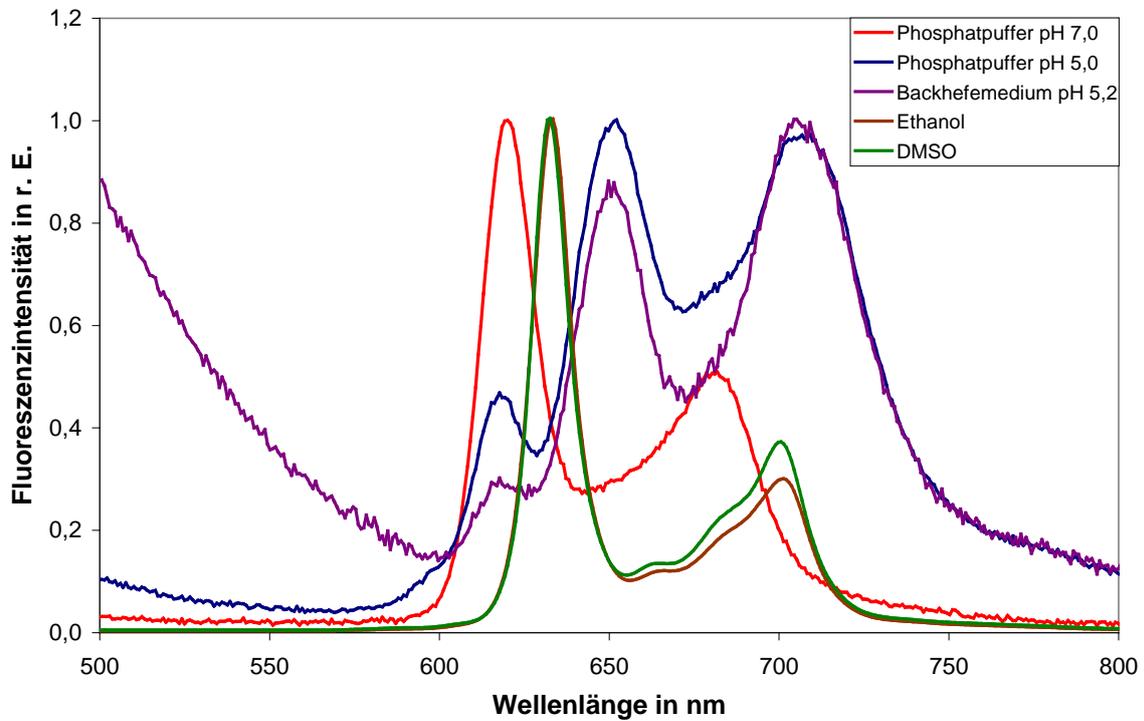


Abb. 4.16: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Protoporphyrin IX in unterschiedlichen Matrices

Uroporphyrin I und III

Analog zu Coproporphyrin I und III sind auch die Spektren von Uroporphyrin I und III erwartungsgemäß sehr ähnlich. Einzig in Backhefemedium unterscheidet sich die Form der Nebenbande von Uroporphyrin I und Uroporphyrin III. Hier weist Uroporphyrin III eine zusätzliche Schulter um 615 nm auf (vgl. Abb. 4.17, Abb. 4.18).

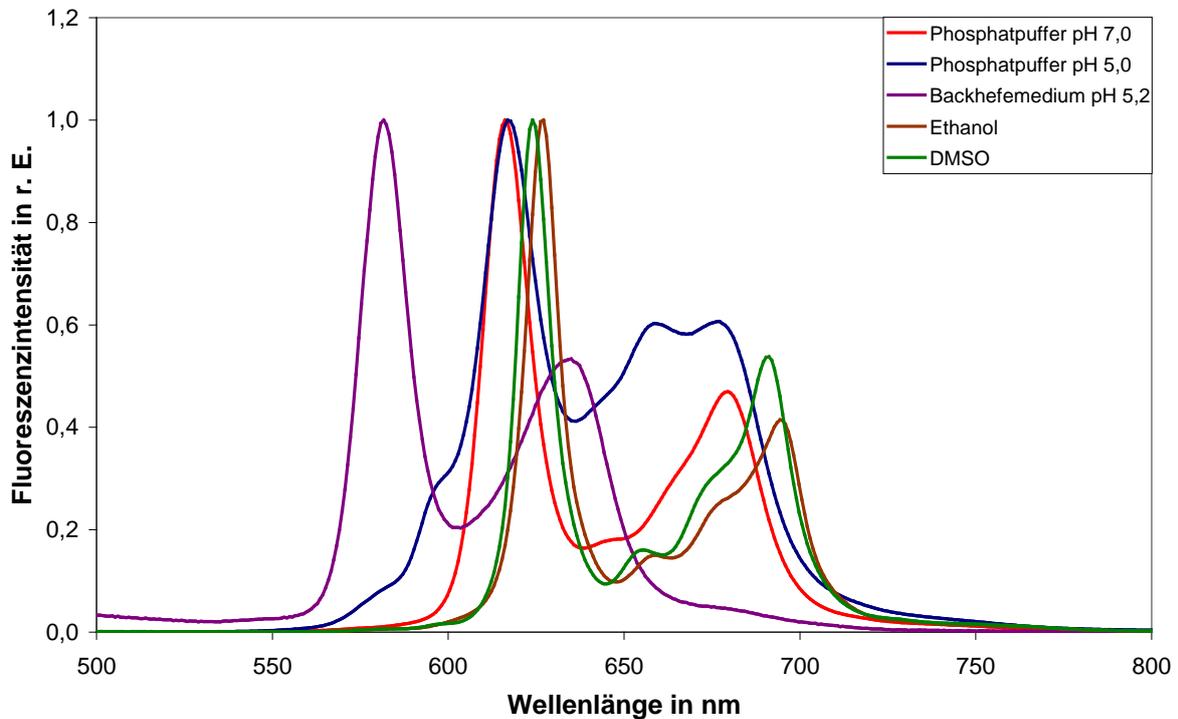


Abb. 4.17: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Uroporphyrin I in unterschiedlichen Matrices

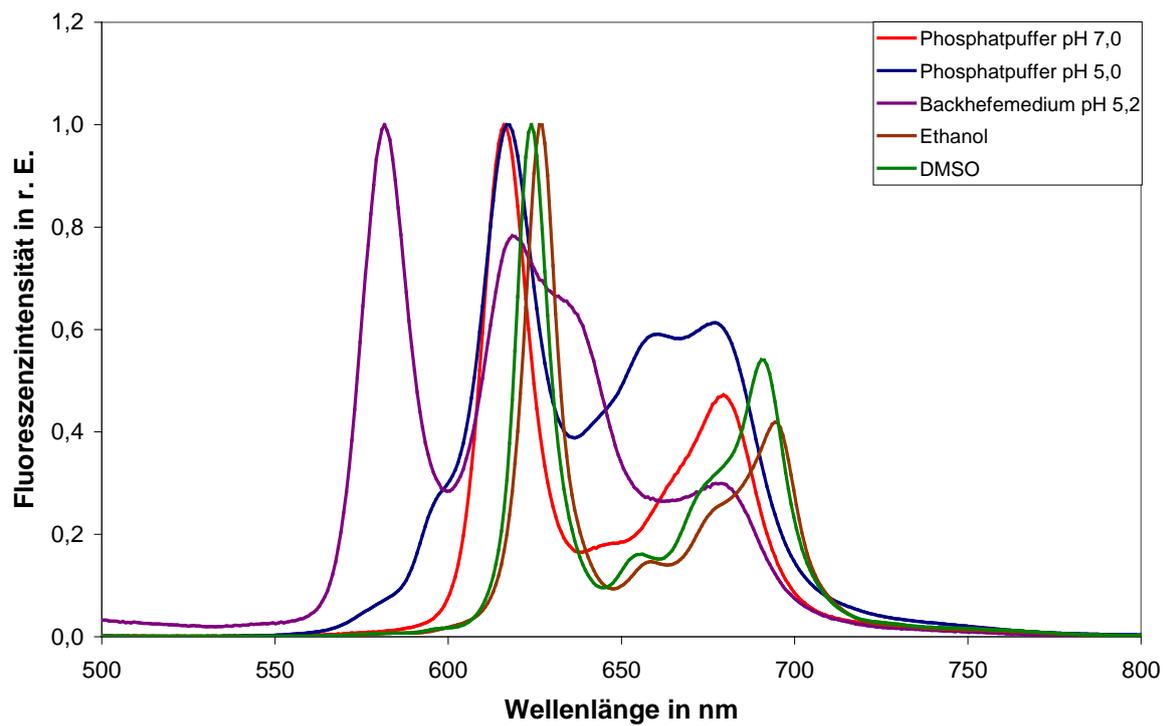


Abb. 4.18: Normierte Fluoreszenzmissionsspektren von Uroporphyrin III in unterschiedlichen Matrices

Zn-Protoporphyrin

Die Fluoreszenzemissionsspektren von Zn-Protoporphyrin wurden in Ethanol und DMSO aufgenommen und unterscheiden sich nur durch eine geringe Verschiebung des Emissionsmaximums (s. Abb. 4.19).

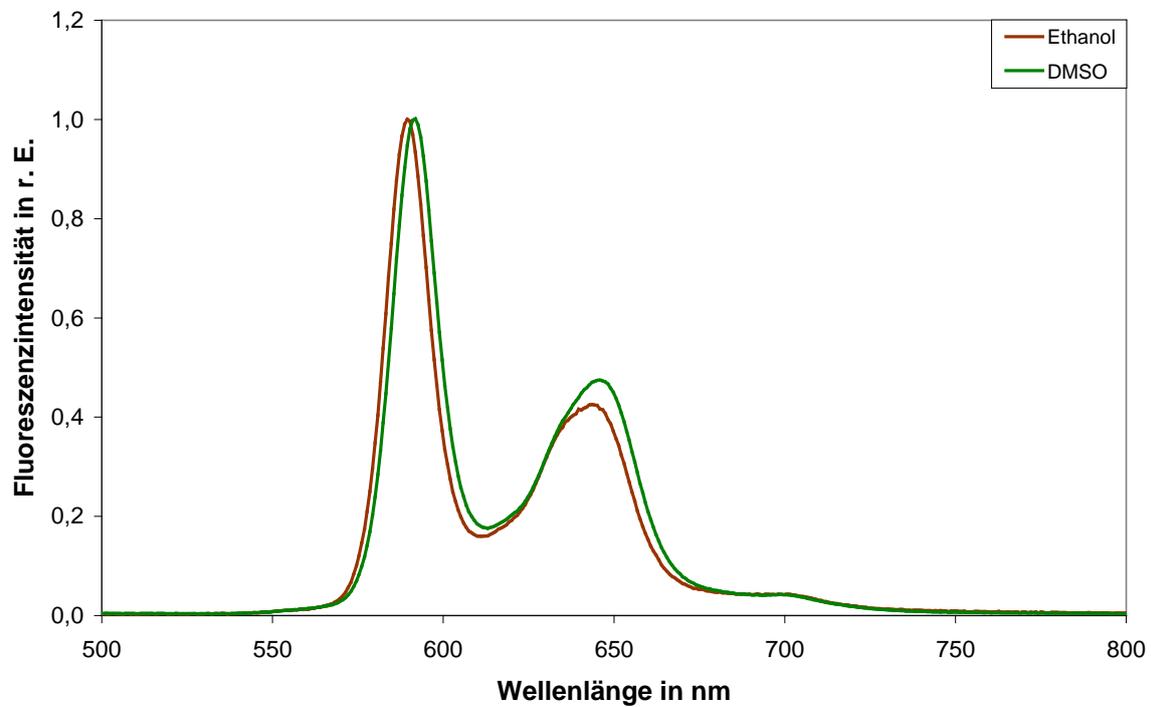


Abb. 4.19: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von Zn-Protoporphyrin in unterschiedlichen Matrices

NADH

Bei NADH findet in Ethanol und DMSO eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von ca. 467 nm in Phosphatpuffer auf etwa 450 nm statt. Die Spektrenform ändert sich nicht wesentlich, das Spektrum wird etwas schmaler (s. Abb. 4.20).

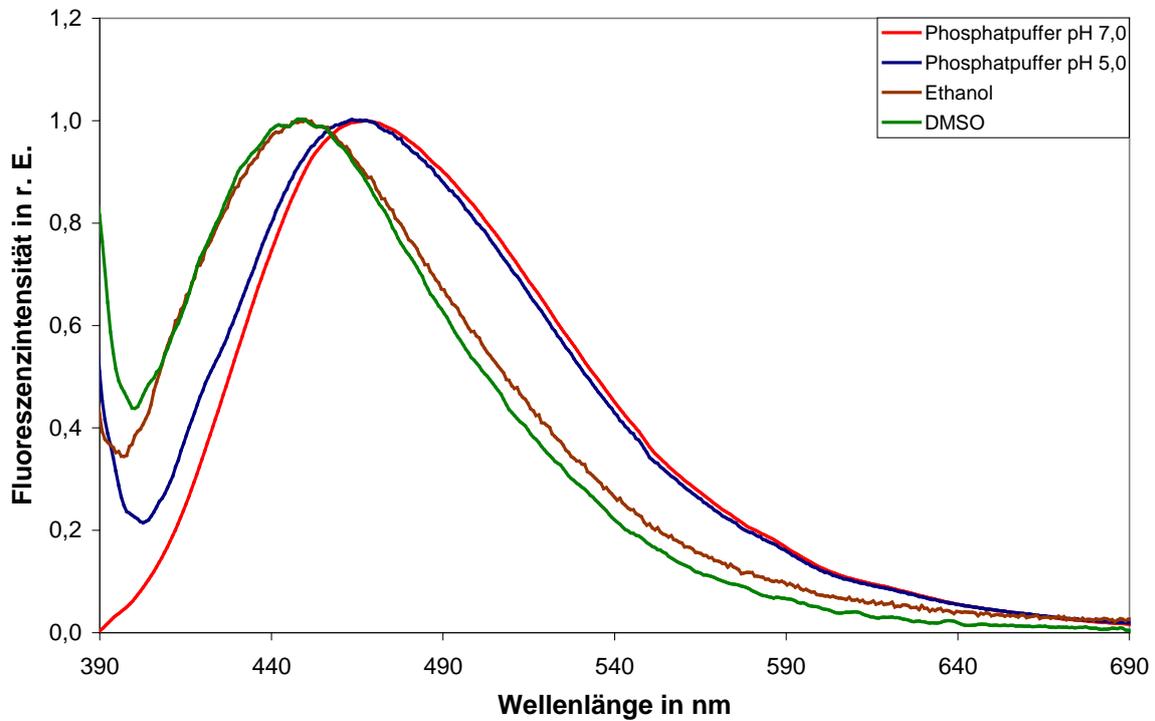


Abb. 4.20: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von NADH in unterschiedlichen Matrices

FAD

Das Emissionsmaximum von FAD liegt bei Phosphatpuffer um 530 nm. In Ethanol und DMSO ist kurzweilig auf 523 bzw. 518 nm verschoben (s. Abb. 4.21). Auffällig ist die bereits erwähnte Änderung der Spektrenform bei Verwendung von DMSO in Form einer zusätzlichen Schulter um 540 nm. Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis ist auch hier auf die niedrige Fluoreszenzintensität, bedingt durch die schlechte Löslichkeit des FAD in Ethanol, zurückzuführen.

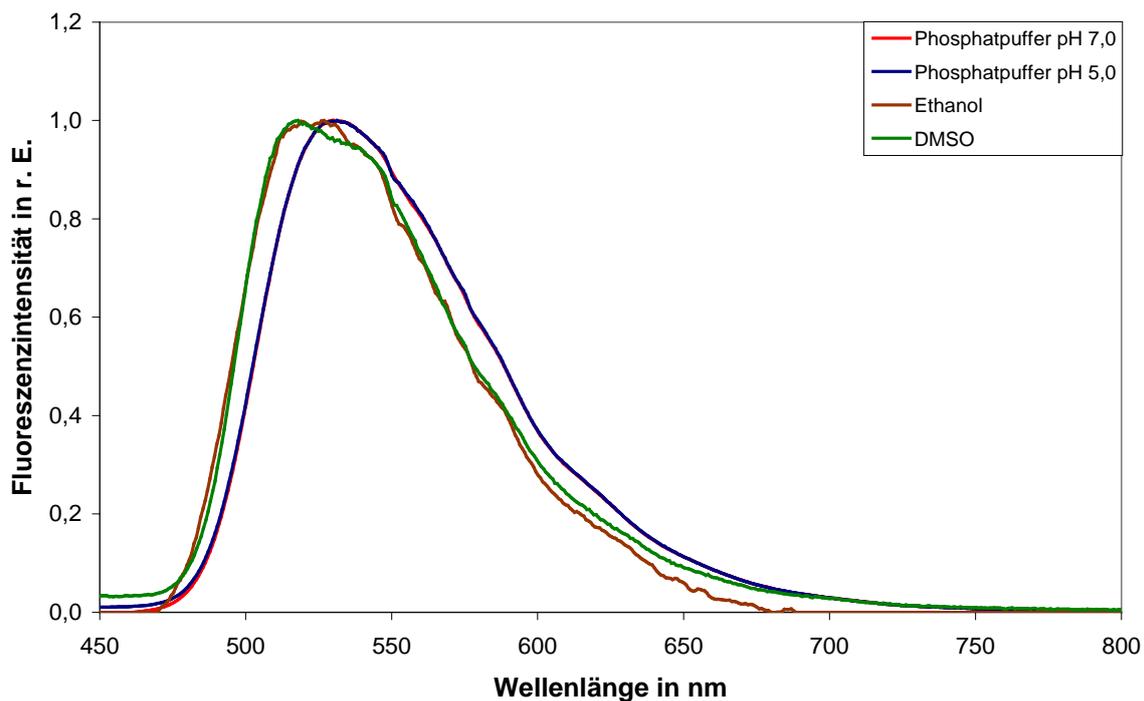


Abb. 4.21: Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von FAD in unterschiedlichen Matrices

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich je nach Polarität des Lösungsmittels und pH-Wert teils deutliche Abweichungen der Fluoreszenzemissionsmaxima zeigen.

Ferner gilt es zu beachten, dass diese Systeme sich von der Zellmatrix bzw. von Haut/Gewebe unterscheiden und somit die während der Kultivierungen oder an Patienten bzw. Mäusen gemessenen Fluoreszenzemissionsspektren eine Wellenlängenverschiebung um bis zu 10 nm gegenüber den untersuchten Matrices aufweisen können.

4.2 Messungen in Bierwürze

Die Würze zeigt im Bereich 400 bis 600 nm eine ausgeprägte Autofluoreszenz mit einem Emissionsmaximum um 450 nm (s. Abb. 4.22), welche die Hefefluoreszenz störend überlagert (vgl. Abb. 4.30). Daher wurden die Fluoreszenzmessungen der Bierhefe-kultivierungen in einem synthetischen, wärzeähnlichen Medium durchgeführt, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde (siehe 3.4.1).

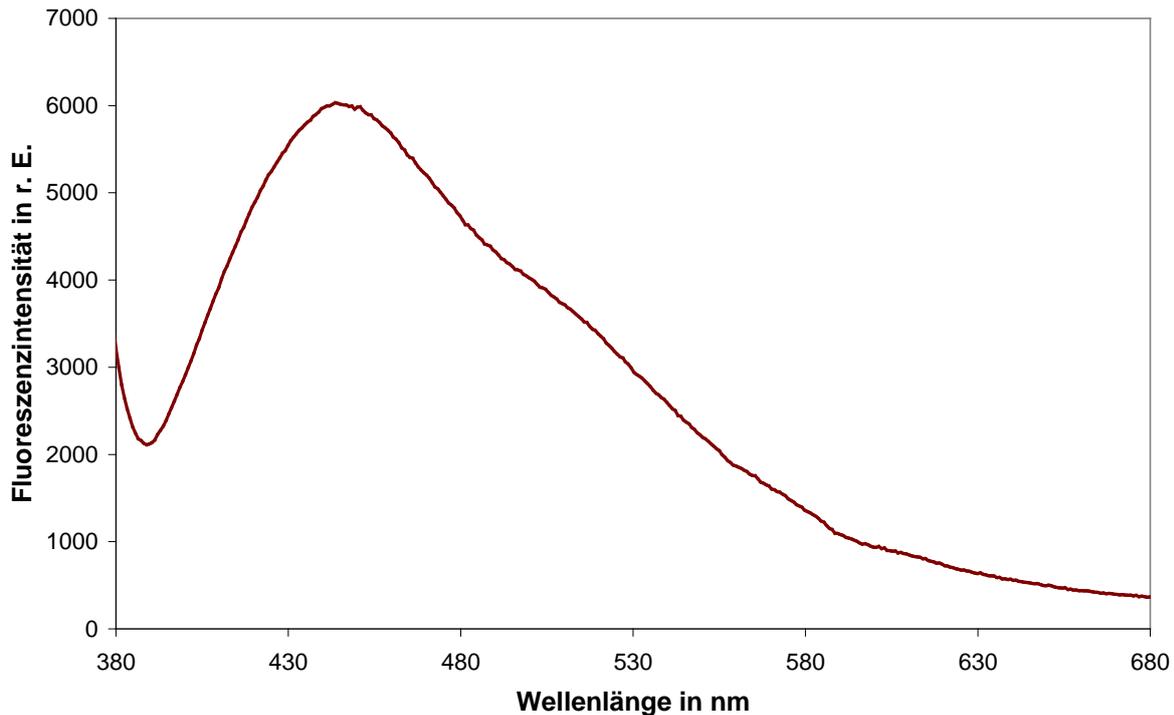


Abb. 4.22: Fluoreszenzemissionsspektrum einer Pilswürze

Es wurde versucht, die Ursache der Autofluoreszenz zu ermitteln, um den störenden Einfluss auf die Messung der Hefefluoreszenz evtl. mathematisch beheben zu können. Als Verursacher der Autofluoreszenz in diesem Bereich kommen u. a. Proteine, Polyphenole und die iso- α -Säuren des Hopfens in Frage. Ebenfalls können während der Würzeherstellung entstehende Maillard-Produkte zur Autofluoreszenz beitragen.

Messungen an Pepton und BSA lassen erkennen, dass Proteine im Bereich um 450 nm fluoreszieren (s. Abb. 4.23), während freie Aminosäuren mit dem verwendeten Aufbau (Anregung bei 366 nm) nicht zur Fluoreszenz angeregt werden können (vgl. Tabelle 2.1).

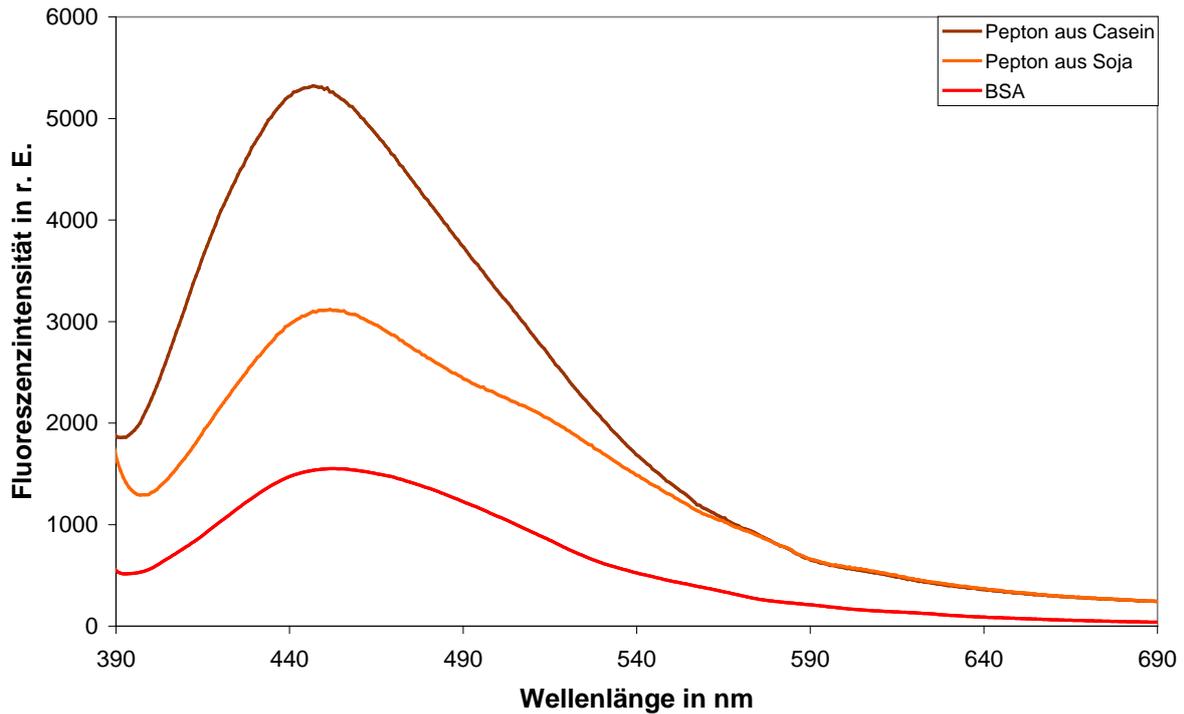


Abb. 4.23: Fluoreszenzemissionsspektren von Peptonen und BSA

Zur Ermittlung, ob es sich um Proteine als Verursacher der Autofluoreszenz handelt, wurde die Würze alternativ mit Pepsin, Trypsin, Proteinase K oder Kieselgel versetzt. Dabei sollte die Fluoreszenz zurückgehen, wenn die Proteine entweder abgebaut oder ausgefällt werden. Dies ist jedoch nicht der Fall (s. Abb. 4.24). Im Gegenteil, die Fluoreszenzintensität nimmt sogar um 4-11 % zu.

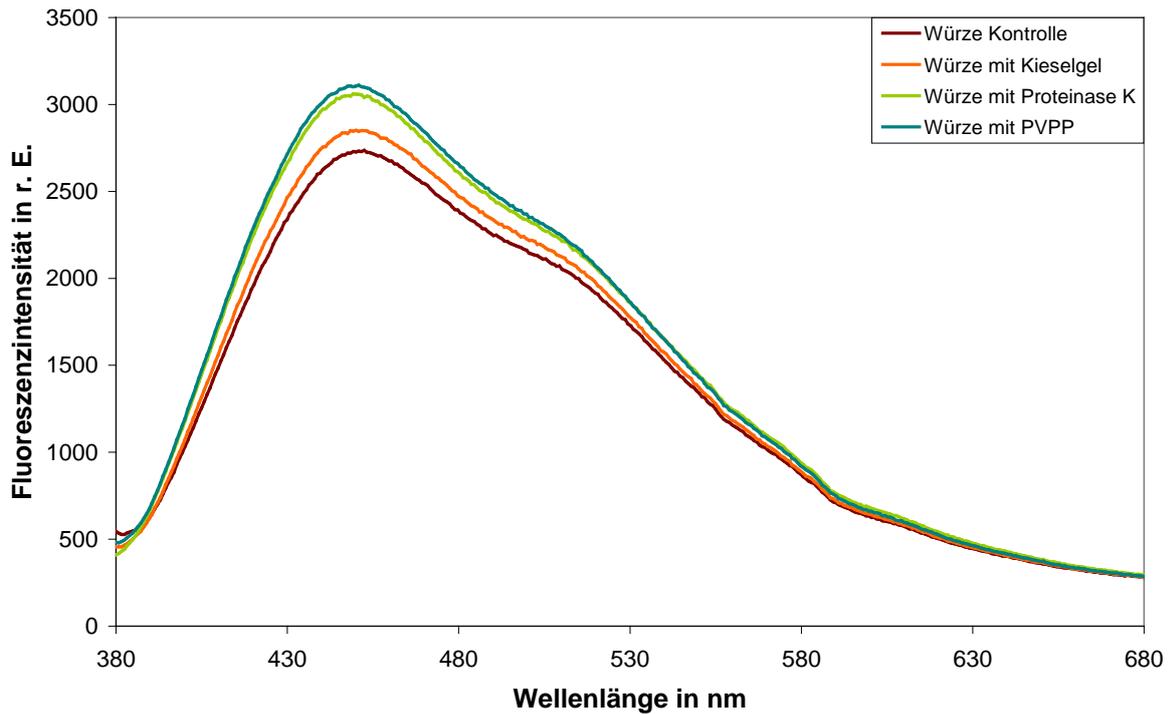


Abb. 4.24: Fluoreszenzmissionsspektren von Würze, die mit Kieselgel, Proteinase K oder PVPP versetzt wurde

Auch nach der Behandlung mit PVPP, an welches Polyphenole adsorbieren, nimmt die Würze fluoreszenz nicht ab, sondern um 14 % zu (s. Abb. 4.24). Dennoch zeigen Messungen an Polyphenolen, dass z. B. Ferulasäure in diesem Bereich fluoresziert (s. Abb. 4.25). Allerdings ist die ausgeprägte Würze fluoreszenz durch die in ihr enthaltene geringe Konzentration an Ferulasäure alleine nicht erklärbar.

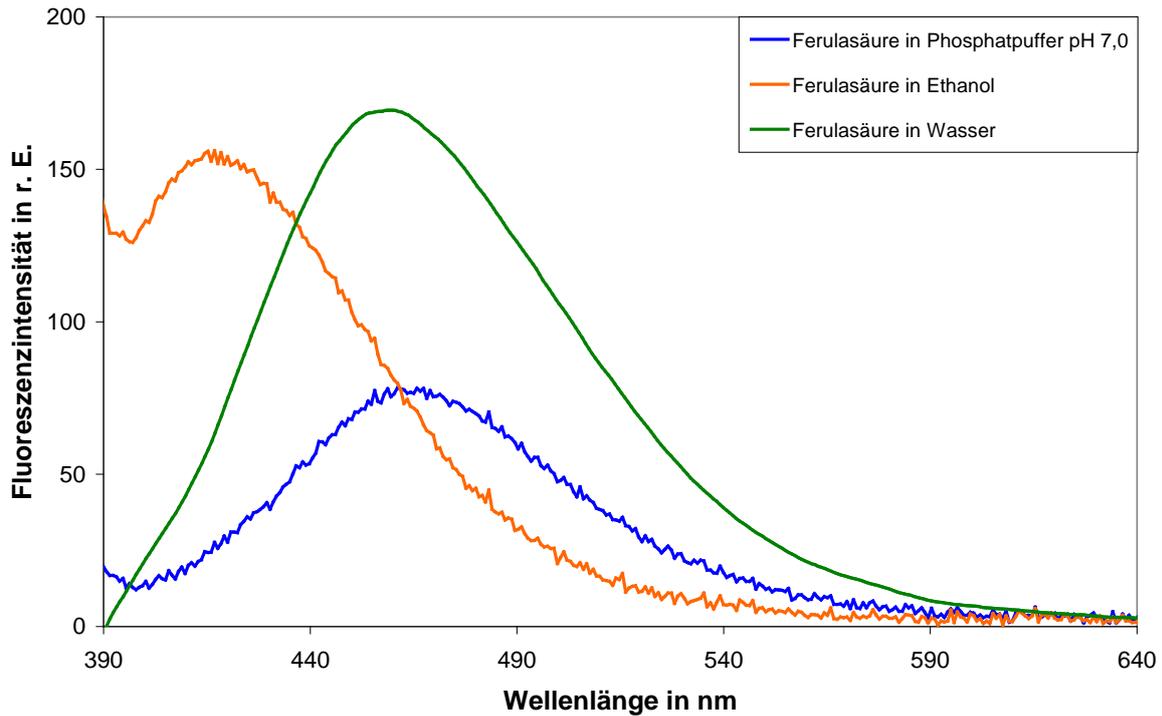


Abb. 4.25: Fluoreszenzemissionsspektren von Ferulasäure in unterschiedlichen Matrices

Neben den Polyphenolen zeigt auch Hopfen eine Fluoreszenz. Je nach Hopfenprodukt liegt diese entweder im Bereich 530-590 nm oder um 440-460 nm (s. Abb. 4.26).

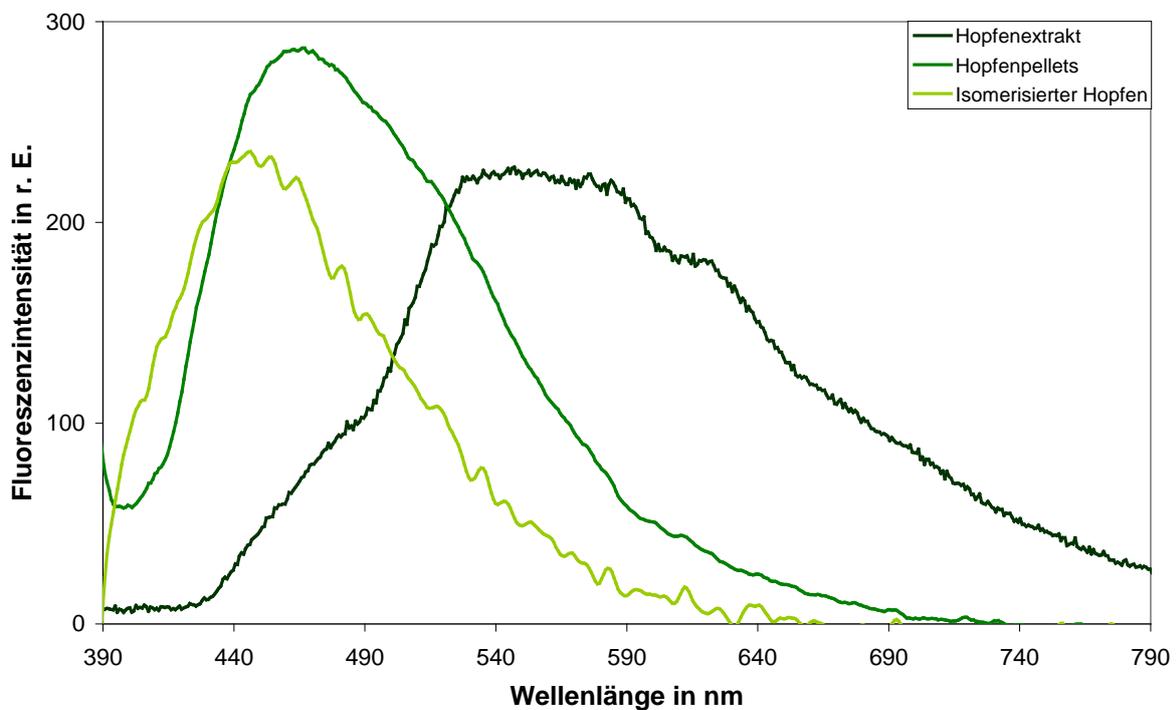


Abb. 4.26: Fluoreszenzemissionsspektren von Hopfenprodukten

Um zu prüfen, ob Hopfen der Verursacher der Würzefluoreszenz ist, wurde auch ungehopfte Würze vermessen. Diese weist aber ein ähnliches Fluoreszenzemissionsspektrum um 450 nm wie die gehopfte Würze auf. Allerdings erhöht sich die Fluoreszenzintensität im Bereich um 500-550 nm bei der gehopften Würze gegenüber der ungehopften (s. Abb. 4.27). Diese Intensitätszunahme ist auf den Hopfen zurückzuführen, die Differenz beider Spektren gleicht der Fluoreszenzemission des Hopfenextrakts in Abb. 4.26.

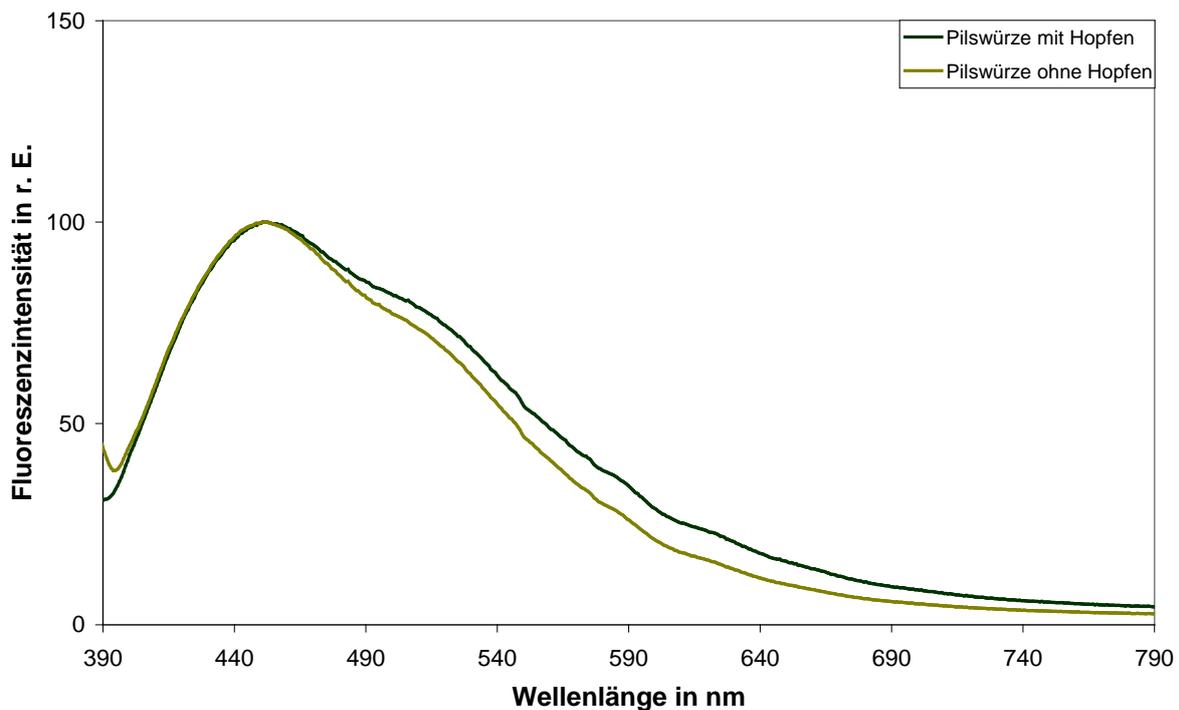


Abb. 4.27: Vergleich der normierten Fluoreszenzemissionsspektren von gehopfter und ungehopfter Pilswürze

In vitro hergestellte Maillard-Produkte aus Glucose und Lysin zeigen eine Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum um 450 nm, sodass es sich bei der Autofluoreszenz der Würze um Maillard-Produkte handeln könnte (s. Abb. 4.28).

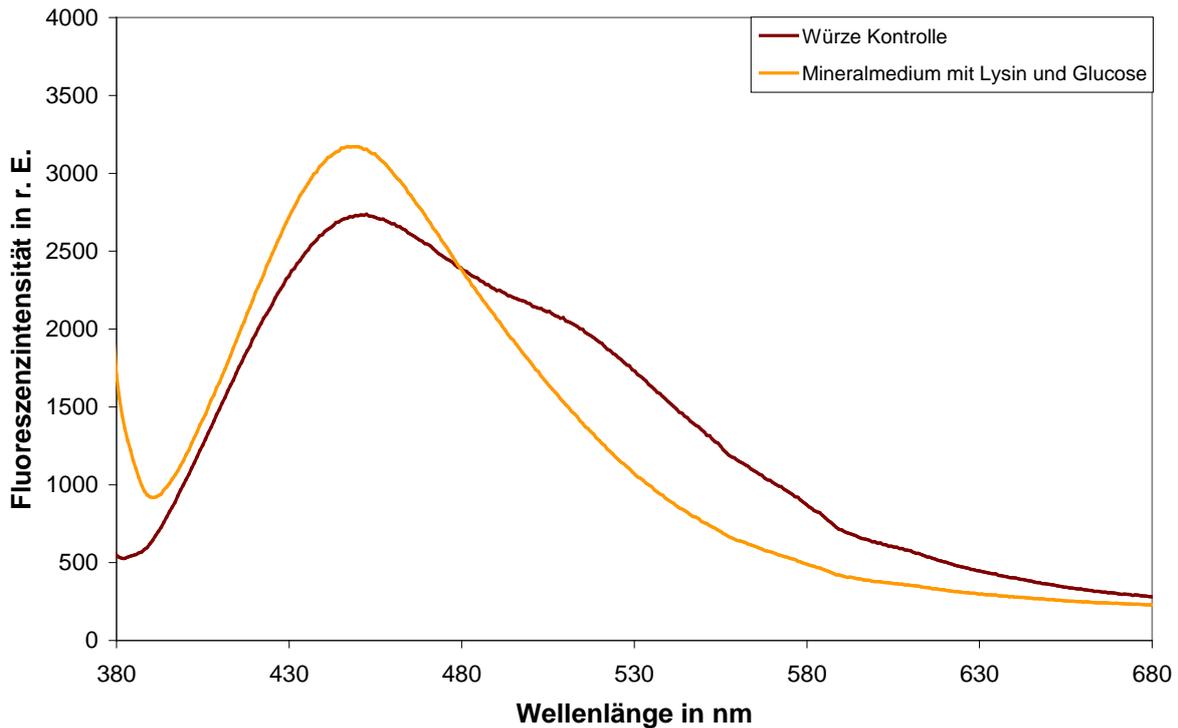


Abb. 4.28: Vergleich der Fluoreszenzemissionen von Würze und dem aus Mineralmedium, Lysin und Glucose nach 90 min Kochen hergestellten Maillardprodukt

Um zu ermitteln, ob die Autofluoreszenz durch die Würzeherstellung (v. a. Darren oder Würzekochen) hervorgerufen wird, wurden zu verschiedenen Produktionsschritten (Gerstenschrot, helles Malzschrot, Melanoidinmalz, nach Einmaischen, vor Würzekochen, nach Würzekochen) Proben vermessen. Allerdings zeigen die vermessenen Proben, dass bereits der unbehandelte Gerstenschrot in diesem Bereich eine Autofluoreszenz besitzt (s. Abb. 4.29). Damit können Maillard-Produkte nicht die Ursache der Würzefluoreszenz sein.

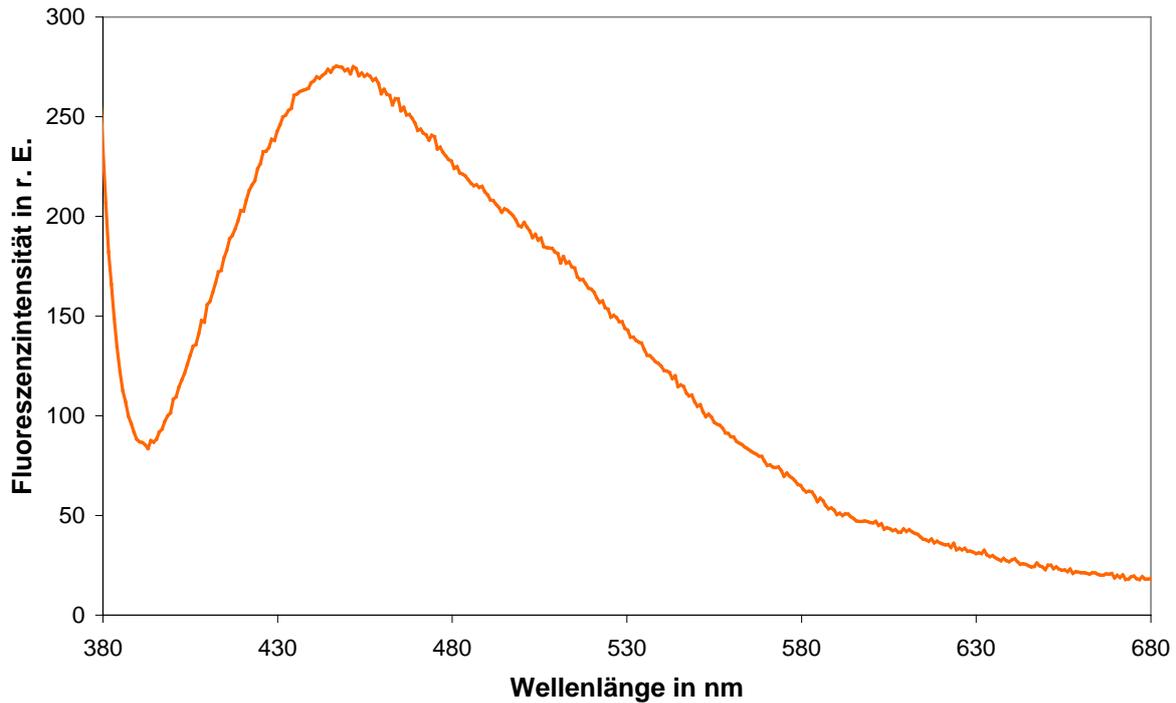


Abb. 4.29: Fluoreszenzemissionsspektrum von geschroteter Sommergerste (Sorte Tipple)

4.3 Charakterisierung des Stoffwechsels bei Mikroorganismen

4.3.1 Ermittlung der Fluorophorverläufe durch Multikomponentenanalyse

Wie bereits in 4.1.1 erwähnt, überlagern sich die Fluoreszenzemissionsspektren der beobachteten Biofluorophore teilweise. Daher wird eine an der Hochschule Mannheim entwickelte Multikomponentenanalyse (MCA) auf die Spektren angewendet (Thomas Beuermann, pers. Mitteilung). Diese gestattet es, aus der gemessenen Kulturfluoreszenz direkt die zeitlichen Verläufe dieser Fluorophore zu erhalten. Die Vorgehensweise der MCA soll hier am Beispiel eines Fluoreszenzspektrums, das während einer Backhefekultivierung aufgenommen wurde, erläutert werden (s. Abb. 4.30).

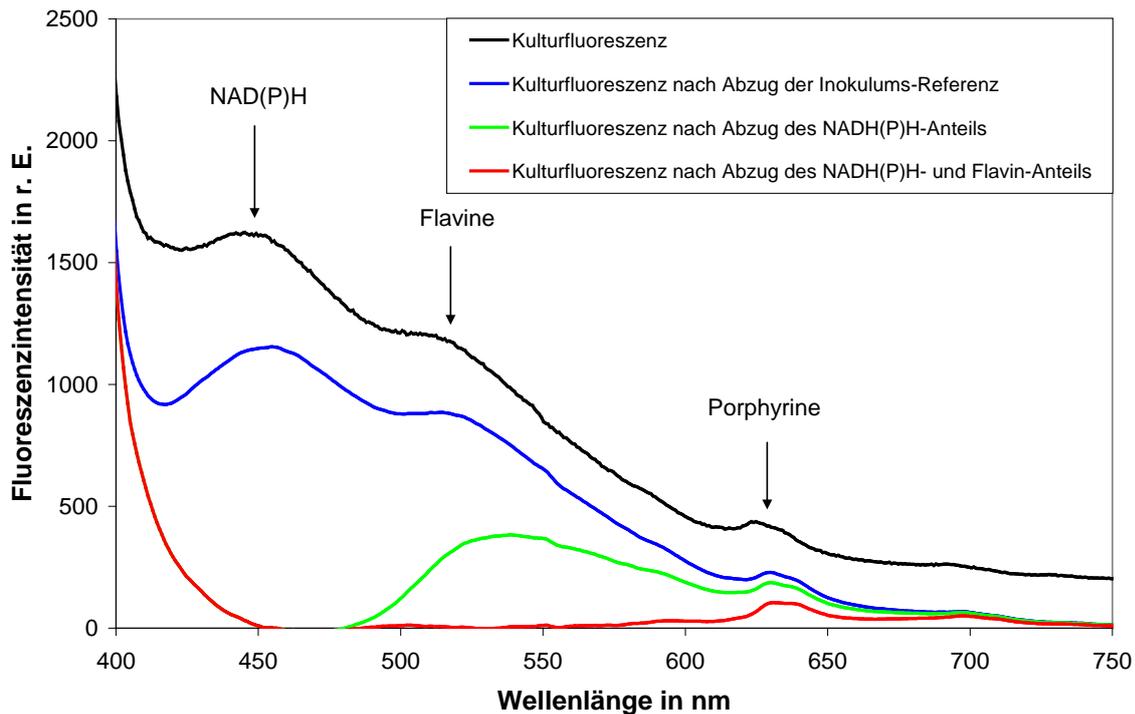


Abb. 4.30: Anwendung der Multikomponentenanalyse am Beispiel einer Backhefekultivierung (Spektrum nach 16 h Fermentationsdauer aufgenommen)

Im Originalspektrum der Kulturfluoreszenz sind drei Bereiche zu erkennen: NAD(P)H-Fluoreszenz bei ca. 450 nm, Flavinfluoreszenz um 530 nm sowie Porphyrinfluoreszenz bei ca. 630 nm. Vor Anwendung der Multikomponentenanalyse wird das Referenzspektrum, das zu Beginn der Kultivierung aufgenommen wird (nach Inokulumzugabe), subtrahiert. Aus dem resultierenden blauen Spektrum werden nun in drei Schritten die Anteile für NAD(P)H, Flavine und Porphyrine bestimmt. Nach Abzug des NAD(P)H-Anteils wird zunächst das hier grün dargestellte Spektrum erhalten. Aus diesem kann anschließend anhand der Fluoreszenzintensität bei 530 nm der Flavinanteil bestimmt werden. Nachdem auch der Flavinanteil abgezogen ist, wird aus dem erhaltenen roten Spektrum schließlich der Porphyrinanteil berechnet. Die breite Emissionsbande zwischen 625 und 635 nm lässt darauf schließen, dass sich die Porphyrinfluoreszenz während dieser Kultivierung vermutlich sowohl aus PPIX (um 635 nm) als auch aus Copro- bzw. Uroporphyrinen (beide um 625 nm) zusammensetzt (vgl. Abb. 4.9, Abb. 4.12). Außerdem ist im Bereich um 600 nm eine geringe Fluoreszenzemission zu erkennen, die auf Zn-Protoporphyrin schließen lässt. Die Flanke zwischen 400 und 450 nm könnte aus einer Überlagerung des Reflexionspeaks der Lichtquelle (hier bis unterhalb ca. 410 nm) und einer Pyridoxinfluoreszenz herrühren (vgl. Abb. 4.2). In den folgenden Ergebnissen, die zum Ziel haben, den Stoffwechsel bei Mikroorganismen zu charakterisieren, wird dieser Bereich nicht berücksichtigt, da der Ursprung dieser Fluoreszenz nicht zweifelsfrei geklärt ist.

4.3.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.2.1 Backhefe

4.3.2.1.1 Aerobe Gärung

Die aerobe Gärung wurde wie unter 3.4.1.1 beschrieben durchgeführt. Es wurde mit 1,5 g Frischhefe/L Fermentationsmedium angeimpft. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Vital-Gold Hefe von DHW.

Bevor auf die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung eingegangen wird, soll anhand der Substrat- bzw. Produktkonzentrationen der Verlauf der aeroben Gärung aufgezeigt werden (s. Abb. 4.31). Die Hefe spaltet mittels Invertase die vorhandene Saccharose in Glucose und Fructose. Die Hydrolyse erfolgt schnell, sodass zehn Minuten nach Beginn der Kultivierung von den ursprünglich eingesetzten 30 g/L Saccharose noch 0,3 g/L im Medium vorhanden sind. Stattdessen liegen etwa 14 g/L Glucose und 15 g/L Fructose zu diesem Zeitpunkt vor. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Backhefe bevorzugt die Glucose verwertet und trotz Belüftung in nennenswertem Maße Ethanol (ca. 11 g/L) produziert. Dies ist auf den Crabtree-Effekt zurückzuführen, der aufgrund der hohen Glucosekonzentration auftritt. Ein weiteres Nebenprodukt der aeroben Gärung ist Glycerin, dessen maximale Konzentration nach 8 h ca. 1,5 g/L beträgt.

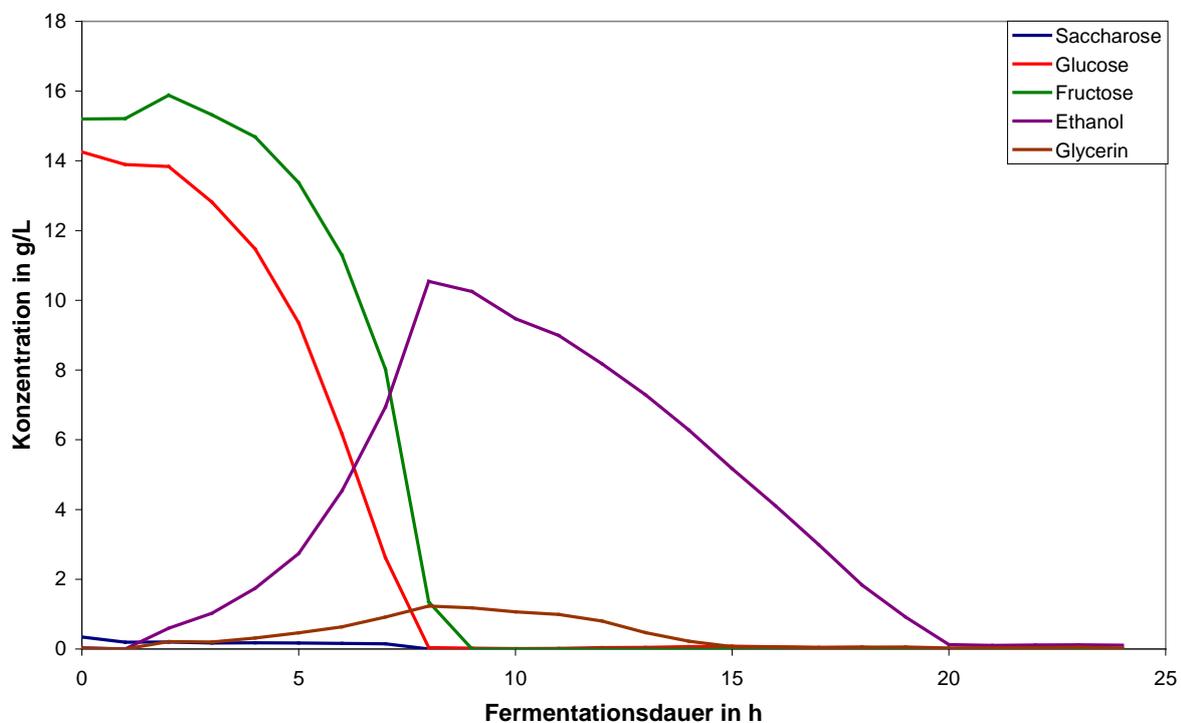


Abb. 4.31: Substrat- und Produktkonzentrationen während der aeroben Gärung, mittels HPLC bestimmt

Alternativ zur HPLC-Analyse lässt sich die Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe auch online durch Analyse des Abgases (IR-Spektrometer bzw. photometrischer Ethanolensensor) ermitteln. Der lineare Zusammenhang zwischen Ethanolbandenfläche im Abgas und Ethanolkonzentration in der Brühe ist in Abb. 3.6 aufgezeigt. Somit können Ethanolproduktion und -konsum durch die Abgasanalyse in Echtzeit verfolgt werden.

Zur Interpretation der Fluoreszenz ist in Abb. 4.32 der zeitliche Verlauf der beobachteten Biofluorophore im Zusammenhang mit anderen relevanten Prozessgrößen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die NAD(P)H-Fluoreszenz zunächst während des Zuckerabbaus (Zeitraum null bis acht Stunden) zunimmt. Sobald dieses Substrat aufgebraucht ist, ist ein Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz um 5 % festzustellen. Ein weiterer Einbruch des Signals um 24 % tritt nach ca. 20 h auf, nachdem das von der Hefe während des Zuckerabbaus gebildete Ethanol vollständig verbraucht ist. Daher ist die rasche Abnahme der NAD(P)H-Fluoreszenz auf einen Mangel an Substrat zurückzuführen. Auffällig ist, dass der Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz bereits detektiert wird, bevor eine Zunahme des Gelöstsauerstoffanteils festgestellt wird, der sonst als Indikator für Substratmangel verwendet wird. Damit ist eventuell ein früheres Eingreifen möglich.

Parallel zur NAD(P)H-Fluoreszenz steigt auch die Flavinfluoreszenz während des Saccharoseabbaus an. Allerdings bleibt die Flavinfluoreszenz während des Ethanolabbaus auf nahezu gleichem Niveau. Im Zeitraum 13-20 h beträgt der Gelöstsauerstoffgehalt zwischen 3 und 7 % und der Anteil der fluoreszierenden oxidierten Flavinform nimmt hier nicht weiter zu. Der leichte Anstieg der Flavinfluoreszenz am Ende des Ethanolabbaus (ca. 20 h) resultiert wahrscheinlich daraus, dass infolge des Substratmangels die dissimilatorischen Prozesse (Citratzyklus, Atmungskette) beendet sind. Somit liegen mehr Flavine und auch NAD(P)H in der oxidierten Form vor, da sie nicht mehr zum oxidativen Abbau des Ethanols reduziert werden. Dadurch kommt auch die Atmungskette zum Erliegen, und die Gelöstsauerstoffkonzentration des Fermentationsmediums steigt nach 20 h rasch von 3 % auf den Ausgangswert bei Fermentationsbeginn an.

Die Porphyrinfluoreszenz nimmt in geringem Maße während der Kultivierung zu, insbesondere erst, nachdem die Zuckerkonzentration deutlich zurückgegangen ist. Dies könnte daran liegen, dass eine hohe Glucosekonzentration die Synthese von Bestandteilen der Atmungskette hemmt, zu denen auch die Porphyrine gehören. Erst nach 8 h, wenn die Glucosekonzentration unterhalb des Repressionslevels von ca. 0,1 g/L liegt, erfolgt der Anstieg der Porphyrinfluoreszenz etwa doppelt so schnell. Eine weitere Erklärung ist, dass zum Abbau des Ethanols die Atmungskettenaktivität erhöht werden muss. Nachdem das Ethanol verbraucht ist, gibt es einen leichten Rückgang bei der Porphyrinfluoreszenz zu verzeichnen. Dieser scheint wie der Anstieg der Flavinfluoreszenz eine Folge des Einstellens der Atmungskettenaktivität zu sein. Ausgehend von diesen Ergebnissen könnte ein

Zusammenhang zwischen der Porphyrinfluoreszenz und der respiratorischen Aktivität bestehen.

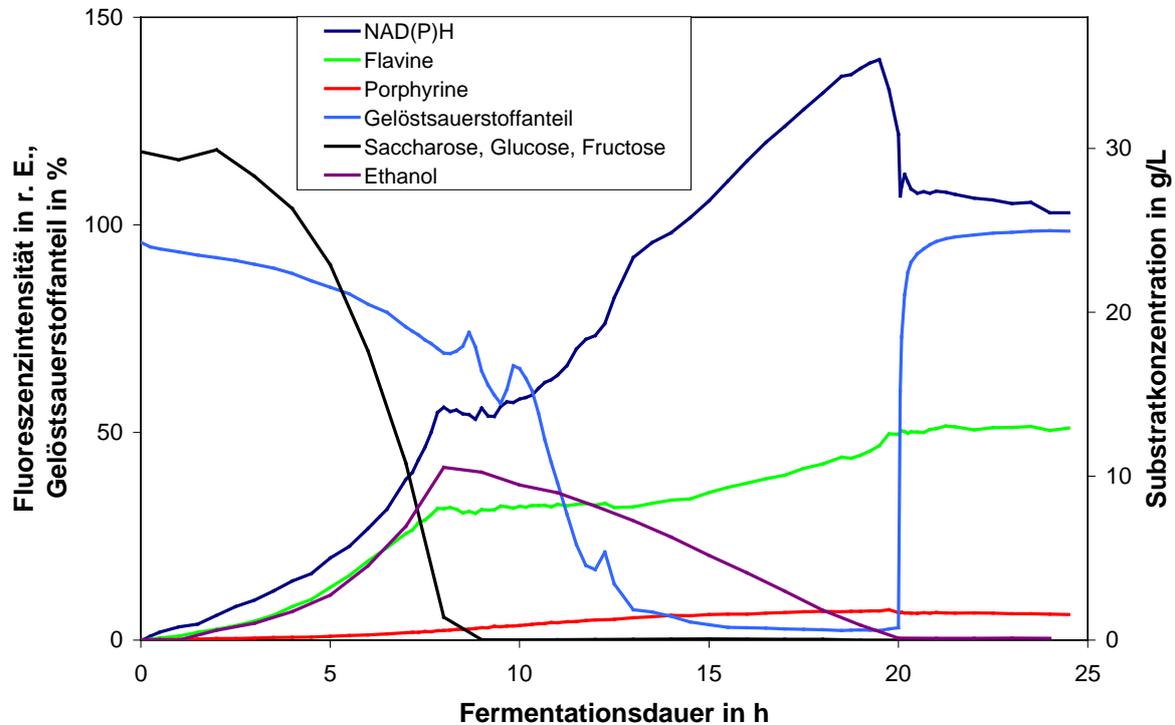


Abb. 4.32: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Biofluorophore, Gelöstsauerstoffanteil und Substrate während der aeroben Gärung

Nachdem das Ethanol verbraucht ist, betreibt die Hefe einen Erhaltungsstoffwechsel (stationäre Phase) und die Fluoreszenzintensitäten der beobachteten Biofluorophore ändern sich im Zeitraum 20-25 h nicht mehr wesentlich.

Einen detaillierten Überblick über die Biofluorophorverläufe liefert Abb. 4.33. Hier sind in Ergänzung zu Abb. 4.32 neben dem Verlauf der Porphyrinfluoreszenzintensität bei 635 nm auch die Porphyrinfluoreszenzintensitätsverläufe bei 612 nm und 625 nm aufgeführt. Bei diesen drei Wellenlängenbereichen ist während der Hefekultivierung Porphyrinfluoreszenz zu erkennen. Insbesondere bei den Untersuchungen zur Änderung der Umgebungsbedingungen sind diese drei Bereiche relevant (s. 4.3.2.3).

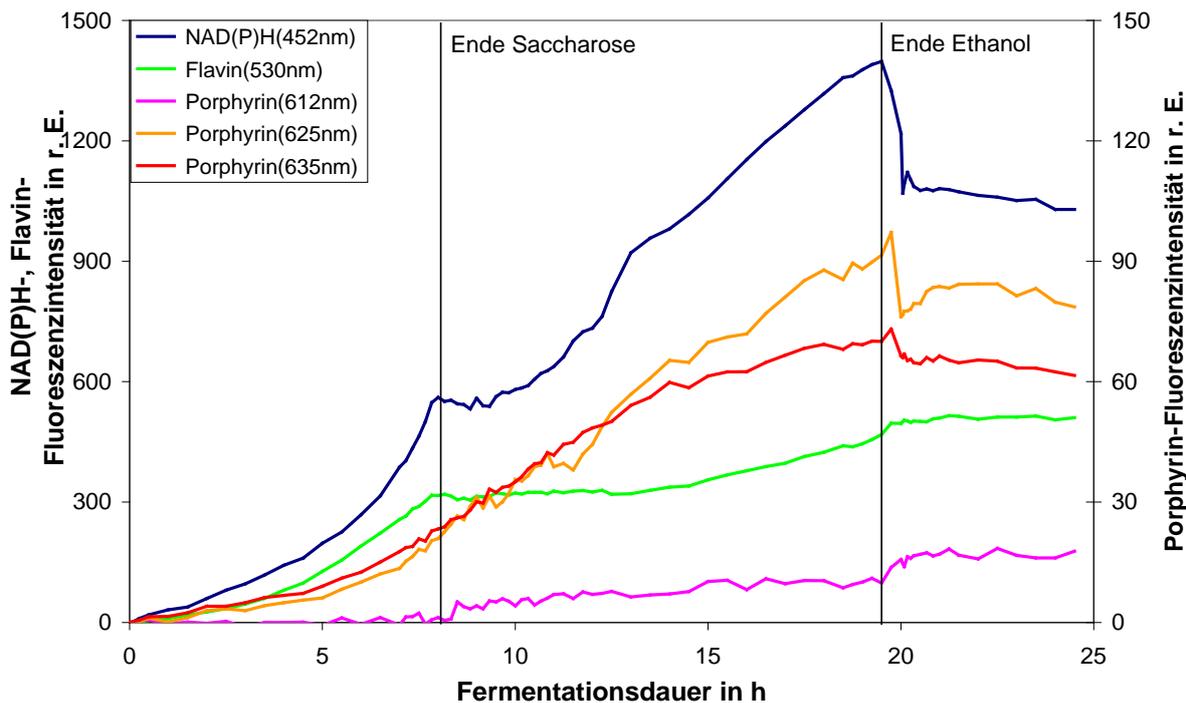


Abb. 4.33: Fluorophorverläufe während der aeroben Gärung von Backhefe

Es ist zu erkennen, dass die Intensitäten von Protoporphyrin IX bei 635 nm und der Porphyrinfluoreszenz um 625 nm sich auf gleichem Niveau befinden und auch einen weitgehend ähnlichen Verlauf zeigen. Dagegen ist die Fluoreszenzintensität bei 612 nm deutlich niedriger und steigt nach dem Ende des Ethanolabbaus um 60 % an, während die Intensität der anderen Porphyrine um etwa 10 % abnimmt.

In Abb. 4.34 ist die Zelldichte, die durch Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde, im Verlauf der aeroben Gärung dargestellt. Das diauxische Wachstum ist gut zu erkennen. Die Animpfdichte liegt bei ca. 15 Millionen Zellen/mL, gegen Ende der Kultivierung beträgt die Zelldichte etwa 300 Millionen Zellen/mL. Während sich die Hefe beim Wachstum auf Saccharose etwa verzehnfacht, verdoppelt sie sich mit Ethanol als Kohlenstoffquelle. Dies ist durch den im Verhältnis zum Saccharoseabbau niedrigeren Energiegewinn des Ethanolabbaus zu erklären. Zum Vergleich ist eine Streulichtmessung aufgetragen und es ist zu sehen, dass beide Verläufe gut übereinstimmen. Die Streulichtmessung erfolgte mit Hilfe des in 3.3.2.1 beschriebenen Aufbaus. Der große Vorteil der online Streulichtmessung ist, dass nicht mehr offline unter dem Mikroskop ausgezählt werden muss. Außerdem treten durch die Verwendung einer langwellig emittierenden NIR-LED als Lichtquelle keine Störungen der Fluoreszenzmessung auf. So kann mit beiden Lichtquellen gleichzeitig online gearbeitet werden, ohne dass sich die optischen Messungen gegenseitig beeinflussen.

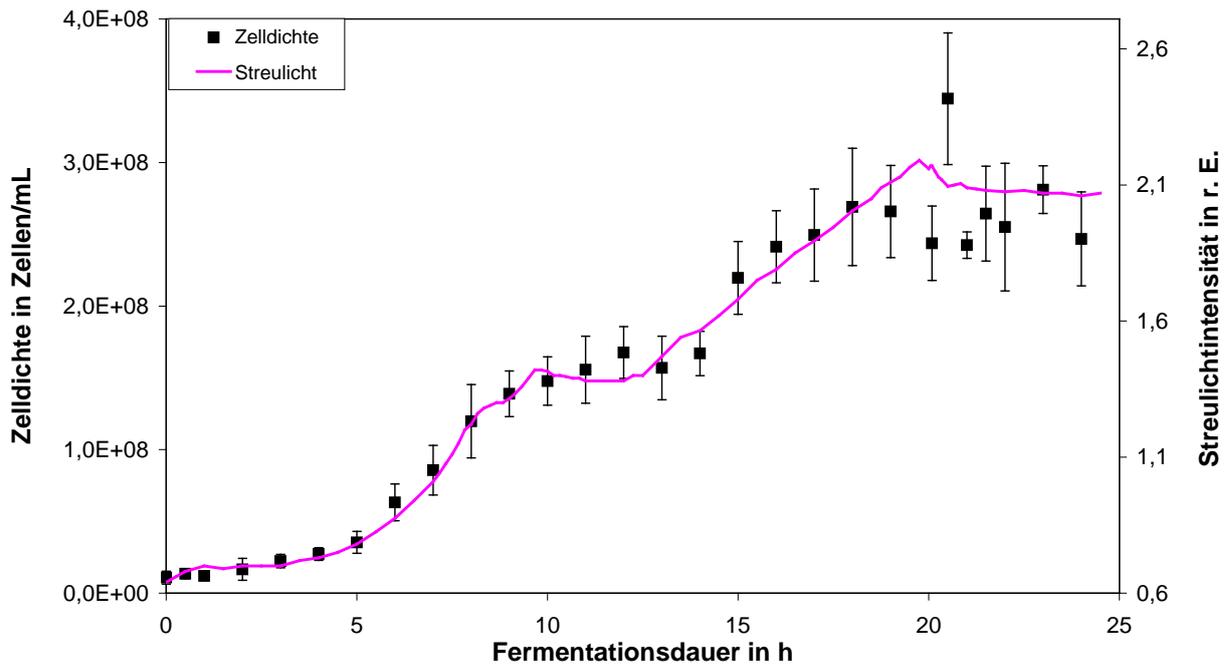


Abb. 4.34: Vergleich zwischen online Streulichtmessung und offline Zellzählung (Neubauer-Zählkammer)

4.3.2.1.2 Atmung

Neben der aeroben Gärung wurde auch die Atmung der Backhefe untersucht. Ziel hierbei war, mögliche Änderungen im Fluoreszenzmuster im Vergleich zur aeroben Gärung zu erkennen. Die Atmung war im Batchbetrieb aufgrund der hohen Saccharosekonzentration nicht möglich, sodass an dieser Stelle eine Fed-Batch-Kultivierung durchgeführt wurde. Es ist zu erwarten, dass es bei der Atmung durch die kontinuierliche und der Zelldichte angepasste Saccharosezufuhr keinen Substratmangel vor Ende der Kultivierung gibt. Außerdem findet im Gegensatz zu aeroben Gärung kein diauxisches Wachstum statt, da während des Saccharose-Zulaufs kein Ethanol gebildet wird, das anschließend als Kohlenstoffquelle genutzt werden könnte.

In Abb. 4.35 sind die Fluorophorverläufe während der Fed-Batch-Kultivierung dargestellt. Wie schon bei der aeroben Gärung (vgl. Abb. 4.33) ist auch hier ein paralleler Anstieg der NAD(P)H- und Flavinforeszenz zu Beginn der Fermentation zu erkennen. Die plötzlichen Rückgänge im Fluoreszenzverlauf zwischen 9 und 11 h sind dadurch zu erklären, dass zu diesen Zeitpunkten Antischaummittel beim Auftreten einer hohen Schaumkrone zudosiert wurde. Sie stehen daher nicht im Zusammenhang mit der Zellvitalität (s. u.). Zwischen zwei Zugaben des Antischaummittels steigt die Fluoreszenz erneut an. Nach ca. acht Stunden

geht die Flavinfluoreszenz im Vergleich zur NAD(P)H-Fluoreszenz etwas zurück. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Saccharose mit einer maximalen Zulauf rate von 0,35 L/h dosiert, nachdem vorher die Zulauf rate linear anstieg. Der Gelöstsauerstoffanteil ist mittlerweile von 100 % (nach 3,5 h) auf 25 % gesunken und nach 12 h herrscht Sauerstofflimitation (s. Abb. 4.36). Auch während der aeroben Gärung steigt unter Sauerstofflimitation die Flavinfluoreszenz langsamer als die NAD(P)H-Fluoreszenz an.

Nachdem die Saccharose-Vorlage leer ist (ca. 16 h), zeigt sich das gleiche Bild wie bei der aeroben Gärung: Die NAD(P)H-Fluoreszenz sinkt um 18 %, während die Flavinfluoreszenz um 15 % ansteigt (s. Abb. 4.35).

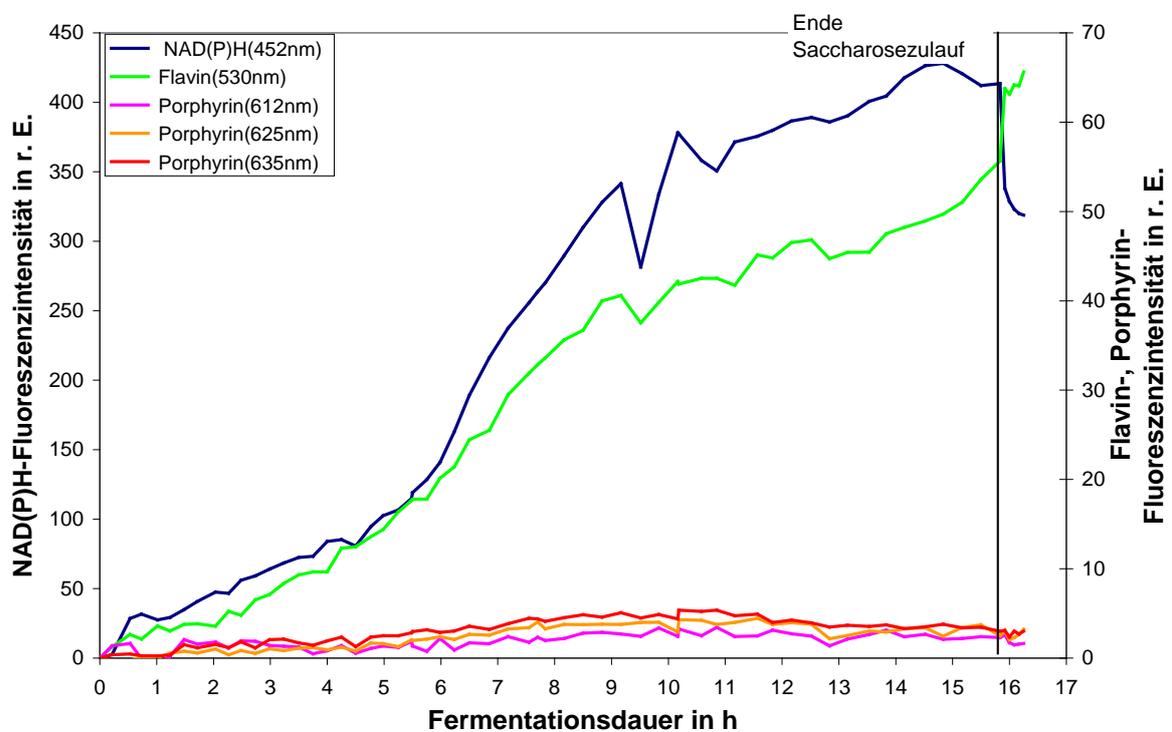


Abb. 4.35: Fluorophorverläufe während der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe

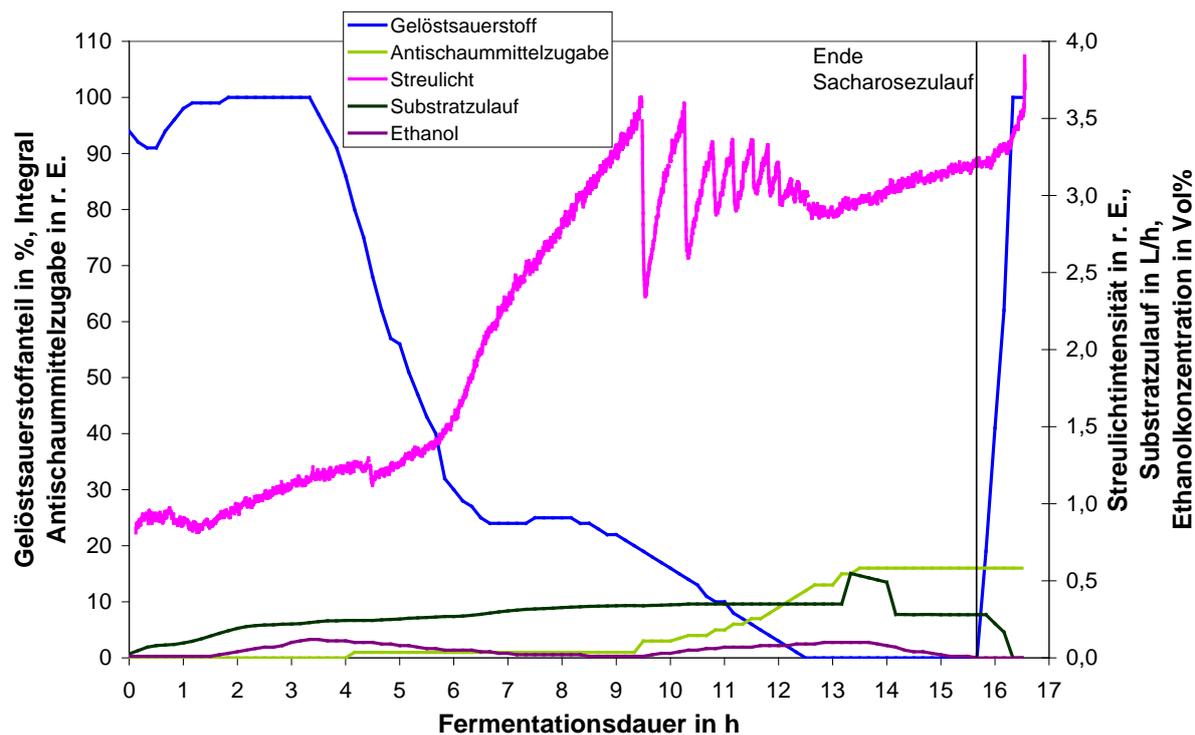


Abb. 4.36: Verläufe des Gelöstsauerstoffanteils, der Streulichtintensität, der aufintegrierten Antischaummittelzugabe, der Substratzulauf rate sowie der Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe während der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe

Die Porphyrinfluoreszenz steigt bis ca. 10 h nach Fermentationsbeginn kontinuierlich an, um danach bis zum Ende der Fermentation wieder auf 60 % der Maximalintensität zu sinken. Allerdings ist die Porphyrinfluoreszenzintensität während der Atmung sehr gering, was die Aussagekraft des Verlaufes erschwert. Neben der Porphyrinfluoreszenzintensität ist auch die Flavinfluoreszenzintensität geringer als bei der aeroben Gärung. Es ist anzumerken, dass bei der Fed-Batch Kultivierung eine andere Backhefe verwendet wurde als bei der aeroben Gärung, sodass diese Unterschiede ebenso stammspezifisch sein können (vgl. 4.3.2.4).

Neben der NAD(P)H-Fluoreszenz zeigt auch das Streulicht die gleichen Störungen durch die zeitweise Zudosierung des Antischaummittels (s. Abb. 4.37, vgl. Abb. 4.36). Die Detektion des Streulichtes erfolgte in höherer Zeitauflösung, weshalb die Einbrüche direkt nach Gabe des Antischaummittels deutlicher erkennbar sind als bei der NAD(P)H-Fluoreszenz. Abgesehen von dieser Störung verlaufen NAD(P)H-Fluoreszenz und Streulicht wie erwartet parallel, da während dieser Kultivierung keine Substratlimitation auftreten sollte. Erst am Ende, nachdem die Saccharosevorlage aufgebraucht ist (ca. 16 h), sinkt die NAD(P)H-Fluoreszenz unabhängig von der Streulichtintensität.

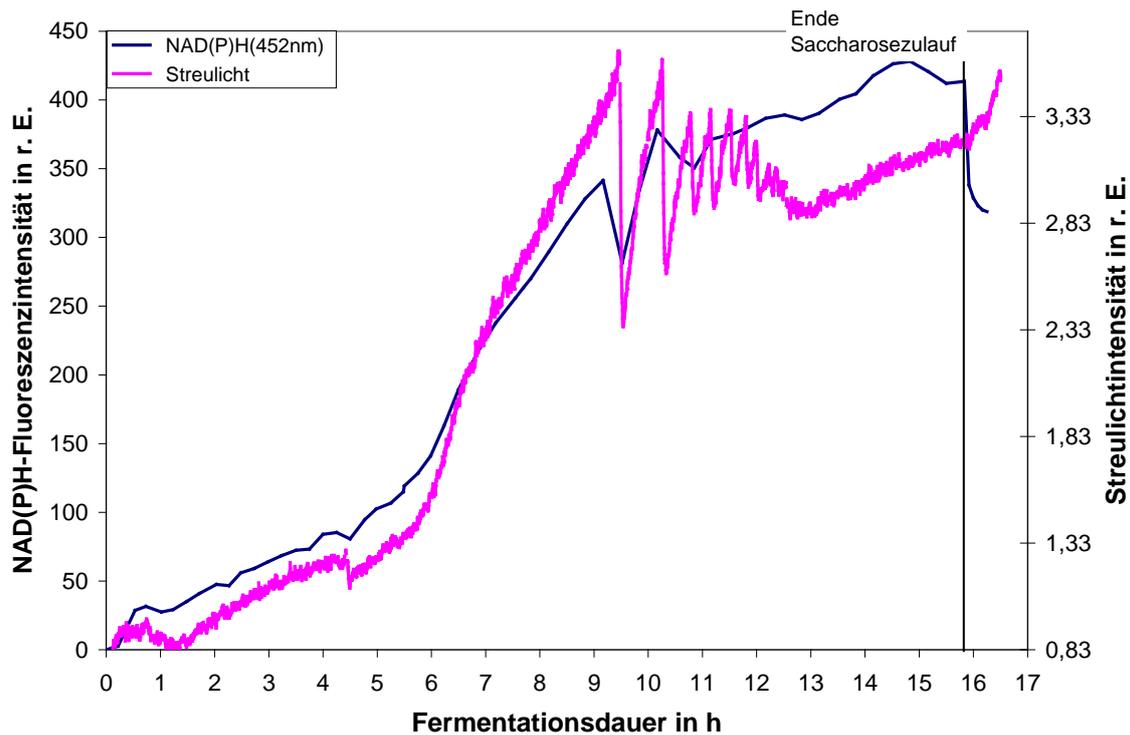


Abb. 4.37: Vergleich zwischen Streulicht- und NAD(P)H-Fluoreszenzverlauf

Der Vergleich Zelldichte-Streulicht ist in Abb. 4.38 aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass beide zeitlichen Verläufe auch bei hohen Zelldichten gut übereinstimmen. Durch das Fed-Batch-Verfahren ist es möglich, wesentlich höhere Zelldichten zu erzielen als im Batch-Betrieb. Dies ist in der Backhefeindustrie erwünscht, sodass dort die Anzucht im Fed-Batch-Verfahren erfolgt.

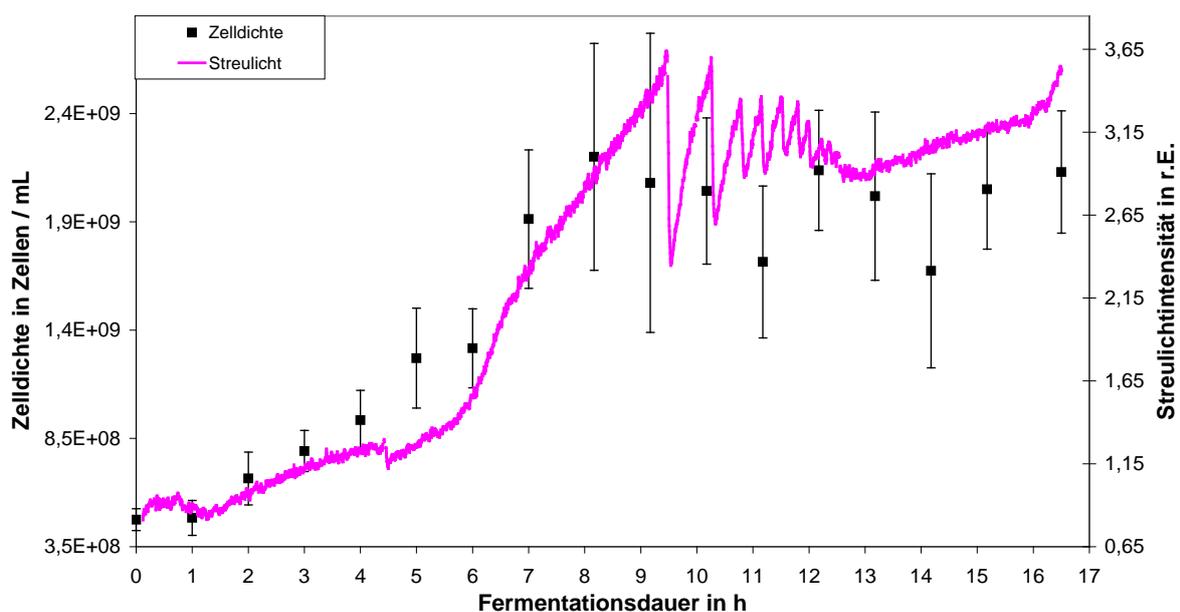


Abb. 4.38: Vergleich zwischen online Streulichtmessung und offline Zellzählung (Neubauer-Zählkammer)

4.3.2.2 Bierhefe

Gemäß den Anforderungen in einer Brauerei wurde der Fluoreszenzmessaufbau während der Gärung sowie Propagation von Bierhefe eingesetzt. Hierfür wurde der untergärige Hefestamm Rh der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin (VLB) als Frischhefe verwendet. Die Versuche wurden in fluoreszenzfreiem Medium für Bierhefe (s. 3.4.1.3) jedoch ohne Saccharose durchgeführt. Die Propagation fand bei 25°C statt, die Gärung wurde bei 22°C durchgeführt. Dies war für eine Gärung üblicherweise zu hoch, ließ sich aber wegen fehlender Kühlmöglichkeiten beim eingesetzten Bioreaktor nicht anders realisieren.

4.3.2.2.1 Aerobe Gärung (Propagation)

Im Gegensatz zu den anderen Hefekultivierungen fällt bei der Bierhefe auf, dass zu Beginn die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität etwas zurückgeht (s. Abb. 4.39). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich um Frischhefe handelte, die im Anschluss an den Gärprozess in der Brauerei gewonnen wurde, und sich daher an die neuen Umgebungsbedingungen erst anpassen musste. Des Weiteren fällt auf, dass die Flavinfluoreszenzintensität nur ca. 10 % der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität beträgt und damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die Porphyrinfluoreszenz liegt. Dies ist deutlich niedriger als z. B. bei der zuvor betrachteten DHW Backhefe. Dort beträgt die Flavinfluoreszenzintensität etwa 30-40 % der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität.

Der starke Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenz im Bereich von 7-17 h ist durch die exponentielle Wachstumsphase der Bierhefe in diesem Zeitraum zu erklären (s. Abb. 4.39). Die Zelldichte nimmt während der Propagation ca. um den Faktor neun zu (s. Abb. 4.41). Anschließend befindet sich die Hefe in der stationären Phase und die NAD(P)H-Fluoreszenz nimmt nur gering zu. Der kurze Rückgang nach ca. 38 h ist auf eine Anpassung des pH-Wertes von 4,1 auf 4,6 mit Natronlauge (5 mol/L) zurückzuführen. Der pH-Wert wurde zu diesem Zeitpunkt angepasst, um ein zu starkes Ansäuern des Mediums und damit eine Beeinträchtigung der Hefe zu verhindern.

Einen ähnlichen Verlauf wie NAD(P)H während der stationären Phase zeigen auch die Porphyrine bei 625 und 635 nm. Auffällig ist, dass nach ca. 15 h die Fluoreszenzintensität bei 625 nm stärker zunimmt als die bei 635 nm, nämlich um bis zu 150 % gegenüber 70 %. Zu diesem Zeitpunkt sind die vorgelegten Monosaccharide Glucose und Fructose bereits verbraucht und die Hefe nutzt nur noch Maltose als Kohlenstoffquelle (s. Abb. 4.40). Es ist ferner festzustellen, dass, solange die beiden Monosaccharide im Medium vorhanden sind (0 - 15 h), die Porphyrinfluoreszenz nicht ansteigt.

Die Flavinfluoreszenz steigt bis zum Ende der log-Phase um 70 % an und verharrt dann während der nächsten ca. 13 h auf diesem Niveau. Nach 30 h Fermentationsdauer erfolgt erneut ein Anstieg um 60 % bis zum Abbruch der Kultivierung nach 49 h. Zu diesem Zeitpunkt (30 h) fängt die Hefe an, neben der Maltose auch das Ethanol als Kohlenstoffquelle zu nutzen (s. Abb. 4.40).

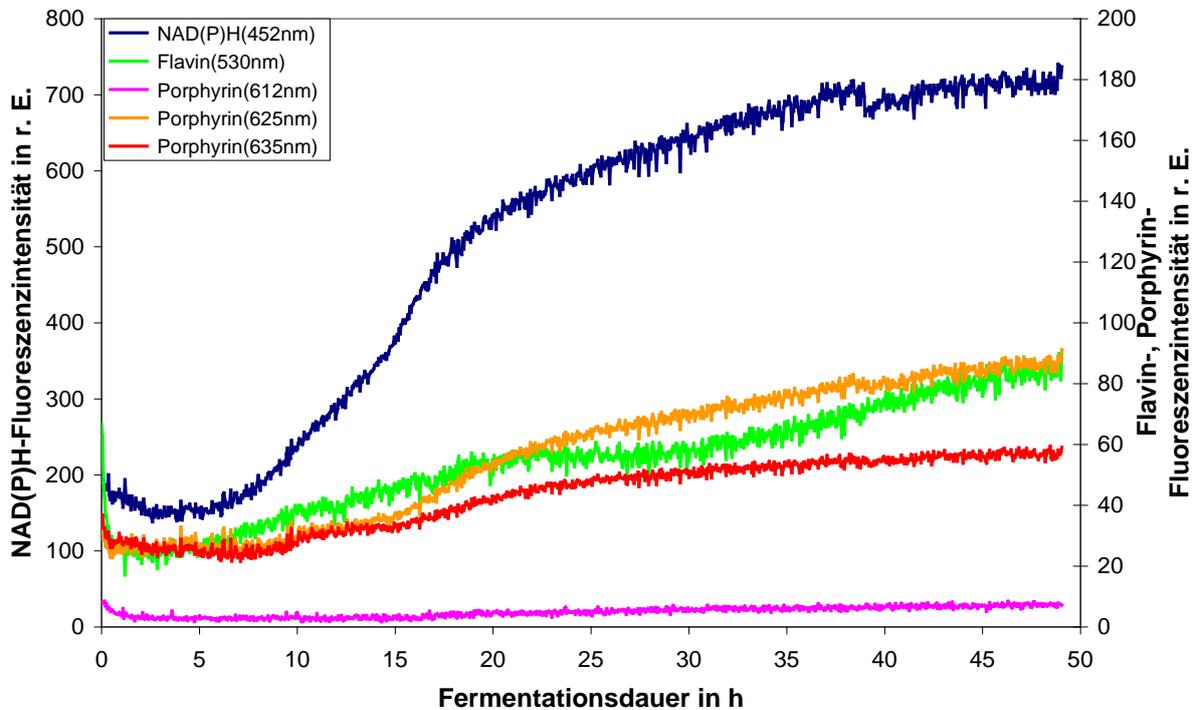


Abb. 4.39: Fluorophorverläufe der Bierhefe-Propagation

Anhand der in Abb. 4.40 dargestellten Substrat- und Produktverläufe ist zu erkennen, dass die Monosaccharide bevorzugt abgebaut werden und erst nach deren weitgehendem Verzehr die Maltose als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Des Weiteren ist zu sehen, dass auch nach 49 h die Maltose noch nicht vollständig abgebaut ist, es liegen noch etwa 2 g/L im Medium vor. Außerdem fängt die Hefe bereits nach ca. 30 h an, parallel zur Maltose das Ethanol zu verstoffwechseln, wenn auch in geringem Maße. Damit ist erklärbar, dass zum Zeitpunkt des Abbruches der Kultivierung kein Absinken der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität auftritt, wie es beim Wechsel von Maltose- auf Ethanolabbau zu erwarten gewesen wäre.

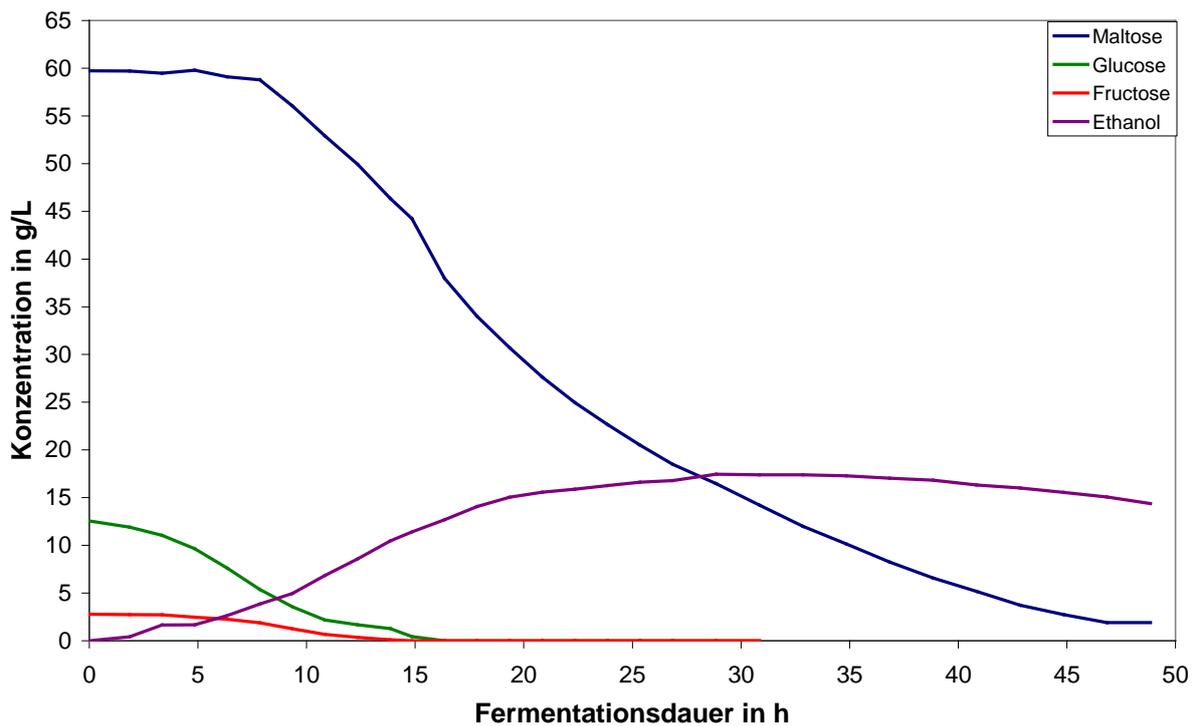


Abb. 4.40: Substrat- und Produktverläufe während der aeroben Gärung von Bierhefe

In Abb. 4.41 ist der Vergleich zwischen Streulichtintensität und Zellzählung aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass nach ca. 20 h beide Messungen nicht mehr parallel verlaufen. Die Zellzählung ergibt einen relativ konstanten Wert um 100 Millionen Zellen/mL, während die Streulichtintensität im Zeitraum 20-50 h linear zunimmt. Ein Problem bei der Zellzählung stellt die zunehmende Aggregation der Bierhefezellen dar. Dies führt nach etwa 20 h zu den gezeigten hohen Standardabweichungen, da die ermittelten Zellzahlen stark schwanken.

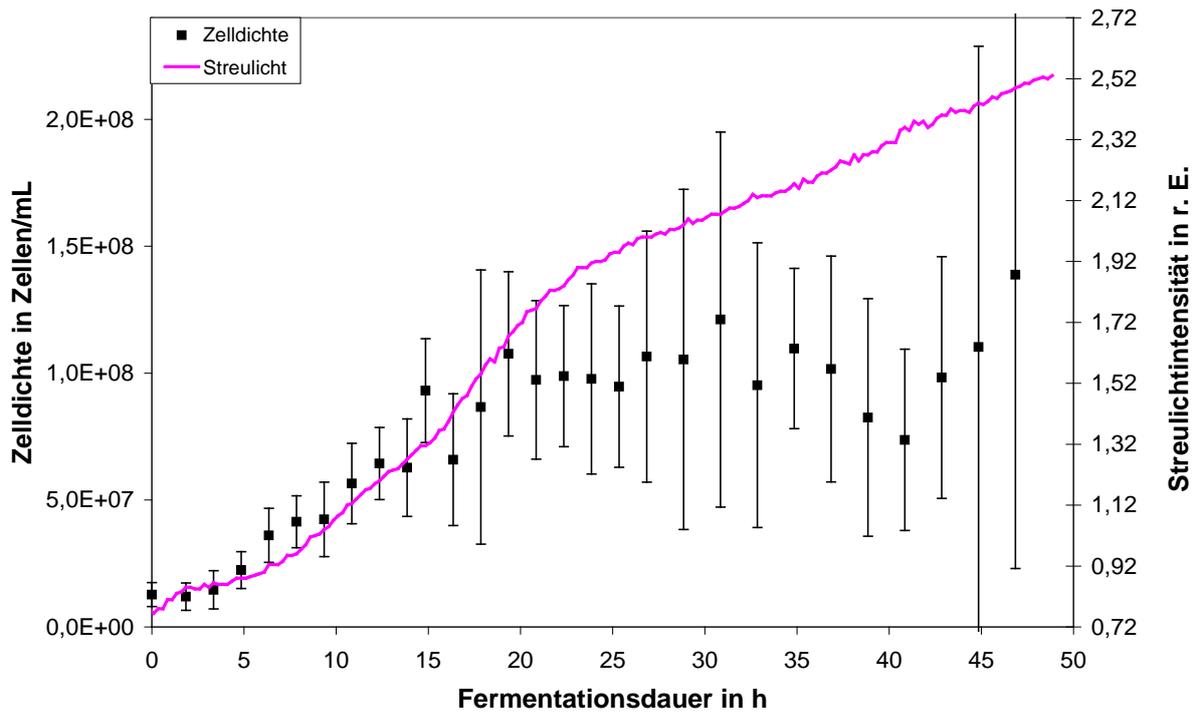


Abb. 4.41 Vergleich zwischen Streulichtmessung und Zellzählung während der Bierhefe-Propagation

4.3.2.2.2 Gärung

Auch bei der Gärung geht die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität während der ersten Stunden etwas zurück (s. Abb. 4.42). Gegen Ende der Gärung, nachdem die Maltose weitgehend aufgebraucht ist (s. Abb. 4.43), sinkt die NAD(P)H-Fluoreszenz um 7 %. Dies ist trotz einiger Schwankungen im Fluoreszenzsignal noch erkennbar. Dieser Rückgang ist auch bei den Versuchen an Backhefe nach Ende des Saccharoseabbaus zu erkennen.

Nicht nur die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität sinkt während der ersten Stunden. Dieses Verhalten ist auch bei der Flavinforeszenz zu beobachten. Nachdem die Flavinforeszenz nach etwa 12 h wieder auf ihren Anfangswert angestiegen ist, verharrt sie bis zum Ende der Gärung auf diesem Niveau. Dies ist durch die anoxische Umgebung begründet. Für eine

Zunahme der Flavinfluoreszenzintensität wird Sauerstoff benötigt, da nur die oxidierte Form (FAD, FMN) fluoresziert.

Wie bereits bei der Propagation steigt auch hier die Porphyrinfloureszenz bei 625 nm stark an, nachdem Glucose und Fructose verbraucht sind. Allerdings nimmt hier die Intensität um das Zehnfache zu und liegt damit ca. um den Faktor sechs höher als im vergleichbaren Zeitraum während der Propagation. Der Anstieg der Fluoreszenz bei 612 nm scheint aus der Zunahme der breiten Emissionsbande der Porphyrinfloureszenz um 625 nm herzurühren. Diese Überlagerung wird in der Mehrkomponentenanalyse nicht berücksichtigt. Die Porphyrinfloureszenz bei 635 nm nimmt währenddessen um das Vierfache zu.

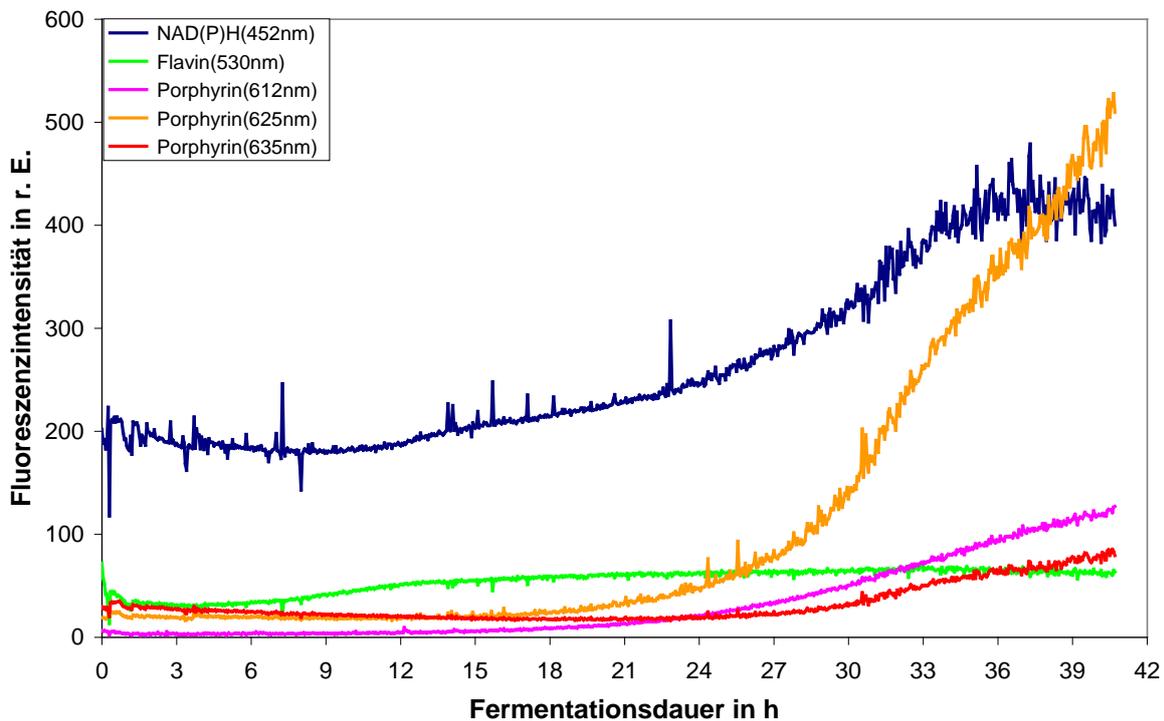


Abb. 4.42: Fluorophorverläufe bei der Bierhefe-Gärung

In der folgenden Abbildung sind die Substrat- und Produktverläufe während der Gärung von Bierhefe aufgetragen (s. Abb. 4.43). Der leichte Rückgang der Ethanolkonzentration um 1,7 % gegen Ende der Gärung ist nicht in der Dissimilation durch Hefe begründet, da sie nicht in der Lage ist, Ethanol unter anaeroben Bedingungen zu verstoffwechseln. Der hier dargestellte Rückgang der Konzentration liegt innerhalb der Standardabweichung von 2,8 %, und ist daher auf die Analysenmethode zurückzuführen.

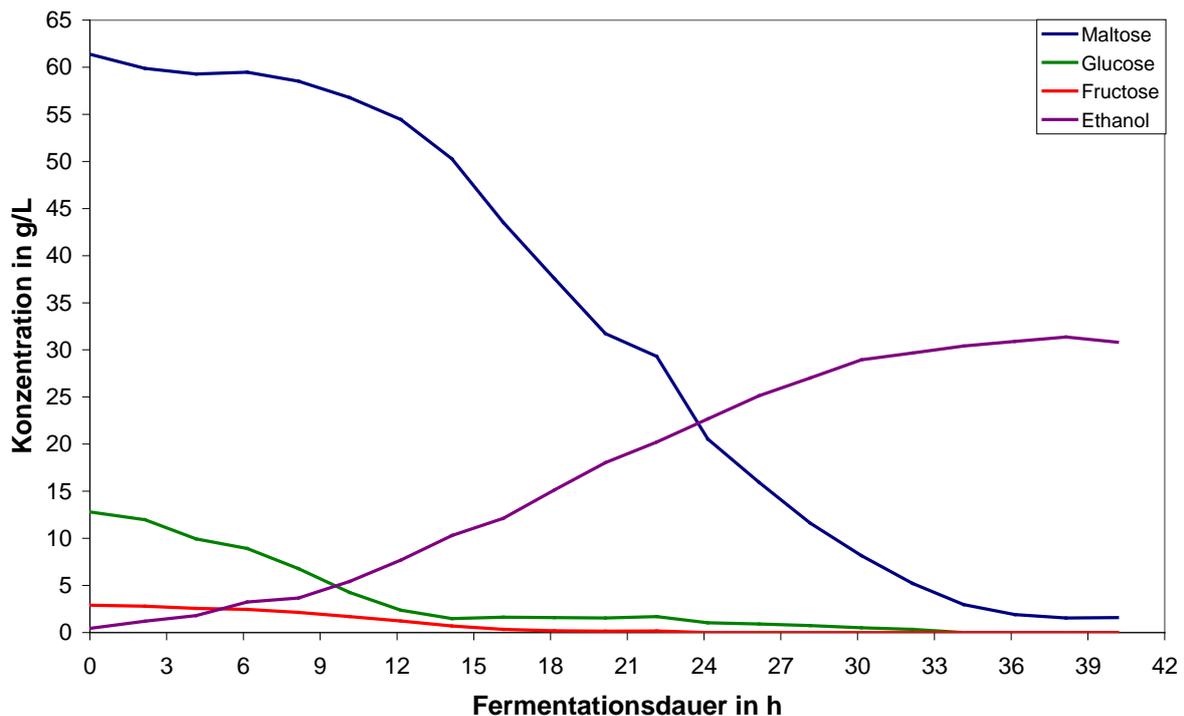


Abb. 4.43: Substrat- und Produktverläufe bei der Bierhefe-Gärung

4.3.2.3 Fluoreszenzmuster bei Änderung der Umgebungsbedingungen

Zusätzlich zu den Standard-Kultivierungen wurden zu bestimmten Zeitpunkten die Umgebungsbedingungen während der Kultivierung variiert, um eventuell damit einhergehende Änderungen im Fluoreszenzmuster zu detektieren. Diese Veränderungen bezogen sich auf Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffzufuhr und Substratangebot.

4.3.2.3.1 Temperatur

Bei diesen Versuchen wurde im Verlauf der Kultivierung die Temperatur um 5 - 10°C erhöht. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf aerobe Gärungen der Brenneriehefe Ethanol Red, der Bierhefe W-34/70 sowie den Backhefen von DHW und Wienerer. Eine weitere Temperaturveränderung wurde bei der Gärung der Bierhefe Rh durchgeführt. Die Temperaturerhöhung (ggf. auch –senkung) erfolgte jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung.

In Abb. 4.44 sind die Fluorophorverläufe während der Ethanol Red Kultivierung dargestellt.

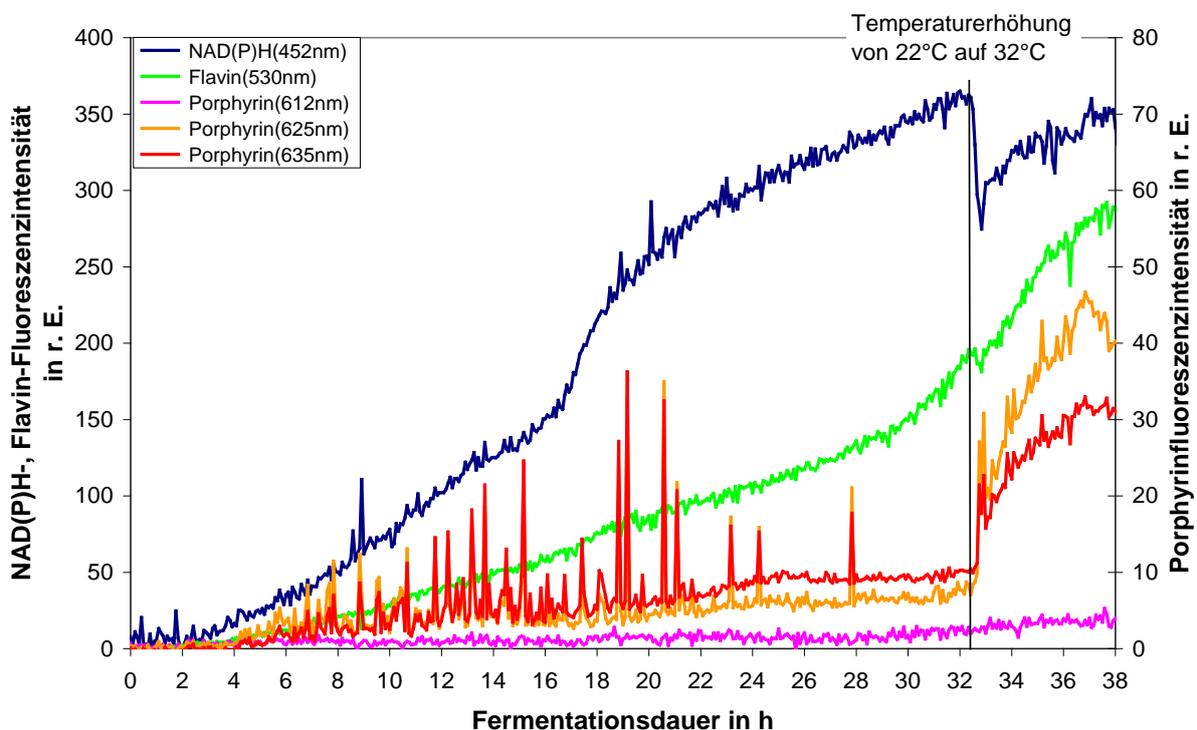


Abb. 4.44: Fluorophorverläufe während einer Standard Ethanol Red Kultivierung, bei der nach ca. 32 h eine Temperaturerhöhung von 22°C auf 32°C stattfand

Nach ca. 32 h Kultivierungsdauer wurde die Temperatur von 22°C auf 32°C erhöht. Nach Erhöhung der Temperatur ist ein rascher Abfall der NAD(P)H-Fluoreszenz um 25 % zu verzeichnen, während die Porphyrinfluoreszenz sprunghaft um das Doppelte bei 635 nm bzw. Dreifache bei 625 nm ansteigt. Es fällt auf, dass der Anteil der bei 625 nm fluoreszierenden Porphyrine im Verhältnis zur Porphyrinfluoreszenz bei 635 nm zunimmt. Die Fluoreszenzintensität um 612 nm bleibt nach der Temperaturerhöhung unverändert auf niedrigem Niveau. Die Flavinfluoreszenz geht nach der Temperaturerhöhung ebenfalls zurück - wenngleich weniger als die NAD(P)H-Fluoreszenz, nämlich nur um 8 %.

In Abb. 4.45 ist der Vergleich zwischen Streulichtintensität und der Zelldichte dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Temperaturerhöhung während der stationären Phase stattfand. Der Rückgang im Streulichtsignal nach etwa 32 h ist auf die Temperaturerhöhung zurückzuführen. Allerdings erfolgt innerhalb der nächsten 30 min der Anstieg der Streulichtintensität auf den ursprünglichen Wert. Wie bereits bei der Bierhefegärung setzt sich auch hier während der stationären Phase ab etwa 26 h der Anstieg der Streulichtintensität fort, während die Zelldichte nicht weiter zunimmt. Allerdings ist die Abweichung hier nicht so ausgeprägt wie bei der Gärung. Dort beträgt sie bis zu 100 %, während bei der Ethanol Red Kultivierung Streulichtintensität und Zelldichte um bis zu 70 % differieren.

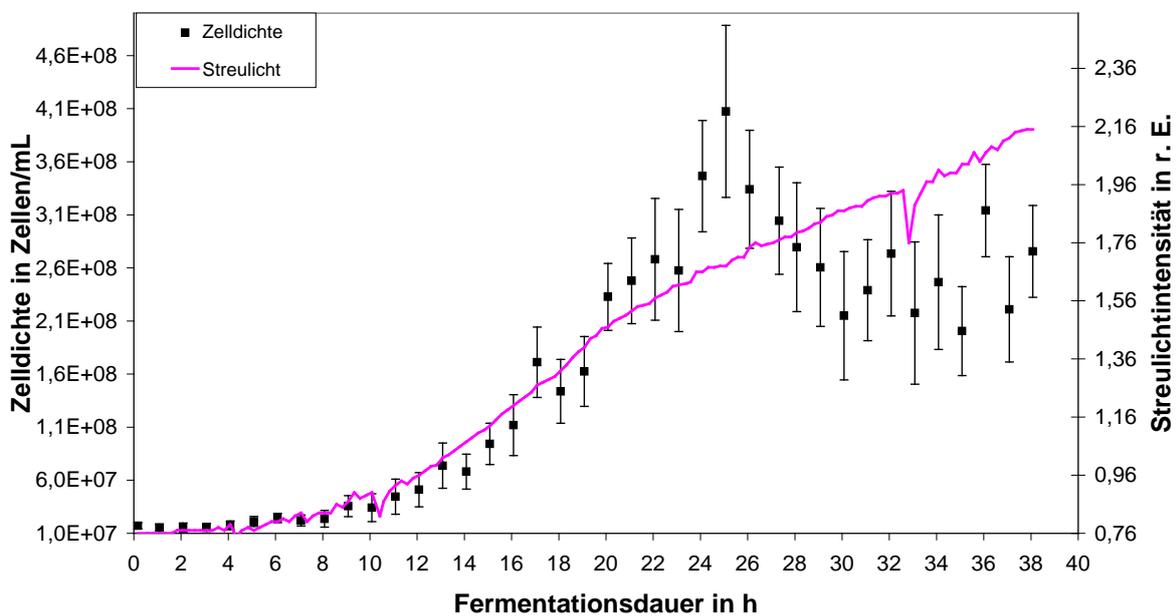


Abb. 4.45: Vergleich von Zelldichte und Streulichtintensität während einer Standard Ethanol Red Kultivierung, bei der nach ca. 32 h eine Temperaturerhöhung von 22°C auf 32°C stattfand

Abb. 4.46 zeigt die Fluorophorverläufe während der aeroben Gärung von W-34/70. Hier wurde nach etwa 7 h Kultivierungsdauer die Temperatur von 25°C auf 35°C erhöht.

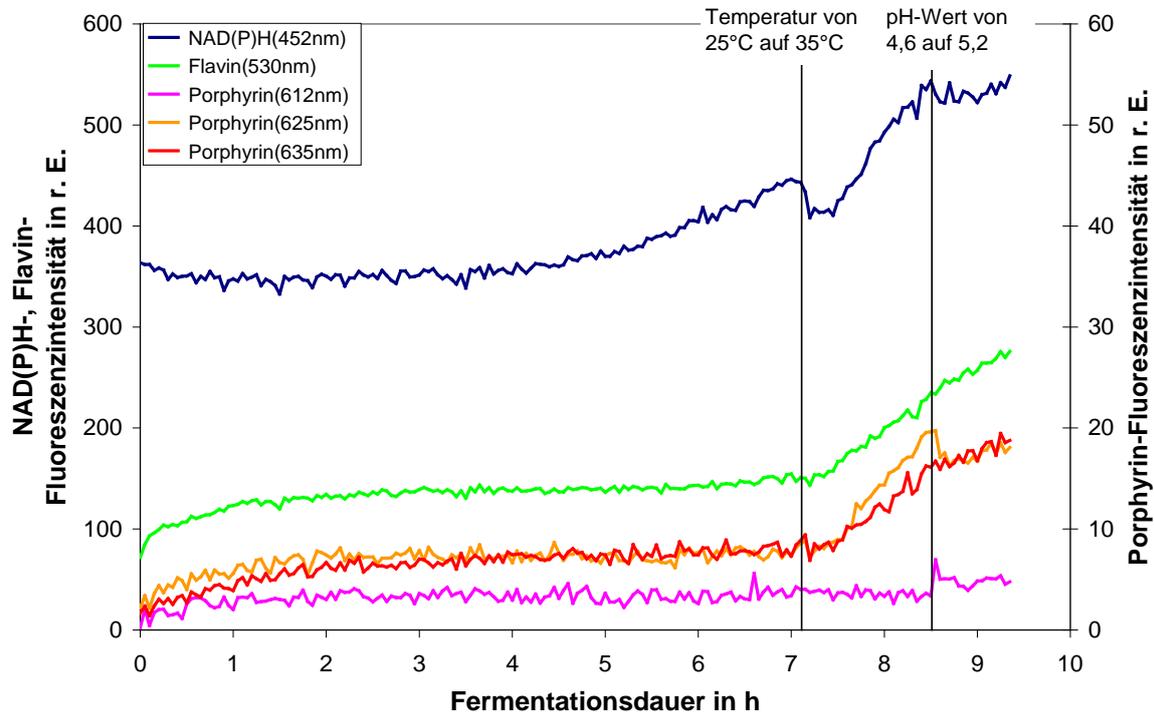


Abb. 4.46: Fluorophorverläufe während einer Standard W-34/70 Kultivierung, bei der nach ca. 7 h die Temperatur von 25°C auf 35°C erhöht wurde

Wie bereits bei der Kultivierung der Brennereihefe Ethanol Red steigen auch bei der Bierhefe nach der Temperaturerhöhung die Porphyrin-Fluoreszenzintensitäten deutlich an, nämlich um 80 % bei 635 nm bzw. um 110 % bei 625 nm, während die NAD(P)H-Fluoreszenz kurzzeitig um 8 % einbricht. Dieses Verhalten scheint somit unabhängig vom Hefestamm zu sein. Allerdings nimmt bei der hier betrachteten Bierhefe auch die Flavin-Fluoreszenzintensität plötzlich um 50 % zu, während bei der Ethanol Red Kultivierung der schon vorher stattfindende Anstieg der Flavinfluoreszenz nahezu unverändert fortgesetzt wird. Dieses unterschiedliche Verhalten der Flavinfluoreszenz kann darin begründet sein, dass die Temperaturerhöhung bei beiden Kultivierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftritt. Während die Bierhefe W-34/70 sich nach sieben Stunden von ca. 50 auf 100 Millionen Zellen/mL erst verdoppelt hat und am Beginn der log-Phase befindet (s. Abb. 4.47), baut die Brennereihefe Ethanol Red nach 32 h bereits die Maltose ab, nachdem die im Medium vorhandene Glucose und Fructose schon vollständig verstoffwechselt wurden. Sie hat sich bereits von 15 auf ca. 250 Millionen Zellen/mL vermehrt und befindet in der stationären Phase (s. Abb. 4.45). Eventuell reagieren Zellen am Anfang der log-Phase anders auf eine Temperaturerhöhung als Zellen, die sich in der stationären Phase befinden.

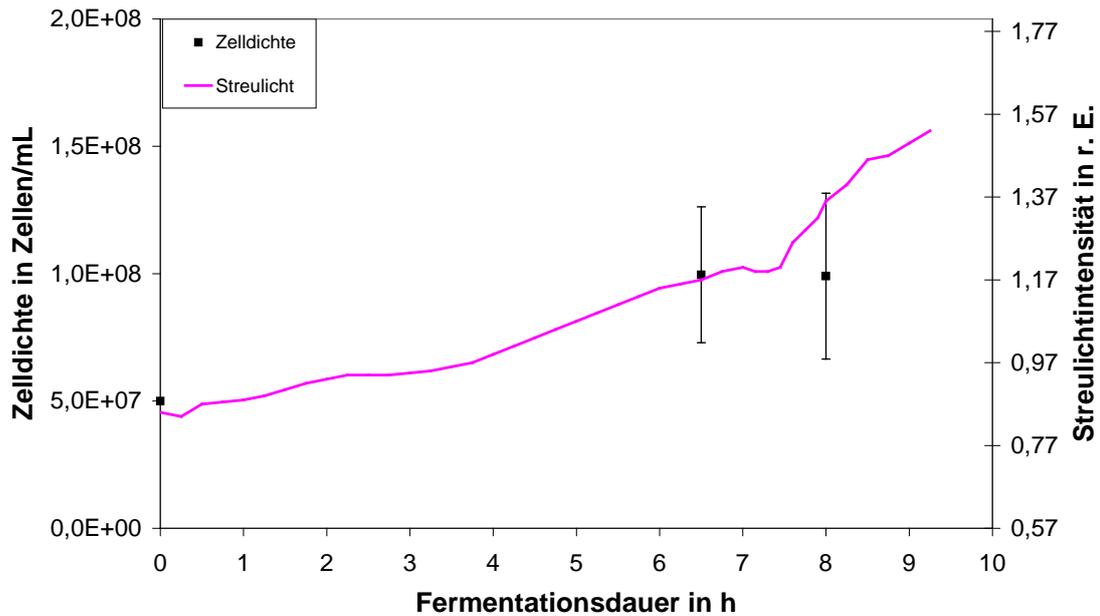


Abb. 4.47: Vergleich zwischen Zelldichte und Streulichtintensität während einer Standard W-34/70 Kultivierung, bei der nach ca. 7 h die Temperatur von 25°C auf 35°C erhöht wurde

Zusätzlich zur Temperaturänderung wurde nach ca. 8,5 h der pH-Wert leicht verändert, um weitere Auswirkungen auf das Fluoreszenzmuster beobachten zu können. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde er nicht geregelt (vgl. 3.4.1.3), sodass er zwischen 4,6 und 5,8 schwankte (s. Abb. 4.48). Durch die Regelung von 4,6 auf 5,2 ist ein Rückgang der Porphyrinfluoreszenz bei 625 nm um 15 % zu beobachten, wohingegen während der vorher stattfindenden Temperaturerhöhung ein Anstieg erfolgt (s. Abb. 4.46). Im Gegensatz dazu steigt die Porphyrinfluoreszenz um 612 nm nach der pH-Wert-Erhöhung um 60 % an. Dies könnte entweder durch eine kurzweilige Verschiebung der Porphyrinfluoreszenzemission bei 625 nm verursacht sein, oder durch die Bildung eines weiteren Fluorophors, dessen Fluoreszenzemissionsmaximum um 612 nm liegt.

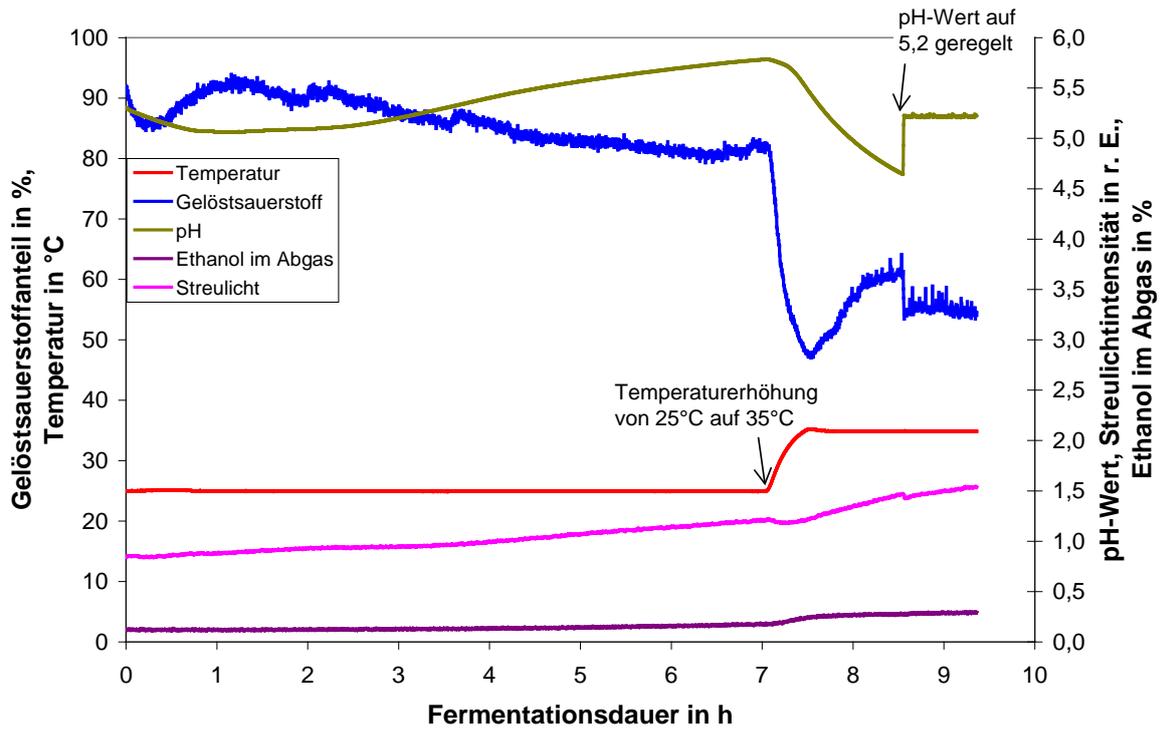


Abb. 4.48: Zeitliche Verläufe des Gelöstsauerstoffanteils, der Temperatur, des pH-Werts, der Streulichtintensität und der Ethanolkonzentration im Abgas während der Kultivierung von W-34/70

Bei der aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold) sind nur geringe Veränderungen im Fluoreszenzmuster bei Temperaturerhöhung von 32°C auf 37°C zu beobachten (s. Abb. 4.49). Dies mag zum einen auf die geringere Temperaturdifferenz von 5°C zurückzuführen sein, zum anderen kann auch der Hefestamm ursächlich sein, da Backhefe besser an etwas höhere Temperaturen angepasst ist als Bierhefe. Tendenziell lässt sich aber auch hier bei der ersten Temperaturerhöhung nach etwa 2,5 h ein kurzer Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz um 4 % sowie ein Anstieg der Flavin- bzw. Porphyrin-Fluoreszenz um 30 % bzw. 20 % erkennen. Bei der zweiten Temperaturerhöhung nach ca. 5,5 h ist ein deutlicher Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz um 15 % zu beobachten. Zwischen diesen beiden Temperaturerhöhungen wurde die Temperatur wieder auf 32°C gesenkt (Zeitpunkt ca. 4 h), um auch hier gegebenenfalls eine Veränderung im Fluoreszenzmuster zu erkennen. Tatsächlich steigen nach der Temperatursenkung die NAD(P)H- sowie die Porphyrin-Fluoreszenzintensität bei 625 nm um 8 % bzw. 13 % an. Ebenso verhält es sich nach der zweiten Temperatursenkung auf 32°C, die im Anschluss an die zweite Temperaturerhöhung stattfand (Zeitpunkt etwa 6 h). Der Anstieg beträgt bei der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität 12 % bzw. 20 % bei der Porphyrinfluoreszenzintensität um 625 nm.

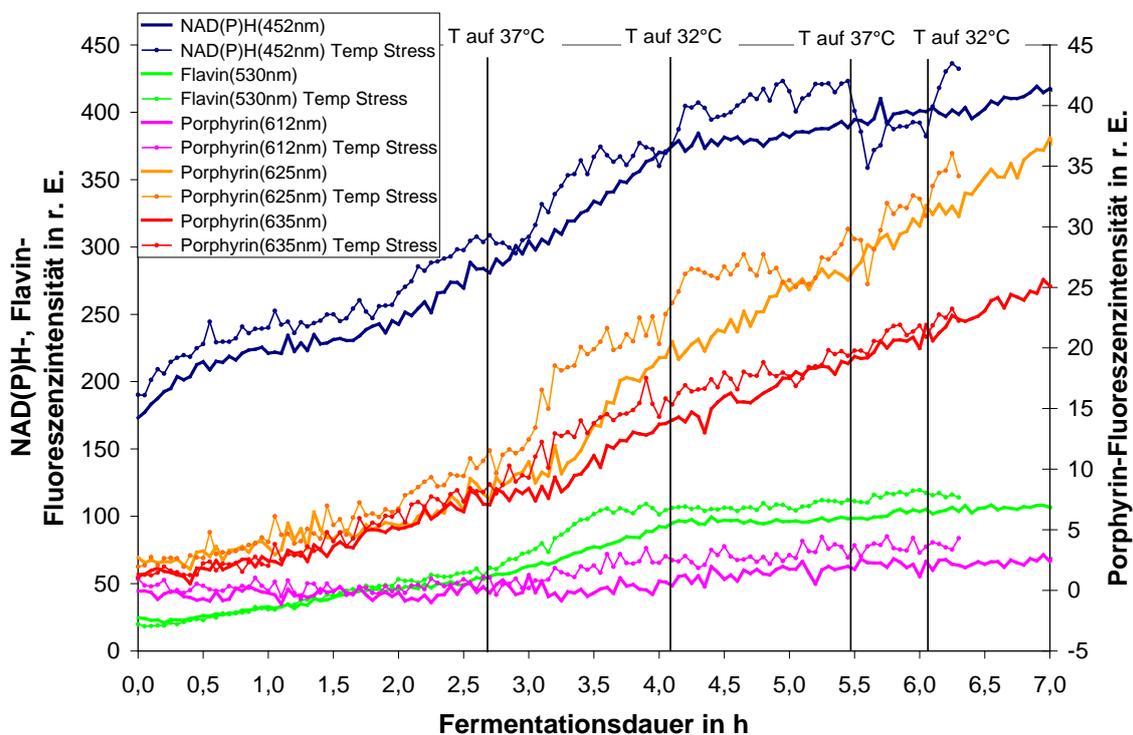


Abb. 4.49: Vergleich zwischen einer Standard-Kultivierung und einer Kultivierung, bei der zweimal eine Temperaturerhöhung von 32°C auf 37°C ausgelöst wurde (DHW Vital-Gold)

Ein ähnliches Verhalten ist bei der aeroben Gärung der Wienerer Backhefe zu beobachten (s. Abb. 4.50). Hier wurde mehrmals die Temperatur verändert. Zunächst wurde nach 2,5 h die Temperatur um 5°C von 32°C auf 37°C erhöht, anschließend auf 32°C gesenkt (Zeitpunkt etwa 3,3 h). Nach 5 h wurde sie erneut auf 37°C erhöht, um danach um weitere 5°C auf 42°C zu steigen (ca. 5,7 h). Bei der ersten Temperaturerhöhung nach ca. 2,5 h ist keine Veränderung im Fluoreszenzverlauf, hingegen bei den späteren Temperaturerhöhungen ein Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz um 9 % zu erkennen, auf den jeweils ein erneuter Anstieg um 3 % folgt. Zu diesem Zeitpunkt (ab ca. 3,5 h) verstoffwechselt die Hefe das vorher produzierte Ethanol. Zusätzlich erfolgt bei der Temperaturerhöhung auf 42°C eine Zunahme der Flavinfloreszenz um 25 %, die bei der Umstellung auf 37°C ausbleibt.

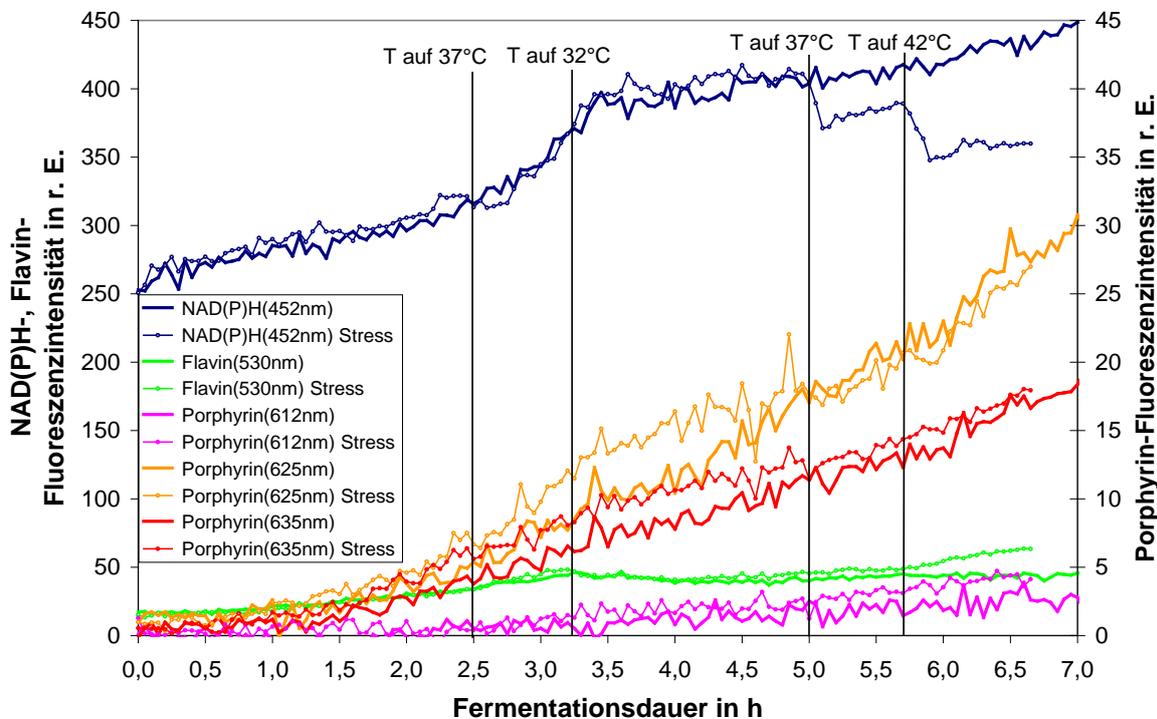


Abb. 4.50: Vergleich zwischen einer Standard-Kultivierung und einer Kultivierung, bei der dreimal eine Temperaturerhöhung ausgelöst wurde (Wienerer Frischhefe)

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es - wie bereits bei dem vorher getätigten Vergleich zwischen Bier- und Brennereihefe - vom Zeitpunkt der Störung abhängen kann, ob eine Änderung im Fluoreszenzmuster erfolgt. Dieser Zeitpunkt könnte zum einen durch die Wachstumsphase definiert sein. So zeigt eine Störung in der log-Phase kaum Auswirkung auf den Fluorophorverlauf von NAD(P)H und Flavinen, eher sind Porphyrine betroffen. Dagegen nimmt die Temperaturänderung in der stationären Phase bzw. während des diauxic shift Einfluss auf die Fluorophorverläufe von NAD(P)H und Flavinen. Zum anderen könnte der Zeitpunkt auch durch die Art der metabolisierten Kohlenstoffquelle begründet sein. So

unterschieden sich die Änderungen im Fluoreszenzmuster beim Wachstum auf Ethanol oder Maltose von denen, wenn die Hefe auf Saccharose bzw. Glucose wächst.

Im folgenden Versuch wurde während der Gärung von Bierhefe (Rh) das Fluoreszenzverhalten nach Auftreten einer Temperaturänderung untersucht. Zunächst wurde nach ca. 51 h die Temperatur von 22°C auf 28°C erhöht (s. Abb. 4.51). Wie bereits bei den anderen Versuchen zur Temperaturänderung sinkt auch hier die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität direkt nach dem Temperaturanstieg, und zwar um 15 %. Ebenso wie bei den vorigen Versuchen nimmt nach dieser Änderung die Flavinfluoreszenz zu; die Zunahme beträgt 47 %. Des Weiteren ist bei der Bierhefe Rh ein Anstieg der Porphyrinfluoreszenzintensität bei 625 nm um 115 % zu beobachten, dies ist in ähnlichem Ausmaß auch bei der Brennereihefe Ethanol Red der Fall (vgl. Abb. 4.44). Ebenso steigt bei diesen beiden Hefen die Fluoreszenzintensität bei 635 nm um 100 % an. Etwa 10 h später, nachdem die Temperatur wieder auf 22°C abgesenkt wurde, ist ein Rückgang der Porphyrinfluoreszenz um 30 % zu beobachten. Dabei scheinen sich die Intensitäten auf einem Niveau zu befinden, das ohne zwischenzeitliche Temperaturänderung erwartet worden wäre.

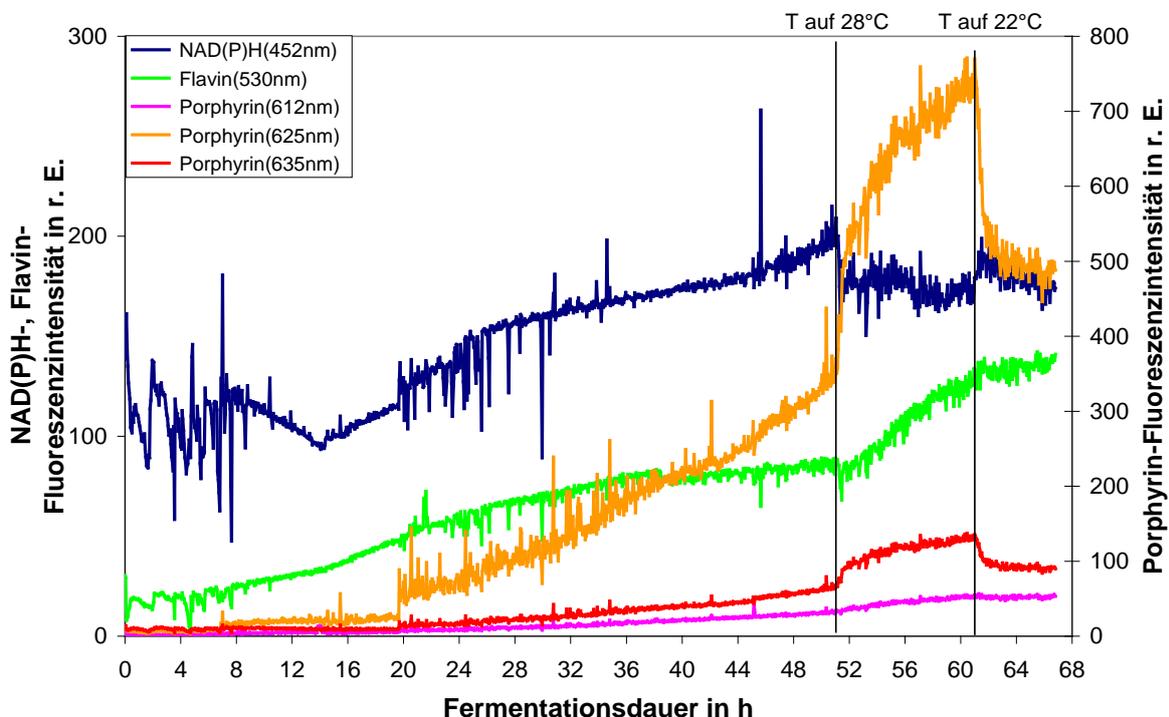


Abb. 4.51: Fluorverläufe der Gärung von Bierhefe (Rh), bei der nach ca. 51 h eine Temperaturerhöhung auftrat

Dies könnte darauf hindeuten, dass die Fluoreszenzintensität der Porphyrine um 625 und 635 nm vor allem durch die Temperaturänderung beeinflusst wird, und nicht ausschließlich durch eine eventuelle Änderung der physiologischen Zustands hervorgerufen wird. Die Flavinfluoreszenz steigt zum Zeitpunkt der Temperatursenkung um 8 % an und die NAD(P)H-Fluoreszenz fällt nach kurzzeitigem Anstieg um 10 % wieder auf das ursprüngliche Niveau ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Temperaturerhöhung zu einer kurzzeitigen Abnahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität zwischen 4 und 25 % sowie zu einem Anstieg der Flavinfluoreszenzintensität um 25–50 % führt. Außerdem kann bei einigen Hefen eine Zunahme der Porphyrinfluoreszenz um 100–200 % beobachtet werden. Bei Temperatursenkung hingegen erfolgt ein kurzzeitiger Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenz zwischen 8 und 12 %. Indes ist das Verhalten der Porphyrinfluoreszenz nicht einheitlich; es kann sowohl eine Zunahme zwischen 13 und 20 % als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 30 % beobachtet werden.

4.3.2.3.2 pH-Wert

Zunächst soll am Beispiel der Fed-Batch Kultivierung von Backhefe (s. Abb. 4.52) der Einfluss einer pH-Wert-Änderung auf das Fluoreszenzmuster erläutert werden.

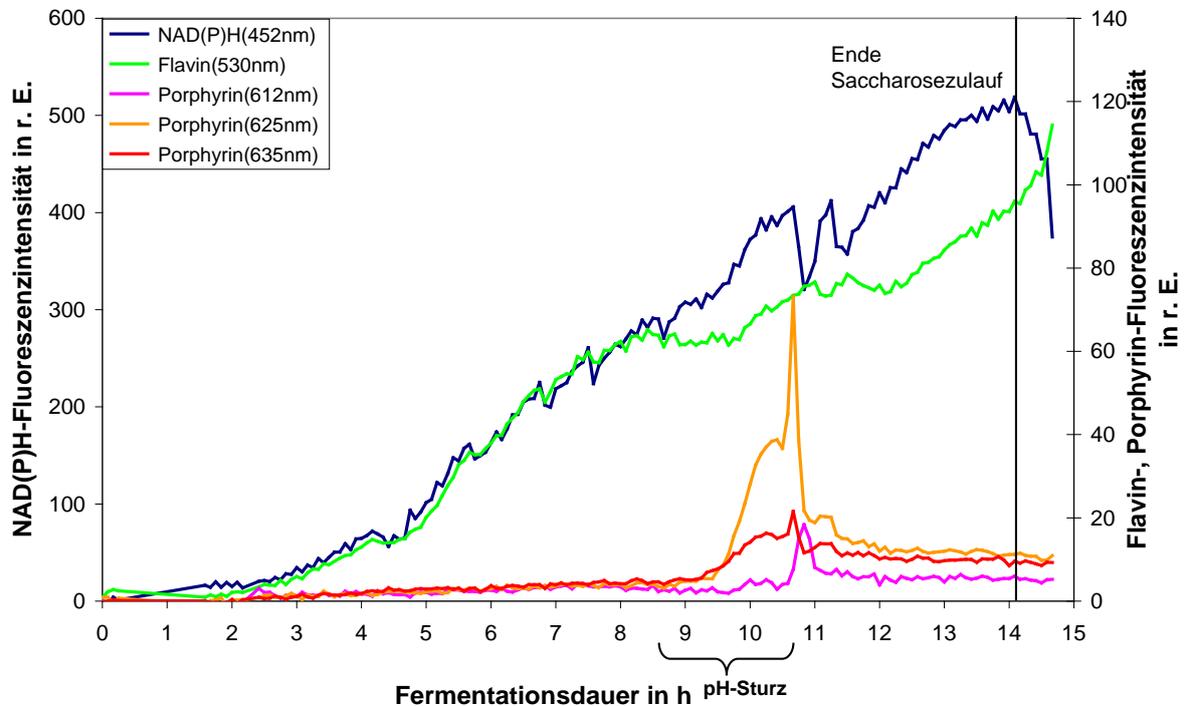


Abb. 4.52: Fluorophorverläufe der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe, bei der im Zeitraum von ca. 8,5 bis 11,5 h ein pH-Sturz verursacht wurde

Die Fluorophorverläufe ähneln zu Beginn der Kultivierung denen in 4.3.2.1.2 beschriebenen (vgl. Abb. 4.35). Auch während dieser Fed-Batch-Kultivierung schwankte die NAD(P)H-Fluoreszenz kurz nach der Gabe von Antischaummittel. Dies verdeutlicht der Vergleich zwischen Streulichtverlauf und NAD(P)H-Verlauf (s. Abb. 4.53). Da keine Substratlimitation während der Saccharosezufuhr herrscht, verlaufen NAD(P)H- und Streulichtintensität weitgehend parallel. Erst nachdem kein Substrat mehr zur Verfügung steht (14 h), geht die NAD(P)H-Fluoreszenz um 28 % zurück. Nach 7,5 h ist die Zufütterungsrate maximal und es herrscht Sauerstofflimitation (s. Abb. 4.54), die Flavinfluoreszenz steigt nicht mehr so stark an (s. Abb. 4.52).

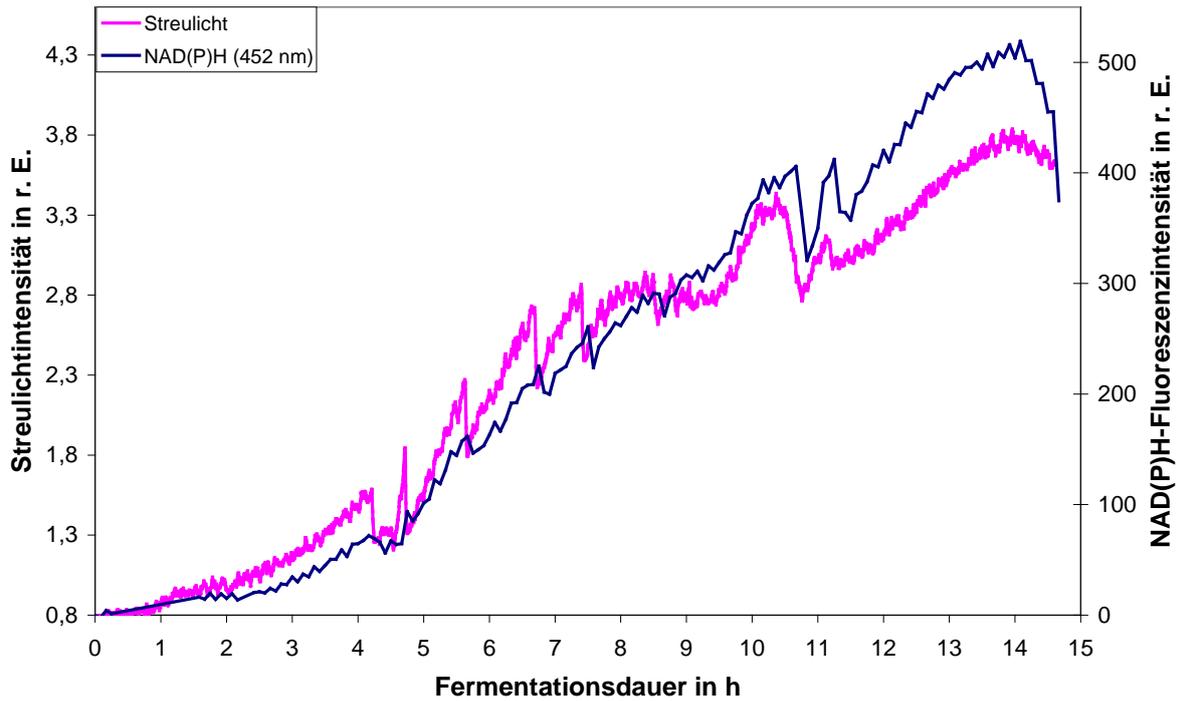


Abb. 4.53: Vergleich zwischen Streulicht- und NAD(P)H-Fluoreszenzverlauf, deren Schwankungen durch Gabe von Antischaummittel verursacht sind

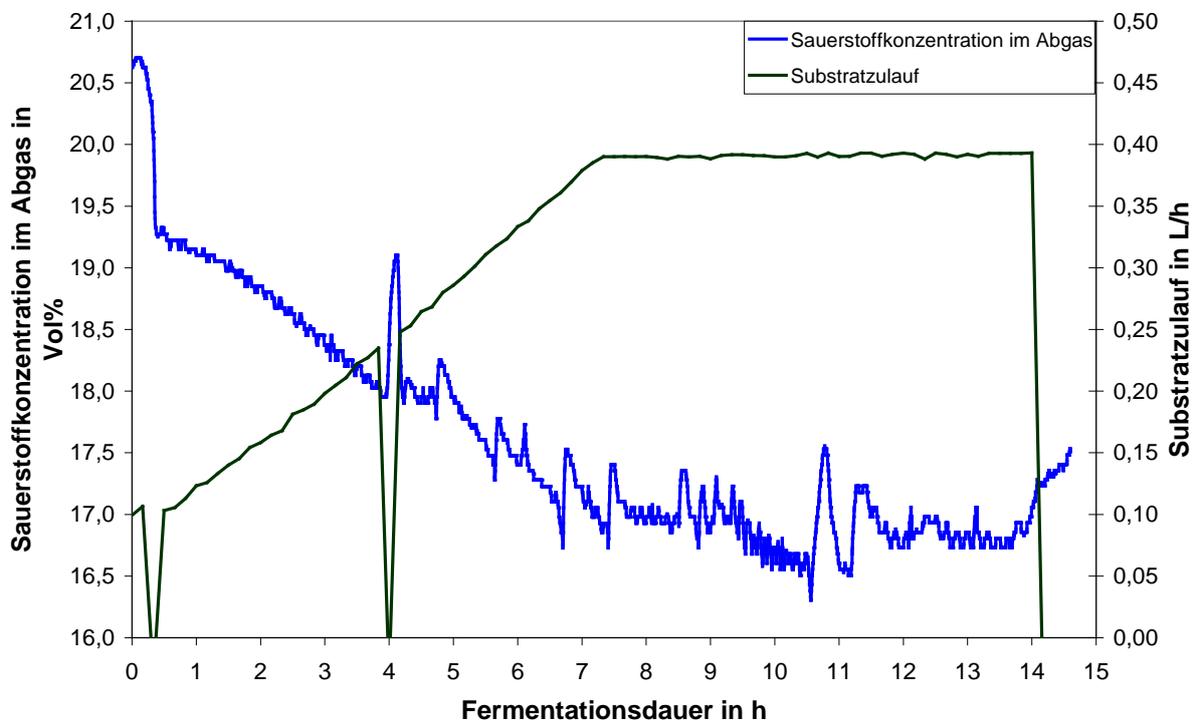


Abb. 4.54: Sauerstoffkonzentration im Abgas und Substratzulauf während der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe, bei der ein pH-Sturz nach 8,5 h ausgelöst wurde

In der folgenden Abbildung (Abb. 4.55) werden zur besseren Betrachtung die Fluoreszenzverläufe der Porphyrine und Flavine dem pH-Wert gegenübergestellt. Der NAD(P)H-Verlauf ist hier nicht dargestellt, da eventuelle durch den pH-Sturz verursachte Effekte von der Zugabe des Antischaummittels überlagert sein könnten (vgl. Abb. 4.53).

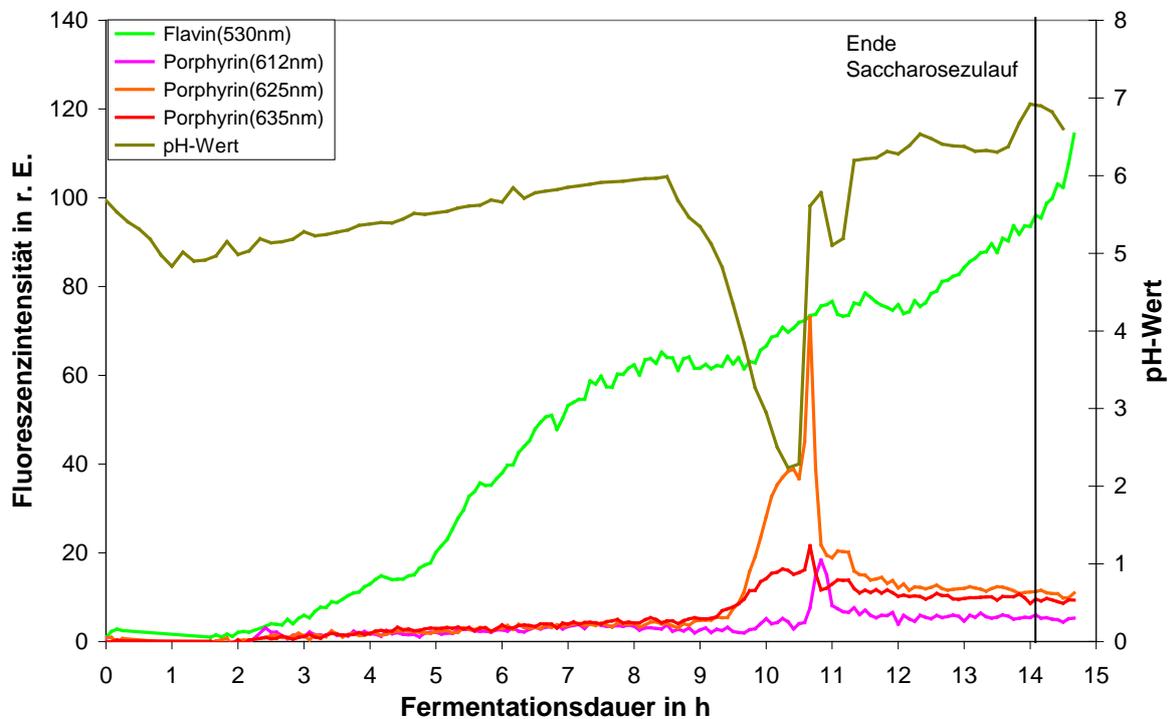


Abb. 4.55: Fluorophorverläufe sowie pH-Wert-Verlauf der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe, bei der ein pH-Wert Sturz von 5,9 auf 2,2 ausgelöst wurde

Während des pH-Sturzes von 5,9 auf 2,2 steigt die Porphyrinfluoreszenz bei 635 nm um das Vierfache und bei 625 nm sprunghaft sogar um das Vierzehnfache an. Sie sinkt erst wieder, nachdem der pH-Wert auf seinen ursprünglichen Wert eingestellt wurde (ca. 11,5 h). Zusätzlich ist nach ca. 10,5 h eine Zunahme der Fluoreszenz um 612 nm um das Vierfache zu beobachten, während die Fluoreszenzintensitäten der Porphyrine bei 625 und 635 nm zu diesem Zeitpunkt bereits einen Rückgang auf das Doppelte bzw. Vierfache ihres Ausgangswertes vor dem pH-Sturz verzeichnen. Dieser Anstieg bei 612 nm fällt mit der kurzzeitigen Erhöhung des pH-Wertes zusammen. Das gleiche Verhalten kann auch bei der pH-Wert-Erhöhung während der Kultivierung der Bierhefe W-34/70 beobachtet werden (s. Abb. 4.46). Auch während der hier beschriebenen Fed-Batch-Kultivierung könnte die Ursache in einer durch die pH-Wert-Änderung verursachten kurzweiligen Verschiebung der 625 nm-Emissionsbande liegen. Die Flavinfluoreszenzintensität nimmt bei pH-Wert <4 um 18 % zu. Anschließend bleibt die Flavinfluoreszenzintensität konstant, um nach etwa 12,5 h parallel zur NAD(P)H-Fluoreszenz bis zum Ende des Saccharosezulaufs anzusteigen. Nachdem die Saccharosevorlage aufgebraucht ist, erfolgt ein rascher Anstieg um 20 %.

Die Fluorophorverläufe einer weiteren Kultivierung, bei der der pH-Wert mehrmals geändert wurde, sind in Abb. 4.56 dargestellt. Hierbei handelt es sich um eine aerobe Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold). Die Animpfdichte betrug zunächst 1,5 g/L Frischhefe. Nach 2,1 h wurden weitere 8,5 g/L Frischhefe hinzugegeben. Hier ist zu erkennen, dass die Hefezugabe vorwiegend zu einer Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenz führt (Faktor 11), während die Flavinfluoreszenz und die Porphyrinfluoreszenz nur leicht (Faktor 2 bzw. 1,5) ansteigen. Nach der Adaption der zugegebenen Zellen an die Umgebung wurde der pH-Wert mehrfach geändert.

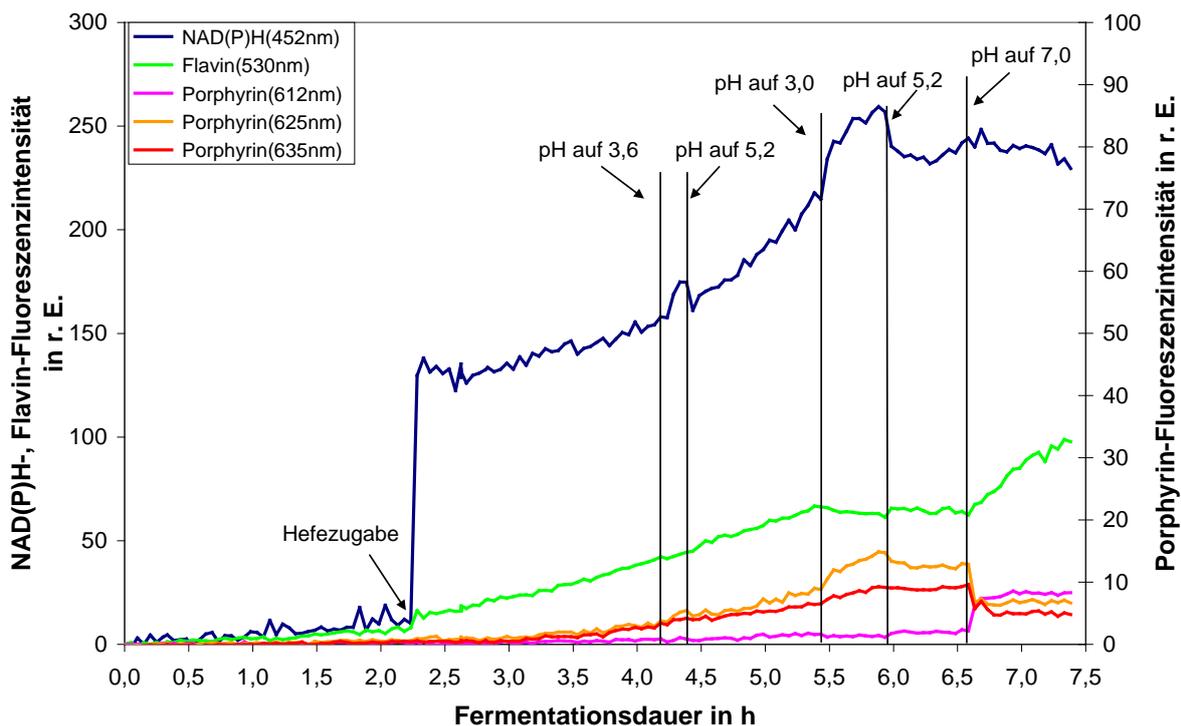


Abb. 4.56: Fluorophorverläufe einer aeroben Gärung von Backhefe, bei der mehrmals der pH-Wert geändert wurde

Bei Absenkung des pH-Wertes von 5,2 auf 3,6 (nach ca. 4,2 h) tritt eine Zunahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität um 10 % auf, die nach Einstellen des pH-Wertes auf dessen ursprünglichen Wert (5,2; Zeitpunkt etwa 4,4 h) wieder verschwindet. Das gleiche Verhalten der NAD(P)H-Fluoreszenz ist nach erneuter Absenkung des pH-Wertes von 5,2 auf 3,0 nach ca. 5,4 h, einhergehend mit anschließender Erhöhung auf 5,2 (Zeitpunkt ca. 6 h) zu beobachten. Zunächst steigt die Fluoreszenz um 12 %, um nach der pH-Wert-Erhöhung wieder um 7 % zu fallen. Nach weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 (Zeitpunkt etwa 6,6 h) geht die NAD(P)H-Fluoreszenz um 4 % zurück.

Anders verhält es sich bei der Flavinfluoreszenz. Hier erfolgt bei der ersten Absenkung des pH-Wertes von 5,2 auf 3,6 keine Änderung im Fluoreszenzverlauf. Während der zweiten Senkung des pH-Wertes von 5,2 auf 3,0 ist allerdings statt des fortlaufenden Anstiegs ein

Rückgang um 5 % zu beobachten, der durch die erneute Erhöhung des pH-Wertes auf 5,2 gestoppt wird. Dagegen ist nach weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 ein Anstieg der Flavinfluoreszenz um 50 % zu verzeichnen.

Auch die Porphyrinfluoreszenz bei 612 nm steigt nach Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 sprunghaft um das Vierfache an, während die Fluoreszenzintensitäten um 625 und 635 nm rasch um 50 % zurückgehen. Dieses Verhalten kann ebenfalls bei der beschriebenen Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe und der aeroben Gärung der Bierhefe W-34/70 beobachtet werden (vgl. Abb. 4.55, Abb. 4.46). Auch der stärkere Anstieg der Porphyrinfluoreszenz bei 625 nm (65 %) im Verhältnis zur Fluoreszenz bei 635 nm (45 %) nach Senkung des pH-Wertes von 5,2 auf 3,0 nach 5,4 h verhält sich ähnlich zu der Fed-Batch-Kultivierung von Backhefe (vgl. Abb. 4.55).

Zusätzlich zu den Fluoreszenzverläufen in Abb. 4.56 sind in den folgenden Abbildungen die Verläufe von Gelöstsauerstoff, pH-Wert und Streulichtintensität bzw. Sauerstoff- und CO₂-Konzentration im Abgas sowie Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe dargestellt, damit das Stoffwechselgeschehen zu den Zeitpunkten der pH-Wert-Änderungen besser eingeordnet werden kann (s. Abb. 4.57, Abb. 4.58).

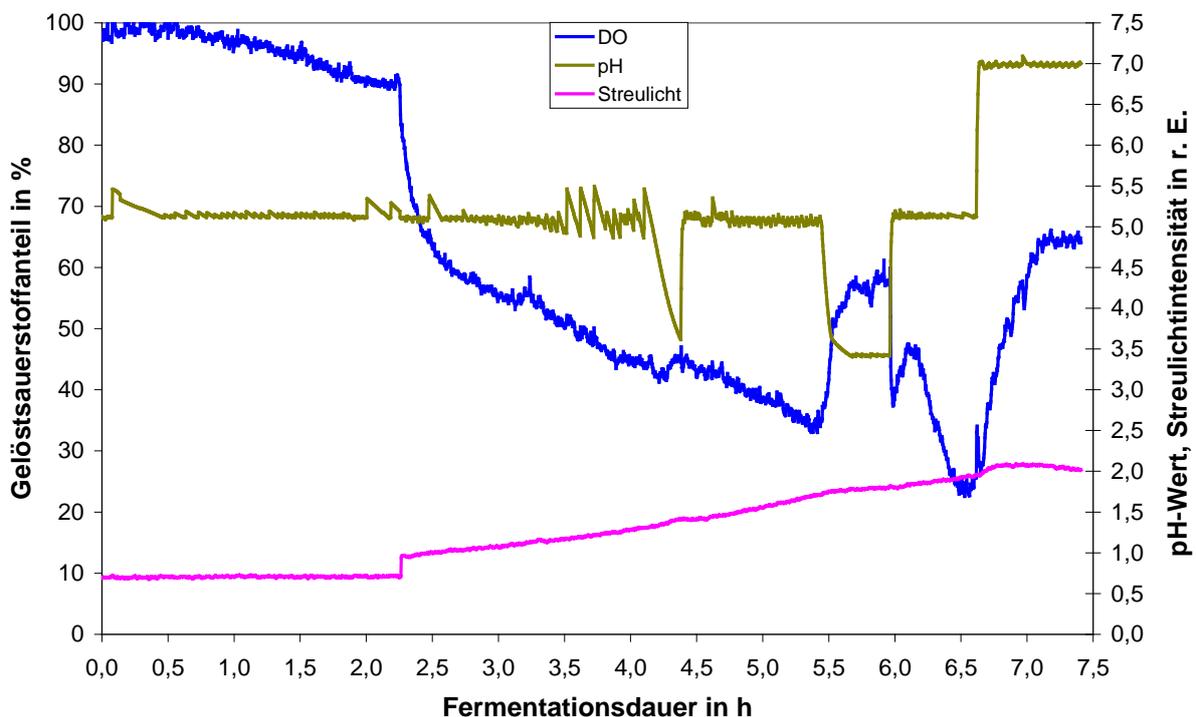


Abb. 4.57: Verläufe von Gelöstsauerstoff, pH-Wert und Streulichtintensität während der aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold)

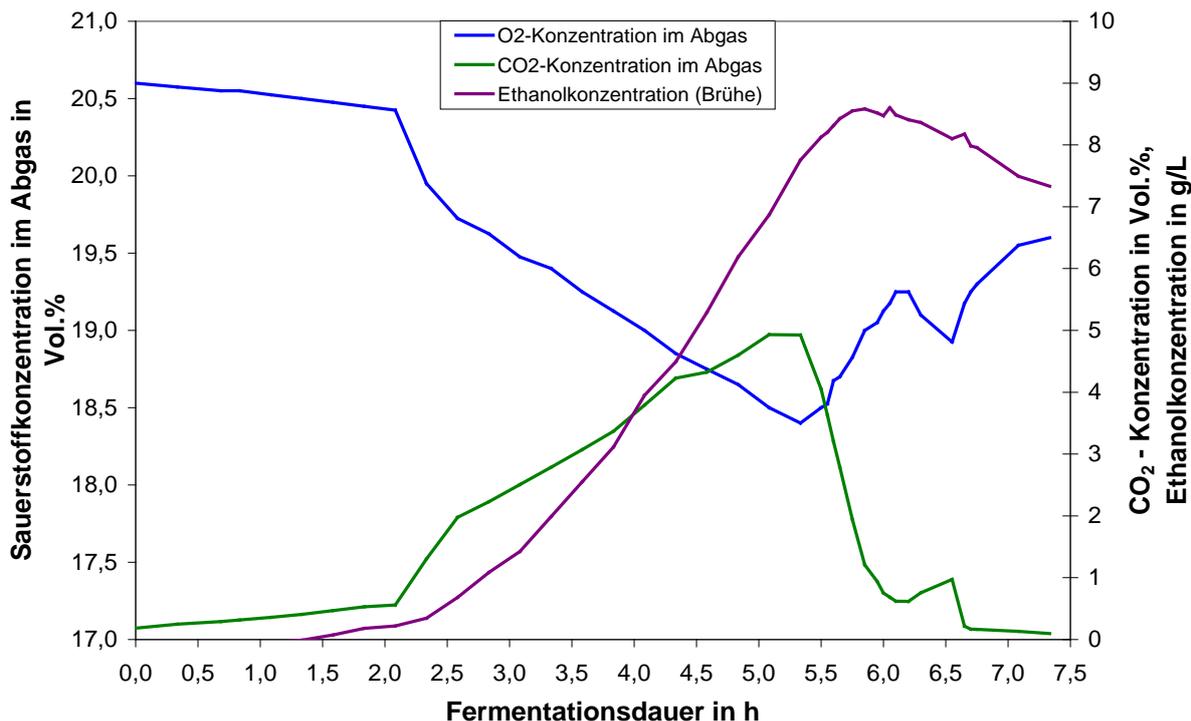


Abb. 4.58: Verläufe von Sauerstoff- und CO₂-Konzentration im Abgas sowie Ethanolkonzentration während der aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold)

So ist zu erkennen, dass während der zweiten Senkung des pH-Wertes von 5,2 auf 3,0 nach ca. 5,4 h die Saccharose aufgebraucht ist, und die Hefe beginnt, das Ethanol als Kohlenstoffquelle zu verstoffwechseln. Daher ist der Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz gegen Ende der pH-Wert-Umstellung wohl darauf zurückzuführen, dass keine Saccharose als Kohlenstoffquelle mehr zur Verfügung steht, und nicht ausschließlich auf die Erhöhung des pH-Wertes. Dafür spricht, dass die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität bereits vor der erneuten Zunahme des pH-Wertes auf 5,2 zu sinken anfängt (5,8 h).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einer Senkung des pH-Wertes die NAD(P)H- und die Porphyrinfluoreszenzintensität um 625 und 635 nm steigen. Dabei erfährt die Fluoreszenzintensität bei 625 nm eine bis zu vierfach stärkere Zunahme als die um 635 nm. Hingegen ist bei einer pH-Wert-Erhöhung ein Anstieg der Porphyrinfluoreszenz um 612 nm sowie teilweise der Flavinfluoreszenz zu beobachten. Der Anstieg der Porphyrinfluoreszenz um 612 nm könnte aus einer pH-Wert bedingten kurzweiligen Verschiebung des Emissionsmaximums um 625 nm herrühren, was die gleichzeitige Abnahme der Fluoreszenzintensität um 625 nm erklären würde, oder durch das Auftreten eines weiteren Fluorophors, dessen Emissionsmaximum um 612 nm liegt, verursacht werden.

4.3.2.3.3 Sauerstoffversorgung

Der Einfluss der Sauerstoffversorgung wird am Beispiel einer aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold) mit einer Animpfkonzentration von 10 g/L erläutert. Während der Fermentation wurde die Begasung von Druckluft auf Stickstoff umgestellt (Zeitpunkt etwa 6,2 h), sodass der Gelöstsauerstoffanteil rasch abnahm, und sich die Zellen auf anaeroben Stoffwechsel umstellen mussten. Nach 2,5 h wurde wieder mit Druckluft begast (Zeitpunkt etwa 8,8 h), sodass eine erneute Umstellung der Backhefe erforderlich war.

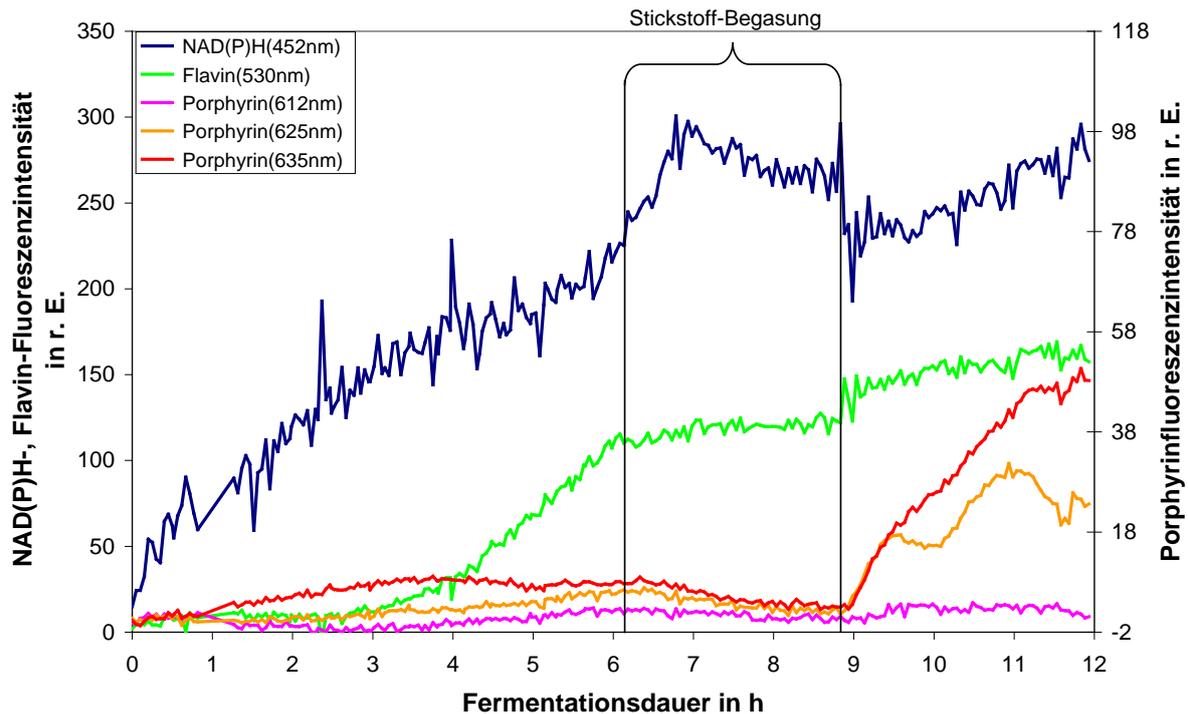


Abb. 4.59: Fluorophorverläufe der Batch-Kultivierung von Backhefe (DHW Vital-Gold), bei der im Zeitraum von ca. 6 - 9 h eine anoxische Umgebung vorlag

In Abb. 4.59 ist zu erkennen, dass während der Begasung mit Stickstoff die Flavinfluoreszenz nicht weiter ansteigt. Das heißt, der Anteil an oxidierten Flavinen bleibt unverändert, da die reduzierten Flavine aufgrund des Sauerstoffmangels nicht reoxidiert werden können.

Die Porphyrinfluoreszenz geht in dieser Zeit um 60 % zurück und steigt nach erneuter Zufuhr von Sauerstoff sprunghaft auf das Sechzehnfache (635 nm) bzw. Zehnfache (625 nm) an. Im Gegensatz zu den vorherigen Änderungen des pH-Werts oder der Temperatur steigt die Fluoreszenz bei 635 nm zu diesem Zeitpunkt stärker an als die Porphyrinfluoreszenz bei 625 nm. Die Porphyrinfluoreszenz um 612 nm bleibt über den beobachteten Zeitraum nahezu unverändert. Zusätzlich erhöht sich nach erneuter Druckluftbegasung die Fluoreszenzintensität im Bereich um 570–600 nm mit einem Maximum bei ca. 590 nm (s.

Abb. 4.60). Dabei könnte es sich um Zn-Protoporphyrin handeln, das wie die Porphyrine um 625 und 635 nm vermehrt nach ca. 9 h gebildet wird, wenn dem System erneut Sauerstoff zugeführt wird. Seine Fluoreszenzintensität nimmt im beobachteten Zeitraum um 50 % zu.

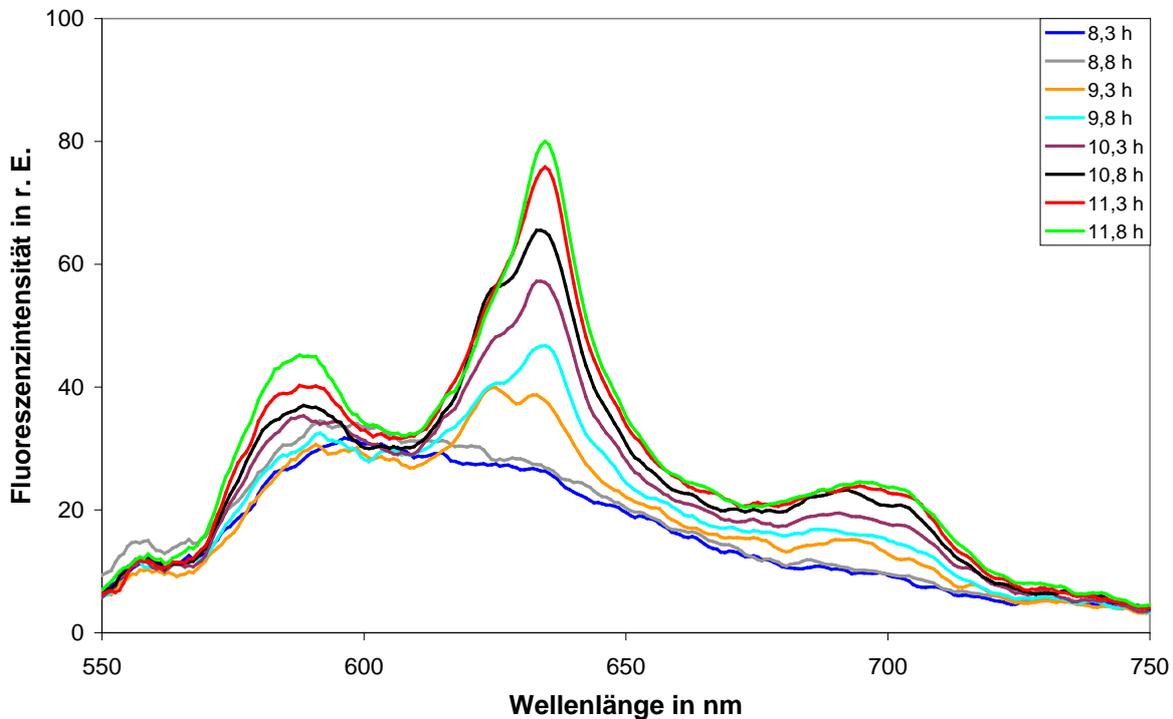


Abb. 4.60: Fluoreszenzverläufe der Porphyrine im Zeitraum 8,3 – 11,8 h; Spektren aus Multi-komponentenanalyse nach Subtraktion der NAD(P)H- und Flavinanteile

Die NAD(P)H-Fluoreszenz steigt während der Stickstoffbegasung zunächst etwas stärker an als vorher (bis ca. 7 h), fällt dann aber allmählich bis zur Umstellung auf Druckluft um 12 % ab. Nach der Umstellung sinkt sie um weitere 25 %, bevor sie wieder um 45 % ansteigt. Zum Zeitpunkt der Begasung mit Stickstoff ist die Saccharose bereits weitgehend verbraucht, sodass der Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz nach ca. 7 h auch mit dem Ende der Kohlenstoffquelle zusammenhängen kann. Die Hefe kann das während des Saccharoseabbaus gebildete Ethanol anaerob nicht als Kohlenstoffquelle nutzen, weshalb auch die Bestandteile der Atmungskette nicht weiter synthetisiert werden. Dies führt zu dem oben beschriebenen Rückgang der Porphyrinfluoreszenz. Der starke Anstieg der Porphyrinfluoreszenz nach Umstellung auf Druckluft ist damit zu erklären, dass nun das Ethanol wieder als Energieträger zur Verfügung steht und verstärkt konsumiert wird (s. Abb. 4.61).

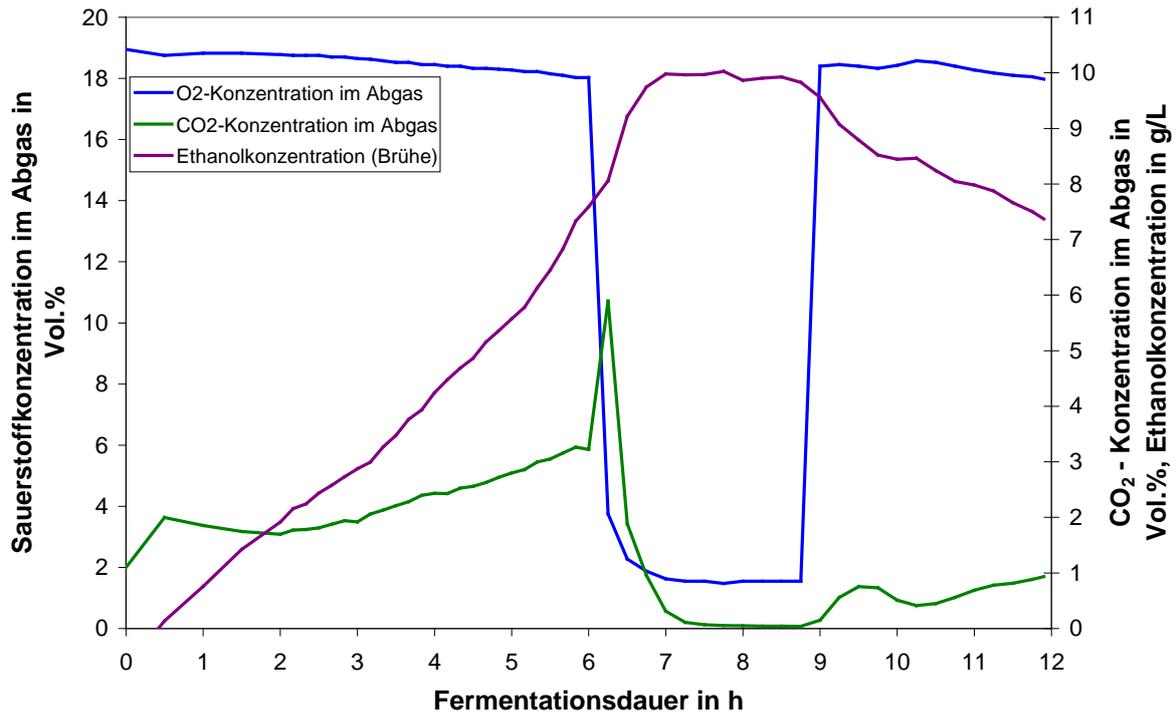


Abb. 4.61: Verläufe von Sauerstoff- und CO₂-Konzentration im Abgas sowie Ethanolkonzentration während der Batch-Kultivierung von Backhefe (DHW Vital-Gold)

4.3.2.3.4 Substratangebot

Ob sich Änderungen im Substratangebot auf das Fluoreszenzmuster auswirken, wird am Beispiel einer aeroben Gärung von Backhefe (DHW Vital-Gold, Animpfdichte 10 g/L) dargestellt. Wie bei den standardmäßig durchgeführten aeroben Gärungen metabolisiert die Backhefe zunächst die vorgelegten 3 % Saccharose unter gleichzeitiger Ethanolproduktion. Nach etwa 3,8 h ist keine Saccharose mehr vorhanden und die Hefe beginnt, das Ethanol als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Während des Ethanolabbaus wurde erneut 3 % Saccharose zugegeben (Zeitpunkt 5,5 h). Erwartungsgemäß stellt die Hefe ihren Stoffwechsel auf erneute Zuckerverwertung um, was sich im Fluoreszenzverlauf durch eine stärkere Zunahme des NAD(P)H-Signals um 15 % sowie durch einen erneuten Anstieg der Flavinfluoreszenzintensität um 35 % äußert (s. Abb. 4.62). Während des zweiten Saccharoseabbaus wird wieder Ethanol gebildet, und die Ethanolkonzentration steigt von ca. 9 g/L auf ca. 16 g/L an (s. Abb. 4.63). In der sich anschließenden zweiten Ethanolabbauphase (Zeitpunkt etwa 7,5 h) bleibt die Flavinfluoreszenz konstant. Die Änderung in den Porphyrinverläufen um 8,5 h ist auf eine Schwankung des pH-Wertes im Medium zwischen 5,0 und 5,4 zurückzuführen.

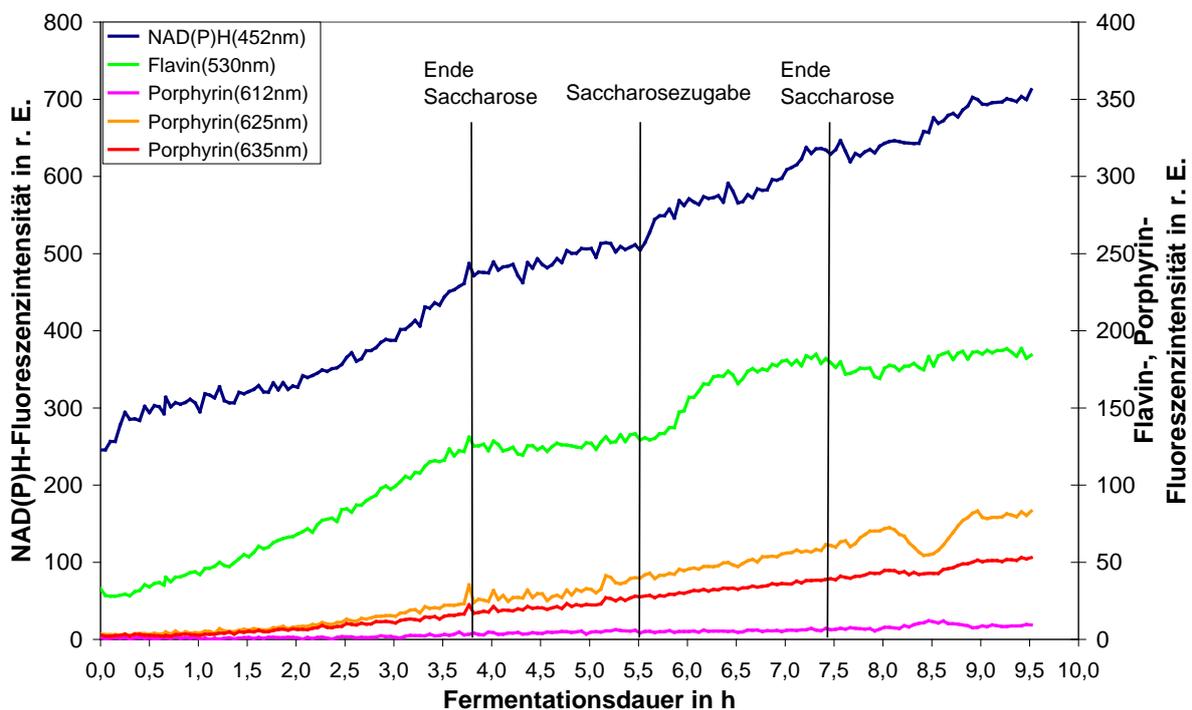


Abb. 4.62: Fluorophorverläufe während einer aeroben Gärung von Backhefe, bei der nach 5,5 h erneut Saccharose zugegeben wurde

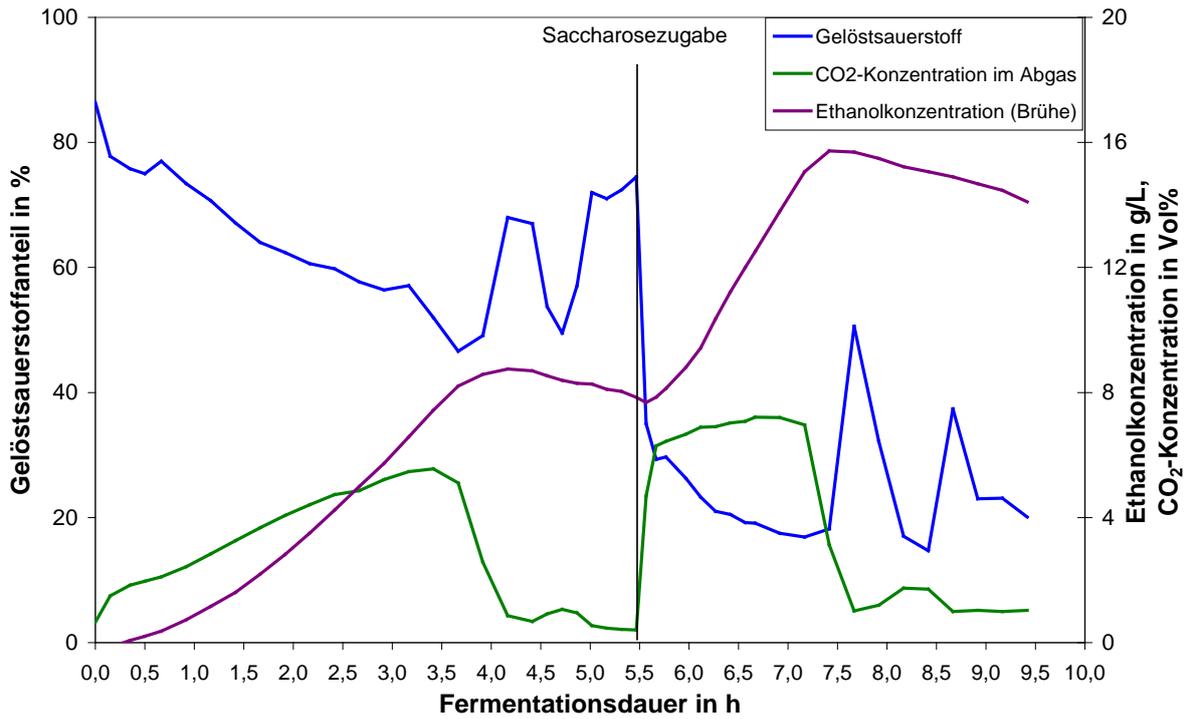


Abb. 4.63: Verläufe des Gelöstsauerstoffanteils, der CO₂- und der Ethanolkonzentration während der aeroben Gärung von Backhefe, bei der nach 5,5 h erneut Saccharose zugegeben wurde

4.3.2.4 Stammspezifische Unterschiede

Während der aeroben Gärungen verschiedener Backhefen (Animpfdichte 10 g/L) zeigen sich stammspezifische Unterschiede, die unter anderem in der CO₂- und Ethanolproduktion deutlich werden (s. Abb. 4.64). Die CO₂- und Ethanolbildungsraten sind bei der Wienerger Hefe am höchsten, gefolgt von DHW und Uniferm.

Gleichzeitig wird die Saccharose von Wienerger ca. eine Stunde früher verbraucht als von Uniferm (3,5 h statt 4,7 h). Die DHW Backhefe liegt dazwischen (ca. 4,2 h).

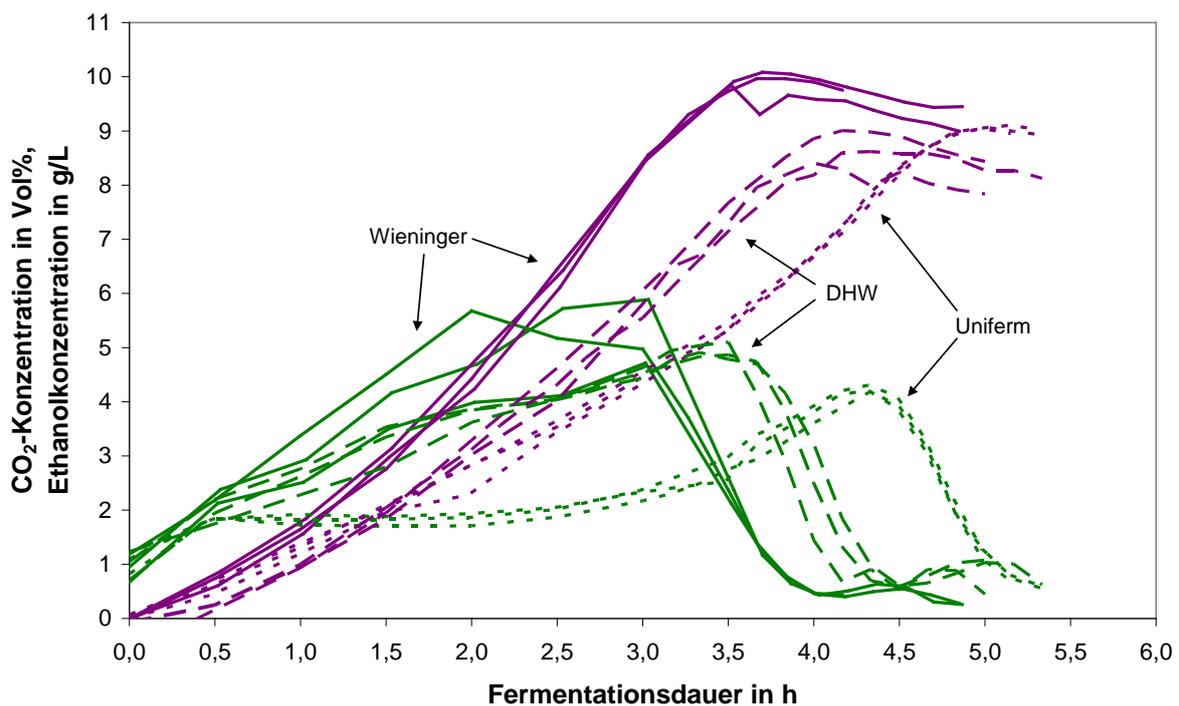


Abb. 4.64: CO₂- (grün) und Ethanolkonzentrationsverläufe (lila) bei Batch-Kultivierungen von Wienerger-, DHW- und Uniferm-Backhefe

Des Weiteren sind auch Unterschiede in den Fluorophorverläufen zu erkennen, insbesondere, was das Verhältnis NAD(P)H zu Flavinen angeht (s. Abb. 4.65). So enthält die Wienerger Hefe eine deutlich geringere Flavinforeszenz, nämlich $\leq 10\%$ der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität, als die Backhefen von Uniferm oder DHW, bei denen die Flavinforeszenzintensität jeweils ca. 40-60 % der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität ausmacht. Auch in den Fluorophorverläufen spiegeln sich die o. g. Unterschiede im Verbrauch der Kohlenstoffquelle wider. Die Abnahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität erfolgt für jede Hefe in etwa zu den gleichen Zeitpunkten - nach ca. 3,5 h oder 4,2 h bzw. 4,7 h - wie der Rückgang der CO₂-Bildungsrate bzw. dem Maximum der Ethanolkonzentration. Im Gegensatz zur NAD(P)H-Fluoreszenz verharrt die

Flavinfluoreszenz nach dem Saccharoseabbau auf einem nahezu konstanten Niveau. Allerdings ist letzteres bei der Wieninger Hefe aufgrund deren geringer Intensität nicht zweifelsfrei zu erkennen.

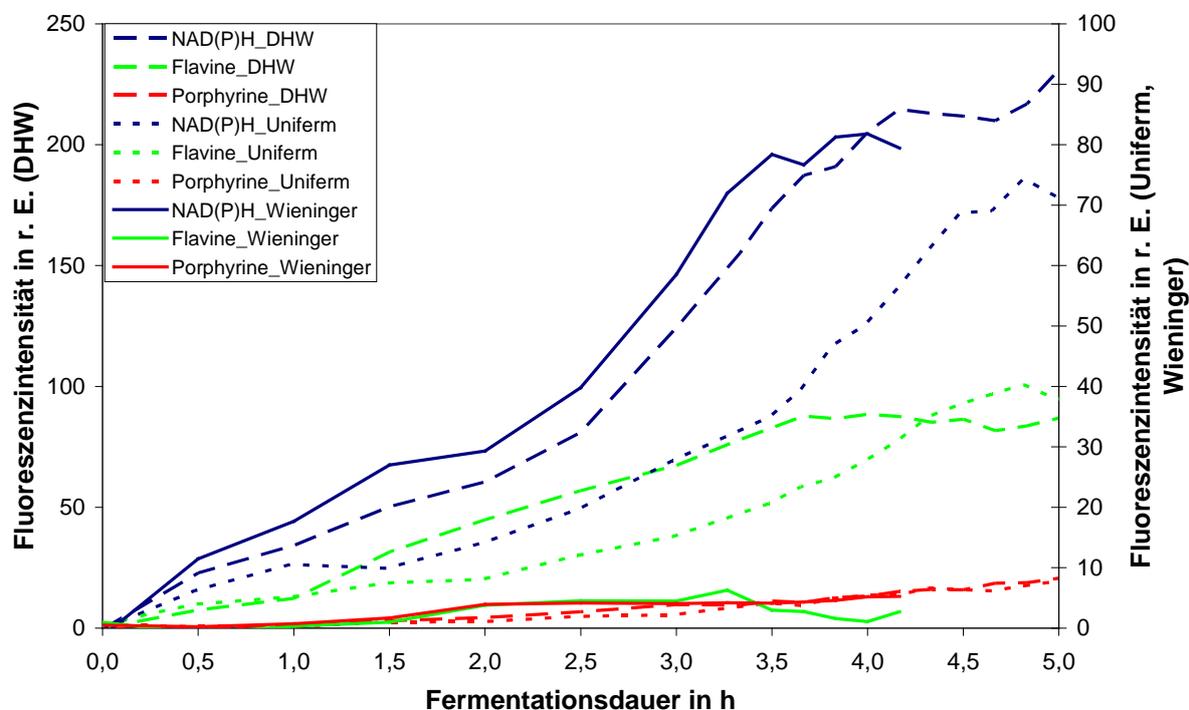


Abb. 4.65: Fluorophorverläufe bei Batch-Kultivierungen von Wieninger-, DHW- und Uniferm-Backhefe

4.3.3 Lagerstabilität von Backhefe

Zusätzlich zu den Versuchen während der Kultivierung von Backhefe wurde auch ihre Lagerstabilität untersucht. Dafür wurden Backhefewürfel der Hersteller DHW, Uniferm und Wieninger bei 50°C, 35°C sowie 4°C gelagert und ihre Fluoreszenz gemessen.

Abb. 4.66 zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren eines Backhefewürfels (Wieninger), der bei 50°C gelagert wurde. Nach sechsständiger Lagerung fällt eine ausgeprägte Fluoreszenzintensität im Bereich um 585-590 nm mit einem Nebenmaximum bei etwa 645 nm auf. Dies ist während der hier beschriebenen Kultivierungen, außer bei wechselnder Sauerstoffversorgung (vgl. Abb. 4.60), nicht zu beobachten. Wie bereits oben genannt, könnte es sich um Zn-Protoporphyrin handeln, das in diesem Bereich fluoresziert (s. Abb. 4.19). Dafür spricht, dass die für Porphyrine typische Fluoreszenzemission aus einer Hauptbande und einer um etwa 60 nm langwellig dazu verschobenen Nebenbande erkennbar ist.

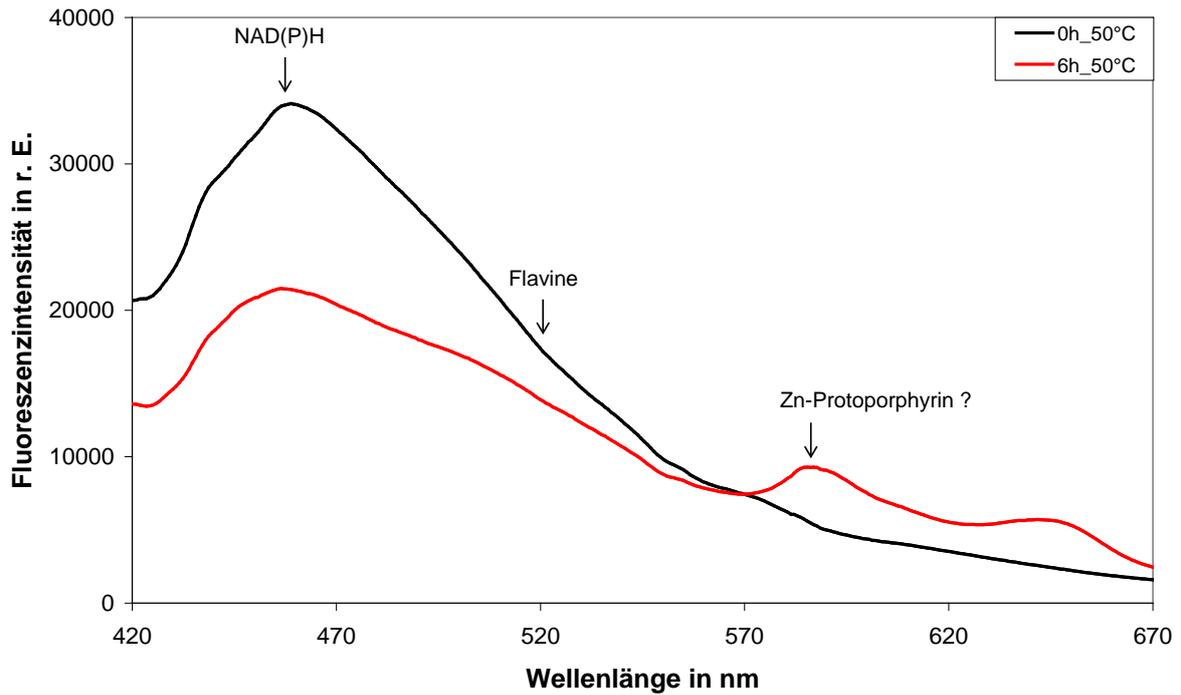


Abb. 4.66: Fluoreszenzmissionsspektren der Wiener Backhefe zu Beginn und nach sechsstündiger Inkubation bei 50°C

Lagerung bei 50°C

In der folgenden Abbildung sind die zeitlichen Verläufe der NAD(P)H-, Flavin- und der bei 585 nm ermittelten Porphyrin-Fluoreszenzintensität der bei 50°C inkubierten Backhefen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei allen betrachteten Hefen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um 585 nm während der Lagerung auftritt (s. Abb. 4.67).

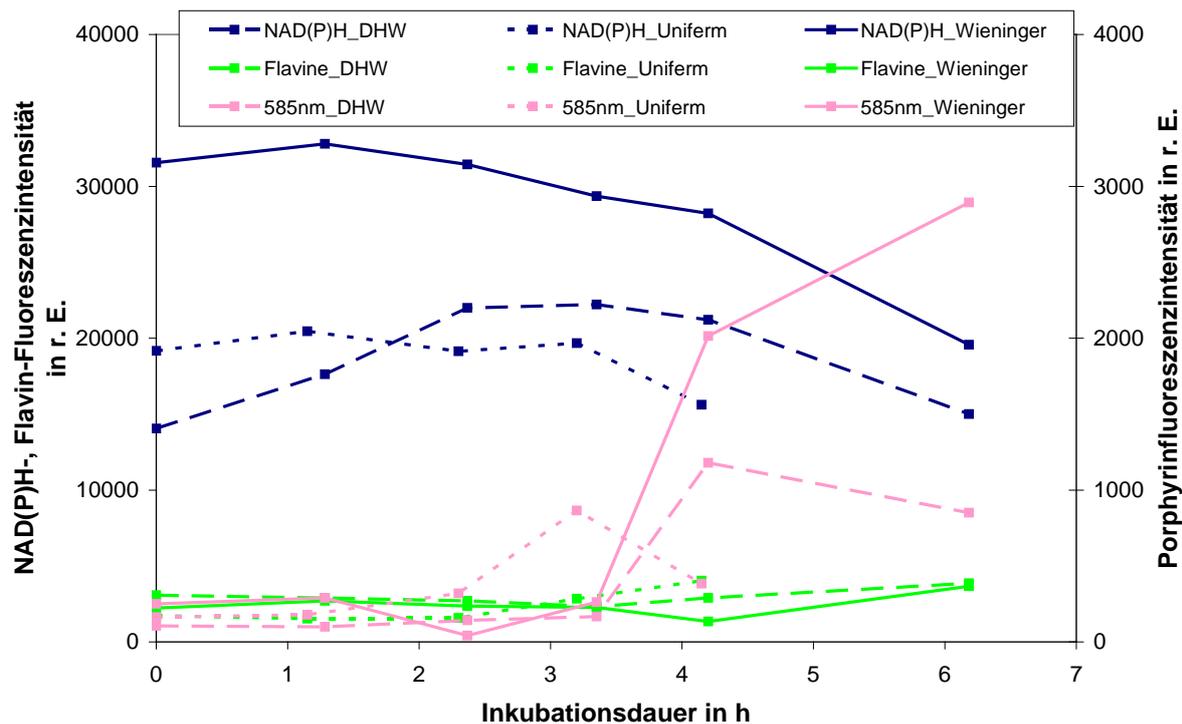


Abb. 4.67: Fluorophorverläufe der Backhefewürfel während der Lagerung bei 50°C

Dabei sind auch hier stammspezifische Unterschiede zu verzeichnen, die sich im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten untereinander - insbesondere der Flavin- zur NAD(P)H-Fluoreszenzintensität - und dem Zeitpunkt der Fluoreszenzintensitätszunahme bei 585 nm äußern. So tritt bei der Uniferm Backhefe bereits nach etwa 2,3 h eine Verdopplung der Porphyrinfluoreszenz auf, während bei DHW erst nach ca. 3,3 h eine Zunahme um 60 % gegenüber dem Ausgangswert erkennbar ist. Bei Wienerger ist der Anstieg der Porphyrinfluoreszenz sogar erst nach etwa 4,2 h zu verzeichnen; die Fluoreszenzintensität beträgt hier das Achtfache.

Des Weiteren ist zu sehen, dass bei Uniferm und DHW die Fluoreszenzintensität bei 585 nm nach einem Maximum bei 3,2 bzw. 4,2 h wieder um die Hälfte bzw. ein Viertel zurückgeht. Hingegen nimmt bei der Wienerger Backhefe diese Fluoreszenzintensität um weitere 40 % zu.

Darüber hinaus nimmt die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität bei Wienerger Backhefe um 38 % und bei Uniferm um 18 % ab, wohingegen bei der DHW Hefe zunächst eine Zunahme um 36 % nach drei Stunden erfolgt. Nach 6 h befindet sich deren NAD(P)H-Fluoreszenzintensität erneut auf dem Ausgangsniveau. Die Flavinfluoreszenzintensität nimmt bei allen drei Hefen während der Lagerung bei 50°C zu. Bei DHW um 25 %, Wienerger um 65 % bzw. Uniferm sogar um 130 %.

Bei diesen Versuchen verflüssigt sich zuerst der Uniform Hefewürfel, gefolgt von DHW und Wienerger. Da nach der Autolyse die Fluoreszenzspektren hinsichtlich der Lagerstabilität nicht mehr aussagefähig wären, sind die Fluoreszenzintensitäten der Uniform Backhefe zum Zeitpunkt 6 h nicht mehr dargestellt. Die Daten zur Texturanalyse während der Lagerung bei 50°C können Abb. 4.68 entnommen werden. Dabei bedeuten Schubarbeits-Werte > 8,0 N*mm, dass die Hefe fest ist, während weiche Hefe zwischen 4,2 und 8,0 N*mm liegt. Für sehr weiche Hefe gelten Werte < 4,2 N*mm. So ist zu erkennen, dass im Zeitraum zwischen zwei und vier Stunden die Plastizität der Backhefewürfel von „fest“ auf „weich“ für Wienerger bzw. „sehr weich“ für DHW und Uniform zurückgeht.

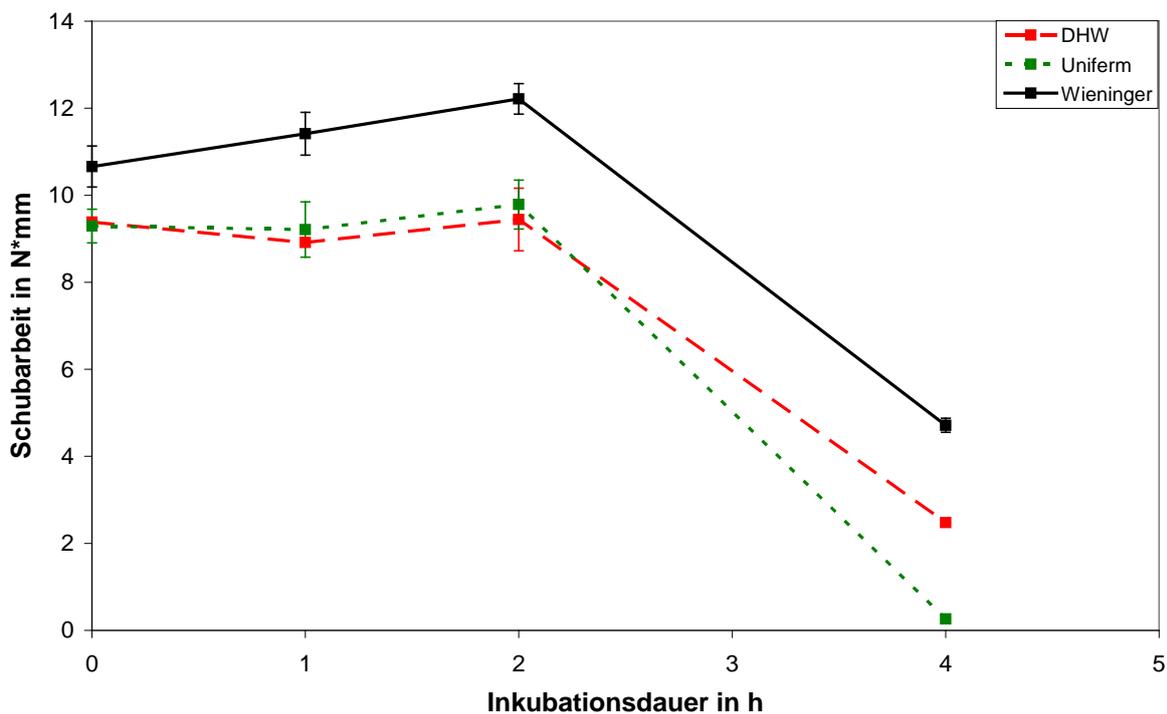


Abb. 4.68: Plastizitätsverläufe der bei 50°C gelagerten Backhefewürfel

Lagerung bei 35°C

Während der Lagerung bei 35°C nimmt lediglich bei der Wienerger Backhefe die Fluoreszenzintensität um 585 nm zu (s. Abb. 4.69).

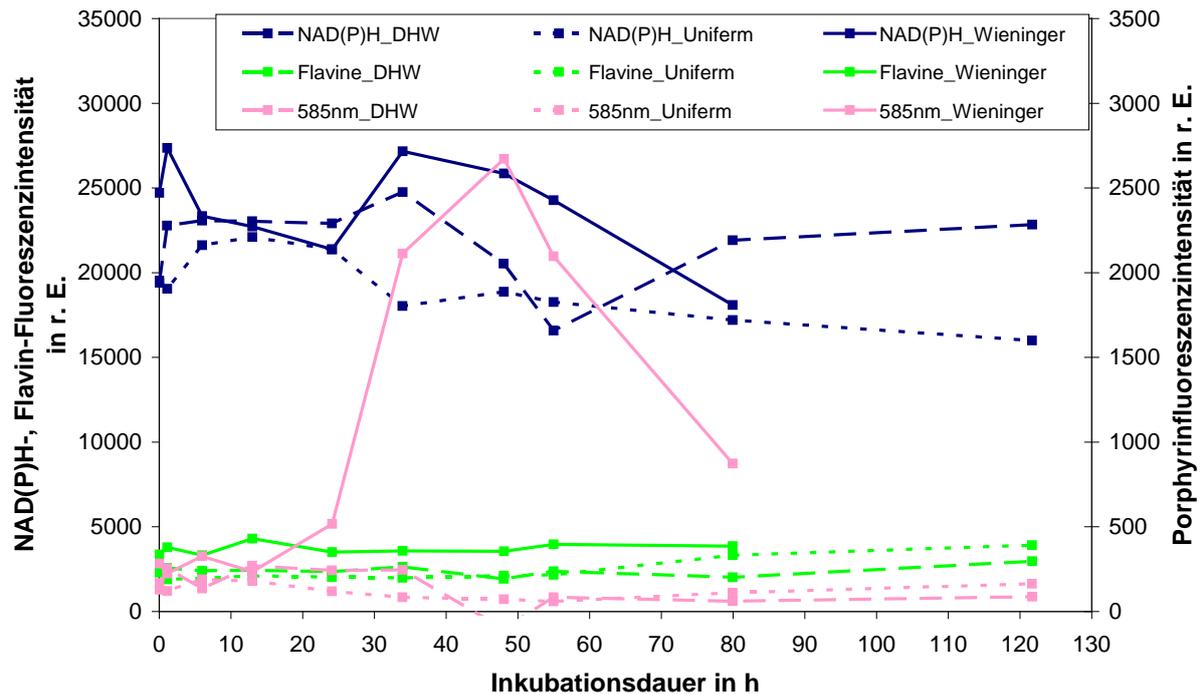


Abb. 4.69: Fluorophorverläufe der Backhefewürfel während der Lagerung bei 35°C

Wie bereits während der Lagerung bei 50°C sinkt auch hier bei Wiener und Uniferm Backhefe die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität, insbesondere ab 48 h. Im Verhältnis zum Ausgangswert nimmt die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität der Wiener Hefe um 27 % ab, die der Uniferm sinkt um 18 %. Dahingegen erhöht sich die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität der DHW Hefe am Ende der Lagerung um 20 %. Analog zur Lagerung bei 50°C nimmt bei den untersuchten Hefen die Flavinforeszenz zu, allerdings nicht in dem Maße. Bei DHW erhöht sie sich um 14 %, Wiener um 17 % bzw. Uniferm um 70 %.

Die Wiener Backhefe ist als einzige zum Zeitpunkt 122 h verflüssigt, weshalb die Fluoreszenzdaten zu diesem Zeitpunkt nicht aufgetragen sind. Die Texturdaten sind in Abb. 4.70 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Plastizität bis zum Ende des Versuchs nach 122 h abnimmt, wobei sämtliche Hefen bereits nach 48 h Lagerung bei 35°C „sehr weich“ sind. Hierbei zeigt sich, dass die Plastizität der Uniferm Backhefe um 34 % zurückgeht, während der Rückgang bei DHW sogar 70 % beträgt. Bei der Wiener Backhefe nimmt die Plastizität allein im Zeitraum 48 bis 80 h bereits um 85 % ab; nach 122 h ist sie, wie bereits erwähnt, verflüssigt.

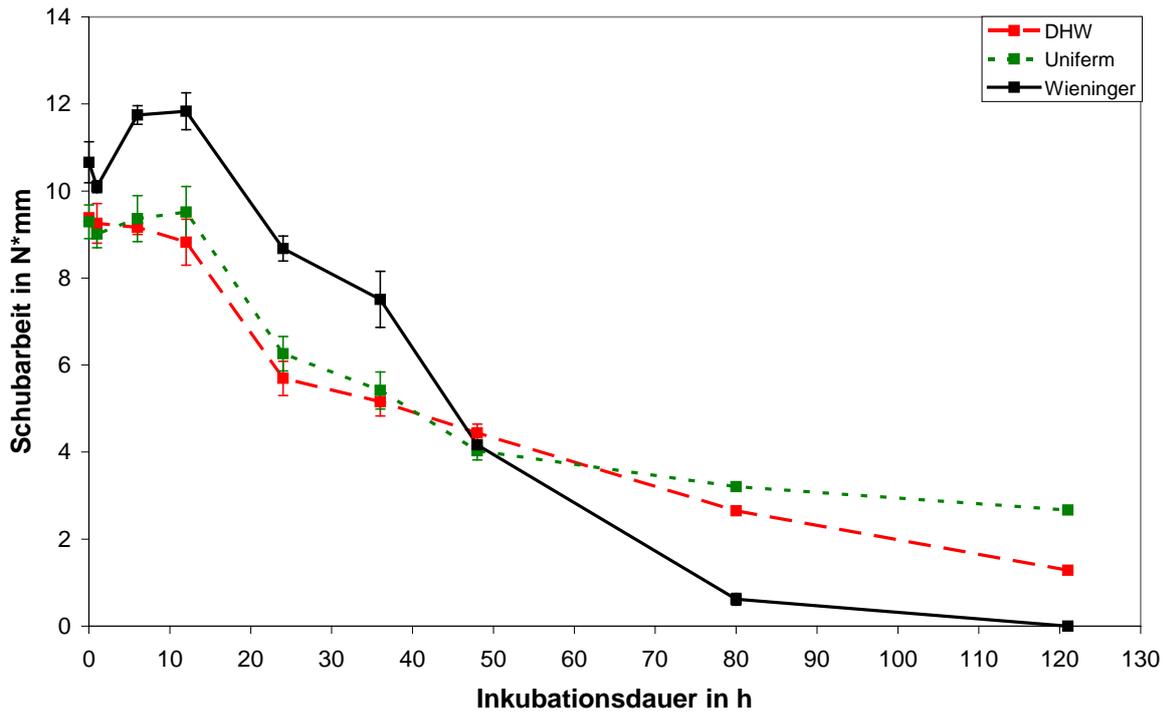


Abb. 4.70: Plastizitätsverläufe der bei 35°C gelagerten Backhefewürfel

Lagerung bei 4°C

Nach sechstägiger Lagerung bei 4°C sind weder Veränderungen in der Porphyrin-fluoreszenzintensität (s. Abb. 4.71) noch in der Plastizität der Backhefewürfel zu beobachten (s. Abb. 4.72). Wie bereits während der Lagerung bei 35°C bzw. 50°C nimmt die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität der Uniform und Wienerer Backhefe ab, nämlich um 11 % bzw. 42 %. Im Gegensatz dazu steigt die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität der DHW Backhefe um 5 %. Die Flavinfluoreszenz der DHW und Wienerer Backhefe nimmt um 5 % bzw. 9 % zu, allerdings sinkt die Flavinfluoreszenzintensität bei Uniform um 20 %.

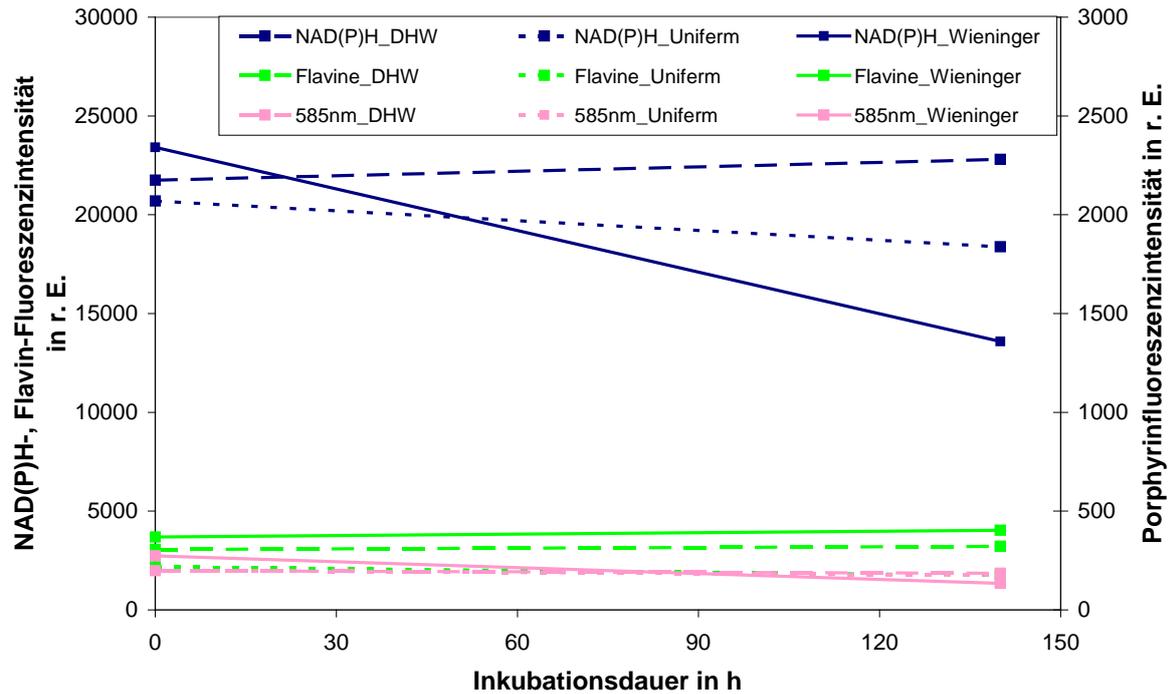


Abb. 4.71: Fluorophorverläufe der Backhefewürfel während der Lagerung bei 4°C

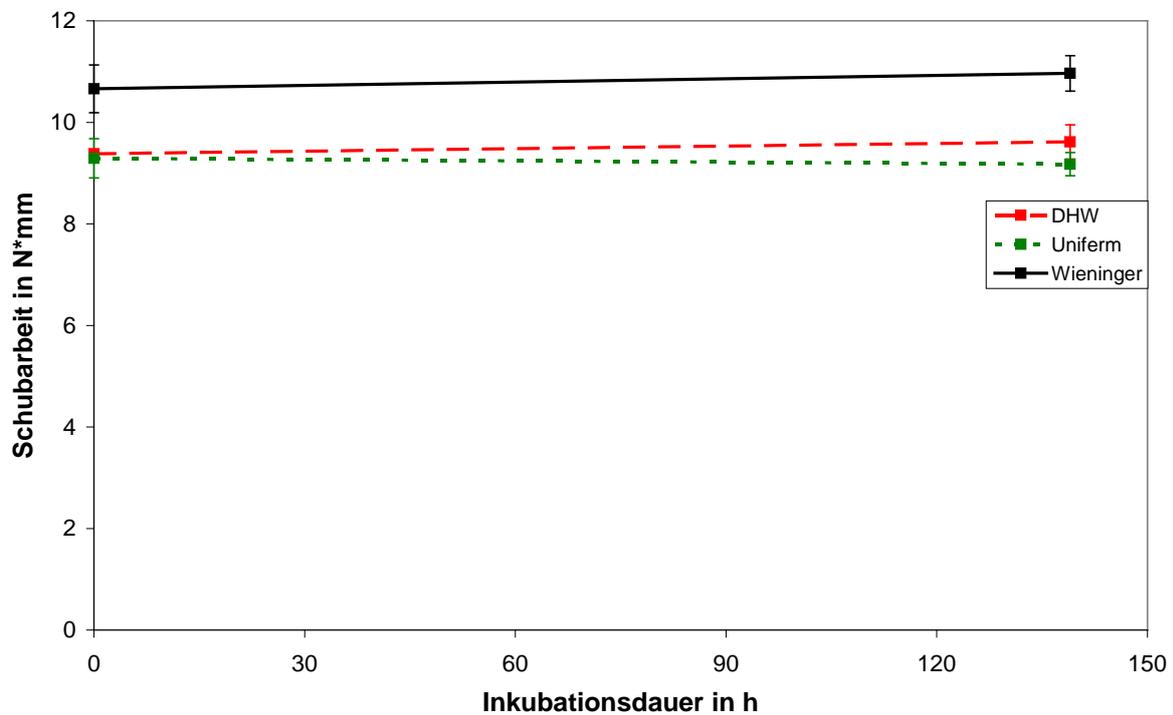


Abb. 4.72: Plastizitätsverläufe der bei 4°C gelagerten Backhefewürfel

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität um 585 nm ein Hinweis auf verminderte Lagerstabilität sein könnte. So verflüssigt sich die Uniform Backhefe als erste während der Lagerung bei 50°C nach 6 h. Die Zunahme der Porphyrinfluoreszenzintensität um 585 nm ist bei ihr bereits eine bzw. zwei Stunden früher zu detektieren als bei den anderen beiden Backhefen. Ebenso verhält es sich während der Lagerung bei 35°C. Hier tritt die charakteristische Fluoreszenzintensitätszunahme ausschließlich bei Wieninger auf; diese ist die einzige Hefe, die nach fünf Tagen verflüssigt ist.

4.3.4 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der faseroptische Fluoreszenzmessaufbau wurde auch bei der Kultivierung von *E. coli* eingesetzt, um evtl. Rückschlüsse auf das Stoffwechselgeschehen ziehen zu können. Die Batch-Kultivierung fand aerob mit Glucose und Lactose als Kohlenstoffquellen statt. Es wird erwartet, dass *E. coli* diese Kohlenstoffquellen sequenziell nutzt, beginnend mit Glucose, da die Synthese der zum Lactoseabbau notwendigen Enzyme (*lac*-Operon) durch Glucose gehemmt wird. Die Substrat- und Produktverläufe während der Kultivierung sind in Abb. 4.73 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass die Glucose bevorzugt verstoffwechselt wird, jedoch nach ca. 3 h auch der Lactoseabbau beginnt. Durch den Lactoseabbau nehmen die Glucose- sowie Galactosekonzentration nach 5 h zu. Schon etwa eine Stunde vorher fängt *E. coli* an, als Nebenprodukte Acetat und Formiat zu bilden. Dies ist durch die hohe Glucosekonzentration bedingt. Weitere Nebenprodukte sind Ethanol, Lactat und Succinat, die nach ca. 10-12 h Kultivierungsdauer produziert werden. Nachdem die Lactose aufgebraucht ist, beginnt *E. coli*, die Nebenprodukte als Kohlenstoffquellen zu nutzen (bis ca. 26 h). Nur Formiat bleibt in etwa gleicher Konzentration (etwa 1 mg/L) im Medium vorhanden.

Die Fluorophorverläufe sind in Abb. 4.74 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass im Gegensatz zur Hefe die Flavinfluoreszenz im Verhältnis zur NAD(P)H-Fluoreszenz bei *E. coli* wesentlich stärker ausgeprägt ist. Anstelle zwischen 10 und 60 % beträgt die Flavinfluoreszenzintensität bei *E. coli* etwa das Doppelte der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität.

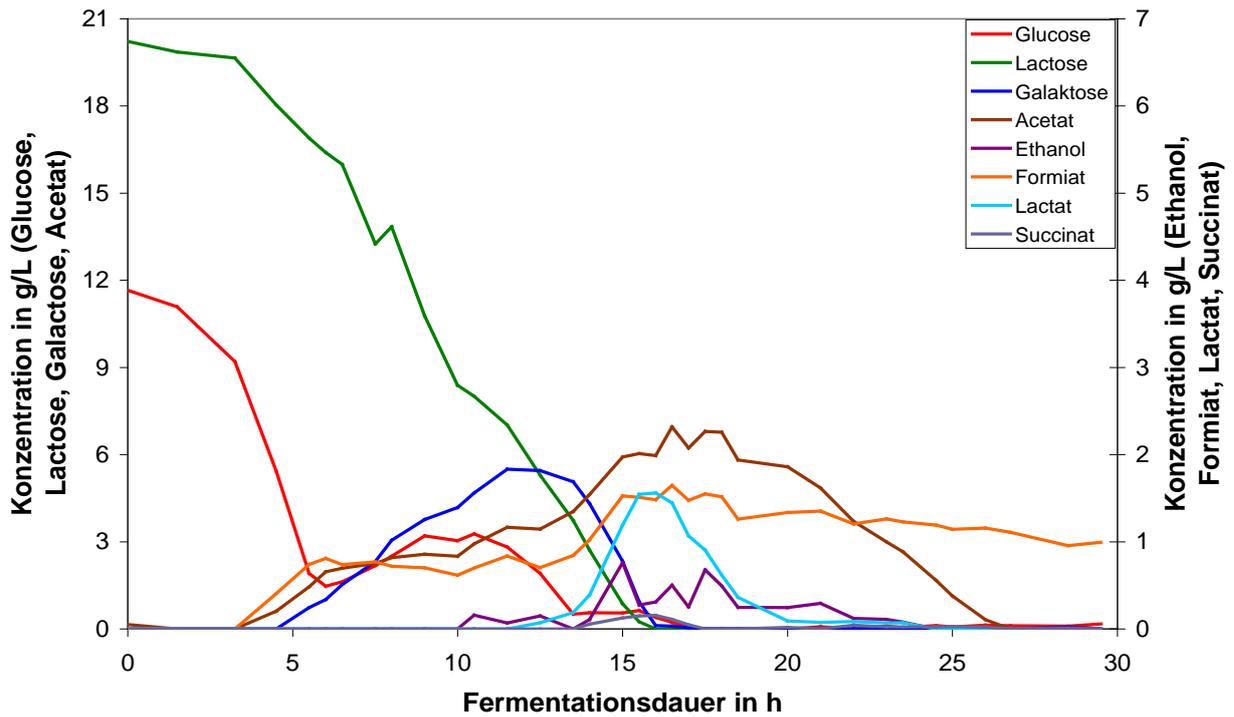


Abb. 4.73: Substrat- und Produktverläufe der aeroben Batch-Kultivierung von *E. coli*

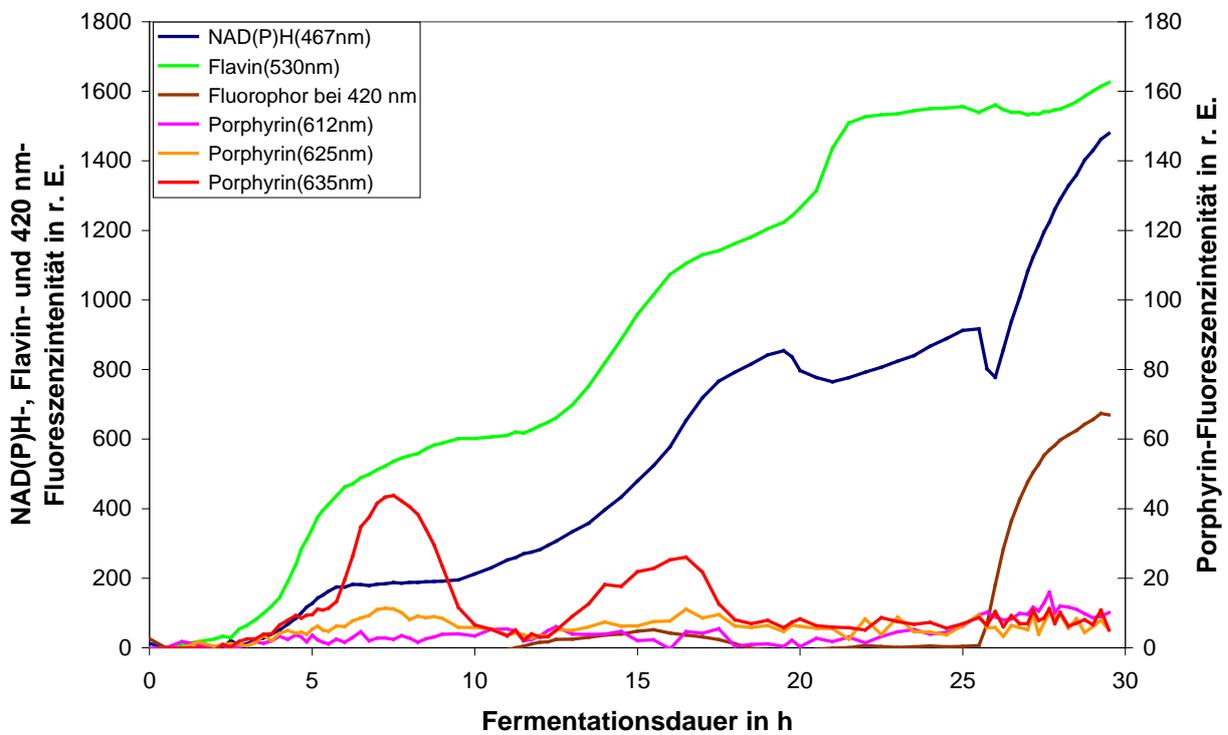


Abb. 4.74: Fluorophorverläufe der aeroben Batch-Kultivierung von *E. coli*

Anhand der Substrat- und Produktverläufe wird überprüft, ob die erhaltenen Fluorophorverläufe in Zusammenhang mit dem Stoffwechselgeschehen gebracht werden können.

Nach etwa 5 h nimmt die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität nicht weiter zu. Dies deutet darauf hin, dass die zuerst metabolisierte Glucose aufgebraucht ist und nun die Lactose als Kohlenstoffquelle genutzt wird (s. Abb. 4.73). Nach ca. 17 h steigt die NAD(P)H-Fluoreszenz langsamer an, dies ist wahrscheinlich auf den Verbrauch der aus der Lactose gebildeten Monosaccharide zurückzuführen. Als neue Kohlenstoffquellen werden anschließend vor allem vorher gebildetes Lactat und Acetat genutzt. Ethanol und Succinat sind zu diesem Zeitpunkt nur in geringen Mengen vorhanden. Der erste deutliche Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenz um 10 % findet nach etwa 20 h statt. Hier ist das Lactat aufgebraucht und *E. coli* stellt auf Acetat-Abbau um. Als dieses nach 25,5 h verstoffwechselt ist, tritt erneut ein Rückgang der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität um 15 % auf. Etwa zeitgleich steigt die Fluoreszenzintensität bei 420 nm, die sehr wahrscheinlich von einem noch nicht identifizierten Fluorophor herrührt. Diese Fluoreszenz verursacht den scheinbaren Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenz nach 26 h, da beide Fluorophore überlagern. Im Gegensatz zur Multikomponentenanalyse kann die Fluoreszenzintensität des unbekanntes Fluorophors nicht subtrahiert werden, da kein Normspektrum vorhanden ist, um den Einfluss auf die NAD(P)H-Fluoreszenz herauszurechnen.

Die Flavinfluoreszenzintensität zeigt die ersten 20 h einen ähnlichen Verlauf wie die NAD(P)H-Fluoreszenz und spiegelt damit auch den Substratabbau wider. Danach weichen beide Verläufe deutlich voneinander ab. Während die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität nach 20 h sinkt, steigt die Flavinfluoreszenz nochmals um 20 % an, um dann während des Acetatabbaus auf konstantem Niveau zu verharren.

Im Gegensatz zu Hefe ist bei *E. coli* nur eine Porphyrinfluoreszenz um 635 nm zu erkennen, die wahrscheinlich von PPIX verursacht wird. Es gibt keine nennenswerten Fluoreszenzemissionen bei 625 nm oder 612 nm (s. Abb. 4.74). Der Anstieg der PPIX-Fluoreszenz zwischen 5,5 und 7,5 h ist auf den Rückgang der Glucose in diesem Zeitraum zurückzuführen. Parallel dazu steigt auch der Gelöstsauerstoffanteil an (s. Abb. 4.75). Durch Induktion des *lac*-Operons beginnt *E. coli* nun, die Lactose aufzunehmen und in Glucose und Galactose zu spalten. Als Folge davon nimmt die Glucosekonzentration wieder zu, woraufhin die PPIX-Fluoreszenzintensität und der Gelöstsauerstoffanteil sinken. Nach 12,5 h ist die Glucosekonzentration erneut sehr niedrig (0,5 g/L), die PPIX-Fluoreszenzintensität und der Gelöstsauerstoffanteil steigen wieder an. Dieses Verhalten der PPIX-Fluoreszenz deutet auf eine Glucoserepression der Atmungskettenbestandteile ähnlich wie bei der Hefe hin. Wenn nach 16,5 h auch die Galactose verbraucht ist, sinkt die PPIX-Fluoreszenz. Dies kann daran

liegen, dass durch die anschließende Metabolisierung des Lactats und Acetats der Citratcyclus nicht mehr vollständig durchlaufen wird und die Atmungskettenkapazität sinkt.

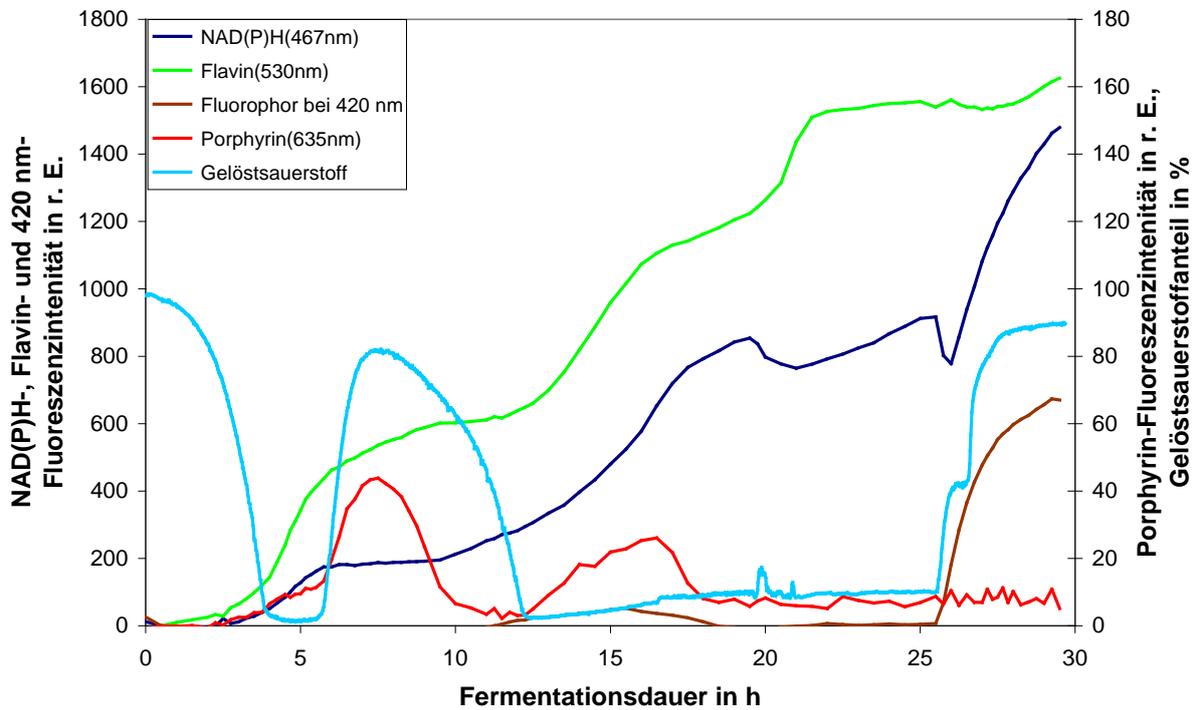


Abb. 4.75: Verläufe der NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrinfloureszenzintensität sowie des Gelöstsauerstoffanteils während der aeroben Batch-Kultivierung von *E. coli*

Weiterhin wurde bei der *E. coli* Kultivierung auch die Streulichtintensität zur Verfolgung der Zelldichte gemessen. In Abb. 4.76 ist sie im Vergleich zur Biotrockenmasse aufgetragen. Beide Verläufe stimmen wie bereits bei den Hefekultivierungen gut überein.

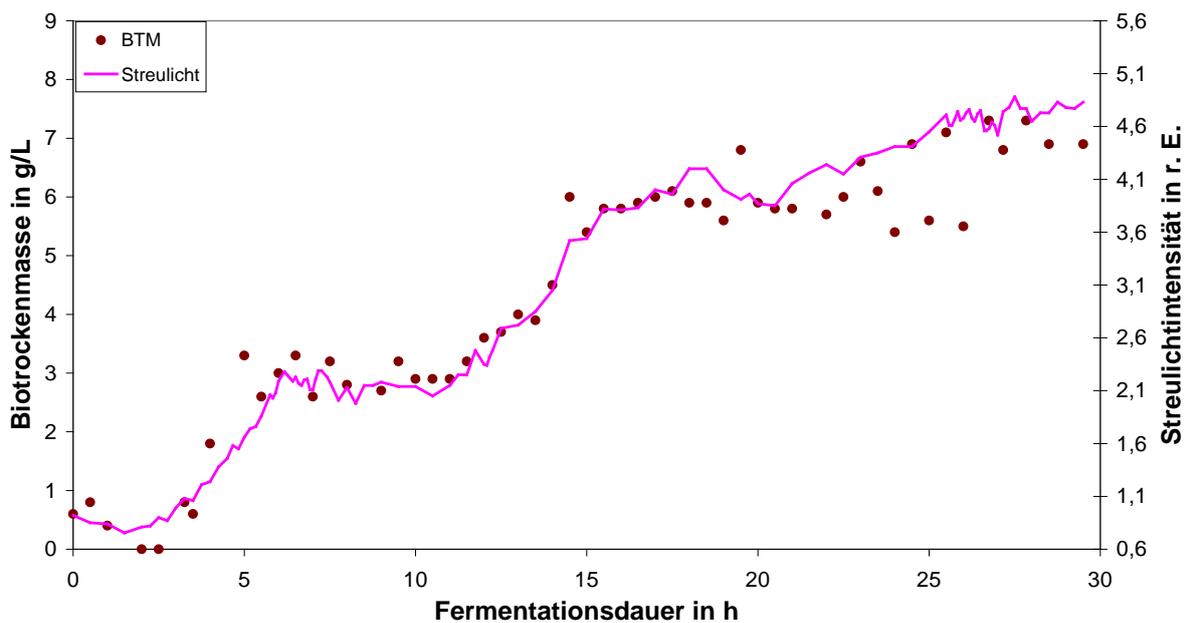


Abb. 4.76: Vergleich zwischen Streulichtmessung und Biotrockenmasse der *E. coli* Kultivierung

4.4 Biomedizinische Anwendungen

Ein weiteres Einsatzgebiet der Fluoreszenzspektroskopie in dieser Arbeit war die Fluoreszenzdiagnostik bei biomedizinischen Anwendungen. Hierfür wurden zum einen Patienten mit Aktinischer Keratose untersucht, zum anderen wurden humane Glioblastomzellen im Mausmodell betrachtet. Ziel hierbei war es, herauszufinden, ob bereits die native Fluoreszenz des neoplastischen Gewebes ausreicht, um es von gesundem Gewebe unterscheiden und damit eine Diagnose treffen zu können. Des Weiteren wurden das Aufbau- sowie das Abbauverhalten der verwendeten Präkursoren - Methyl- bzw. Butylester der Aminolävulinsäure - bestimmt.

4.4.1 Fluoreszenzdiagnostik bei Aktinischer Keratose

Die Patienten wurden mit dem Methylester der Aminolävulinsäure (Metvix[®]) an den betroffenen Hautarealen eingecremt. Dieser ist im Gegensatz zur freien Säure hochspezifisch für neoplastisches Gewebe und führte dort nach wenigen Stunden zu einer ausgeprägten Akkumulation des PPIX. Das Fluoreszenzmuster im Bereich der PPIX-Emission (635 nm) unterscheidet sich in den befallenen Geweben deutlich von gesundem Gewebe (s. Abb. 4.77).

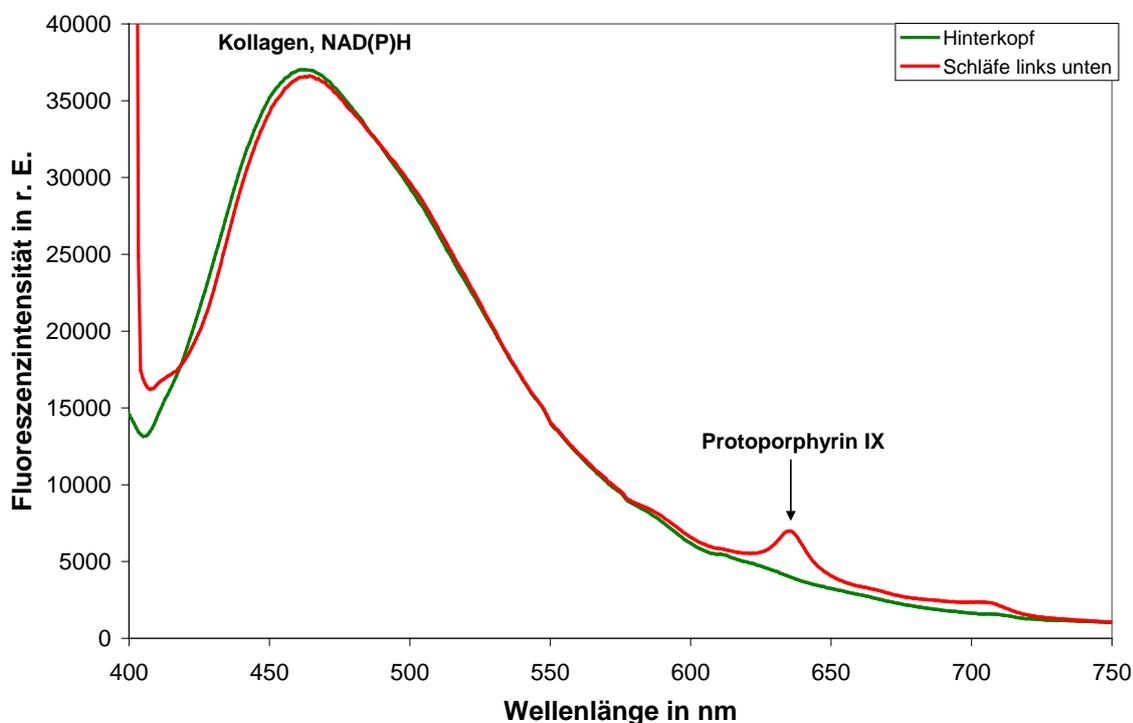


Abb. 4.77: Fluoreszenzspektroskopischer Vergleich zwischen intaktem (Hinterkopf) und keratösen Gewebe (Schläfe) nach Applikation von Metvix[®]

4.4.1.1 Anreicherung des PPIX in neoplastischem Gewebe

Exemplarisch für die anderen Hautstellen mit Aktinischer Keratose zeigen die Fluoreszenzspektren in Abb. 4.78 die zeitliche Akkumulation von PPIX an der „Schläfe links, unten“.

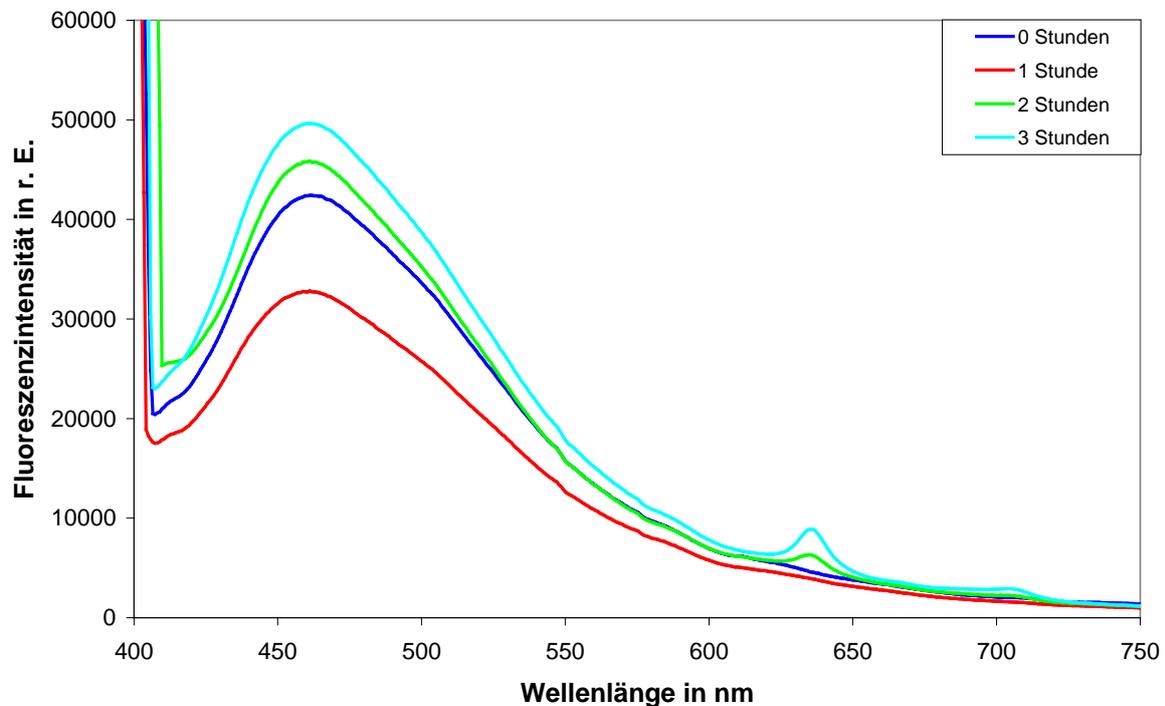


Abb. 4.78: Aufbaukinetik des PPIX nach Auftragen von Metvix® (Schläfe links unten, Patient 1)

Diese ist erkennbar anhand der allmählichen Zunahme der Emissionsbande bei 636 nm mit einem zusätzlichen Nebenmaximum um 705 nm. Kurz nach der Applikation der Creme ist kaum PPIX-Fluoreszenz erkennbar, sie beträgt nur 24 r. E., und nach einer Stunde nur sehr wenig (141 r. E.). Dagegen ist nach zwei Stunden eine Verzehnfachung gegenüber dem Einstundenwert zu sehen. Zum Zeitpunkt drei Stunden verdreifacht sich die Fluoreszenzintensität noch einmal. Überlagert wird die PPIX-Fluoreszenz durch die langwellig abfallenden Flanken der endogenen Fluorophore, deren maximale Fluoreszenzemission im Bereich um 460 nm liegt (Untergrundfluoreszenz). Dort fluoreszieren hauptsächlich Kollagen und NAD(P)H. Die starke Variation in diesem Bereich ist darauf zurückzuführen, dass die Sonde nicht fest montiert war und somit nicht gewährleistet werden konnte, dass stets dieselbe Stelle vermessen wurde. Des Weiteren sind die Intensitätsschwankungen der Fluoreszenzbande um 460 nm durch Helligkeitsunterschiede der Haut, hervorgerufen durch unterschiedliche Pigmentierung, bestimmt. Zur Bestimmung der PPIX-Fluoreszenzintensität bei 636 nm muss die Untergrundfluoreszenz abgezogen werden. Dies erfolgt anhand einer Basislinienkorrektur. Dafür werden zunächst die Fluoreszenzintensitäten bei 616 nm und 665 nm bestimmt, die

den Anfangs- bzw. Endpunkt der Basislinie definieren. Der Mittelwert der Intensitäten bei 616 und 665 nm wird von der Fluoreszenzintensität bei 636 nm subtrahiert, sodass die korrigierte PPIX-Fluoreszenzintensität erhalten wird.

Abb. 4.79 zeigt, dass an sämtlichen Stellen mit Aktinischer Keratose ab ca. einer Stunde nach dem Auftragen der Metvix[®]-Creme ein PPIX-Anstieg zu verzeichnen ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass zu den Zeitpunkten zwei und drei Stunden die PPIX-Akkumulation an bisher noch nicht behandelten neoplastischen Hautstellen (Schläfe) zwei- bzw. viermal höher ist als an bereits einmal behandelten (Stirn). Damit ist ein erster Behandlungserfolg in Form von niedriger ausgeprägter PPIX-Fluoreszenzintensität sichtbar.

Die mit dem Messaufbau erhaltenen Daten lassen darauf schließen, dass das Maximum der PPIX-Konzentration im zu behandelnden Gewebe nach drei Stunden Einwirkzeit noch nicht erreicht sein dürfte. Der Hersteller Photocure empfiehlt, zu diesem Zeitpunkt mit der Photodynamischen Therapie, das heißt Bestrahlung mit der Aktilite[®] Lampe, zu beginnen.

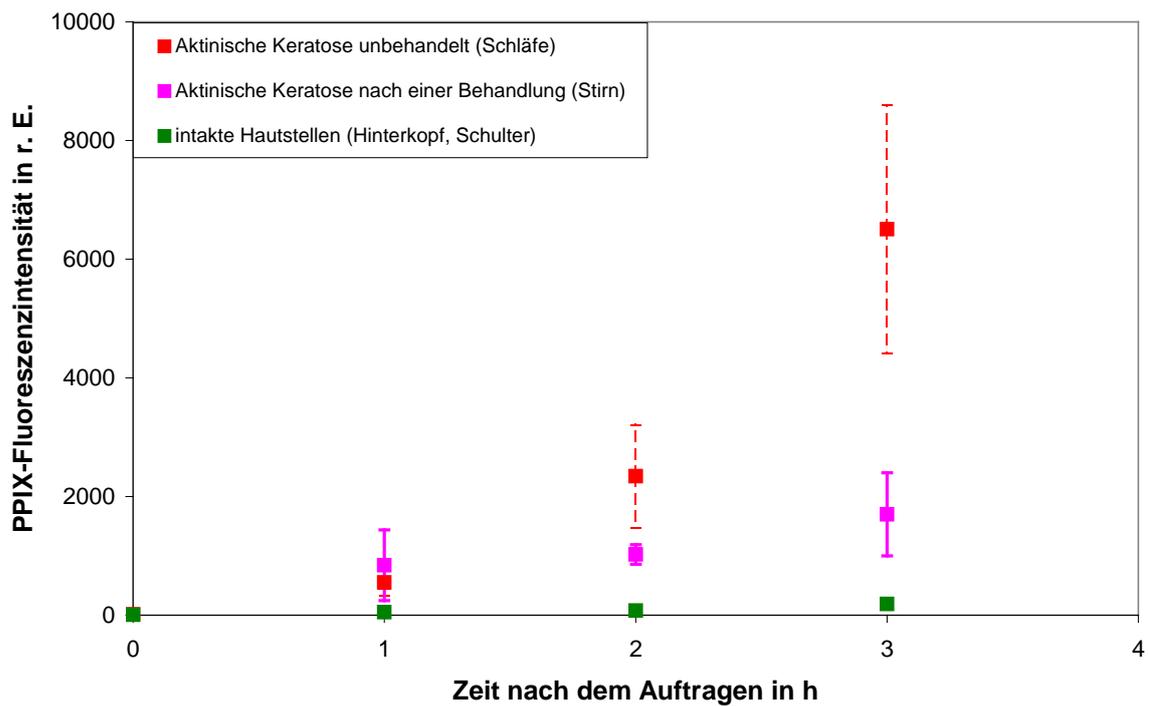


Abb. 4.79: Aufbaukinetik des gebildeten PPIX in verschiedenen Hautstellen (Patient 1)

Bei einem zweiten Patienten, der starke Aktinische Keratose an beiden Händen hatte, sind die Resultate mit denen von Patient 1 vergleichbar. In Abb. 4.80 sind die Fluoreszenzspektren nach der Applikation von Metvix® gezeigt.

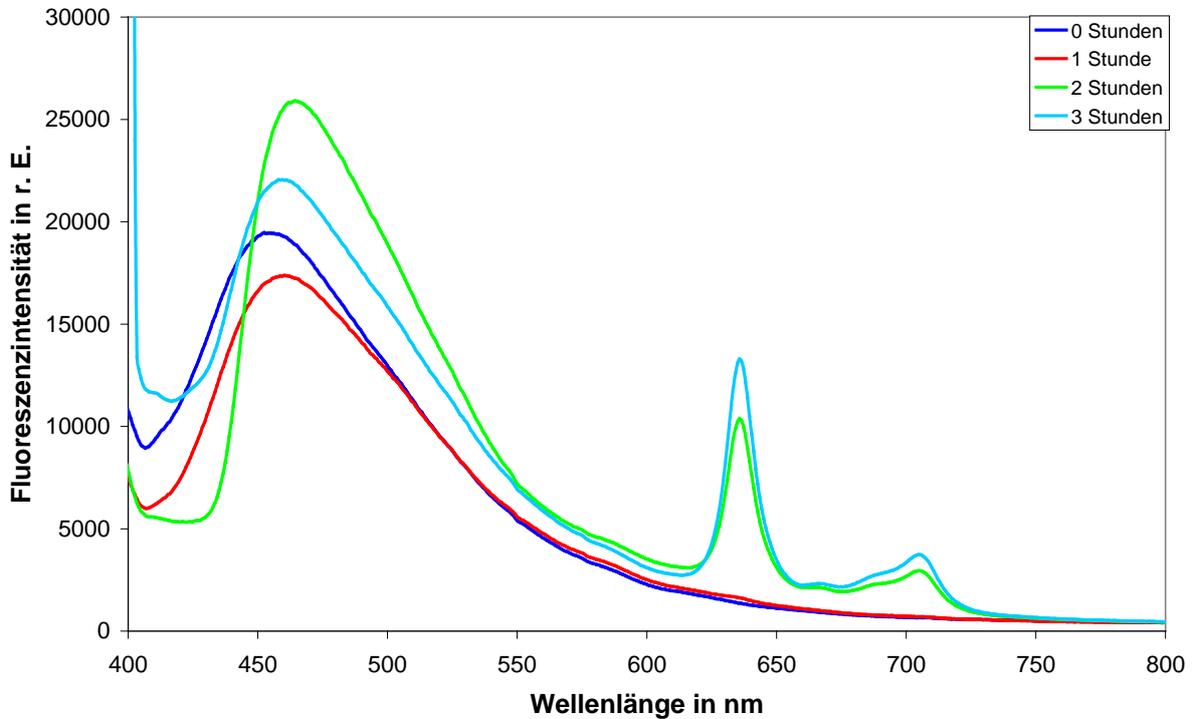


Abb. 4.80: Aufbaukinetik des PPIX nach Auftragen von Metvix® (Handgelenk links, Patient 2)

Auch hier ist nach einer Stunde nur eine schwache PPIX-Fluoreszenz detektierbar, während nach zwei und drei Stunden sehr hohe Fluoreszenzintensitäten gemessen werden (s. Abb. 4.81).

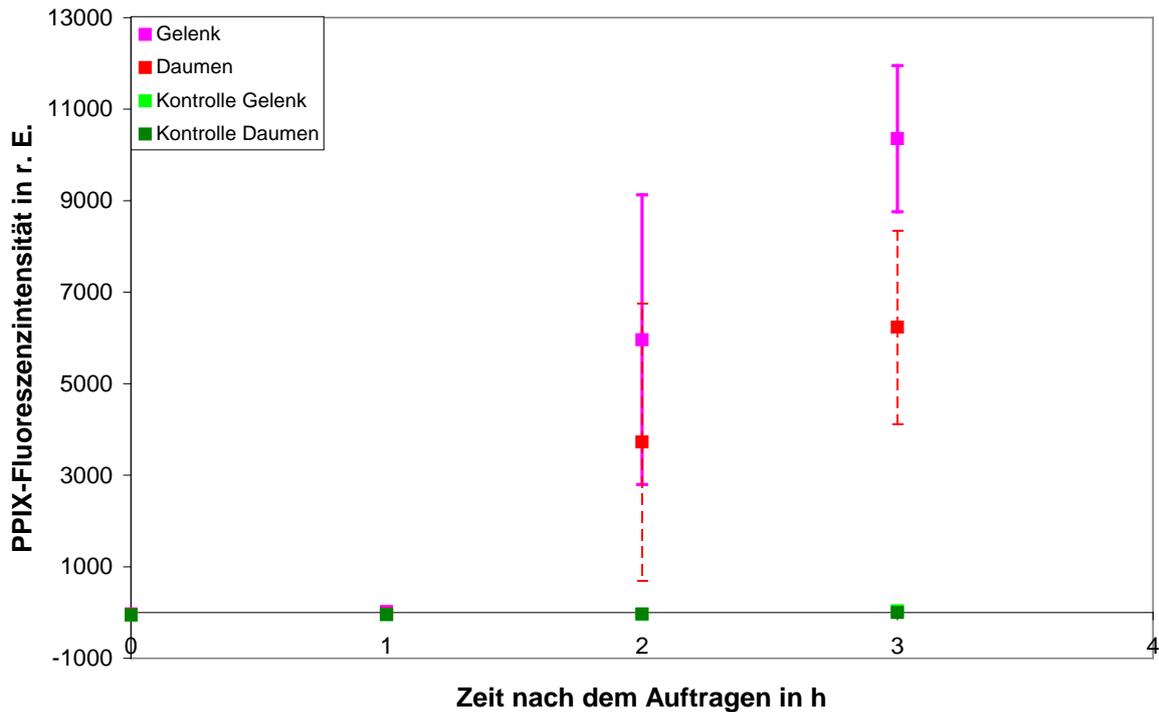


Abb. 4.81: Aufbaukinetik des gebildeten PPIX in verschiedenen Stellen der linken Hand (Patient 2)

In den folgenden Abbildungen sind die Fluoreszenzdiagnostik und die Photodynamische Therapie bei Patient 2 dargestellt. Zunächst zeigt Abb. 4.82 die rechte Hand nach der ersten Behandlung. Es sind immer noch Stellen mit Aktinischer Keratose erkennbar. In der nächsten Abbildung wurde drei Stunden nach Metvix[®]-Applikation mit Woodlicht großflächig die Fluoreszenz der von Aktinischen Keratose befallenen Hautstellen angeregt (s. Abb. 4.83). Woodlicht emittiert blaues Licht, das zur Fluoreszenzdiagnostik benutzt wird (ist nicht Bestandteil der Behandlung). Das damit angeregte akkumulierte PPIX fluoresziert rötlich. Nach der darauffolgenden Bestrahlung für 444 s im Rahmen der PDT mit der Aktilite[®]-Lampe, die rotes Kaltlicht emittiert, ist unter dem Woodlicht die rote Fluoreszenz verschwunden (s. Abb. 4.84). Bereits eine Woche später waren die Wunden weitgehend verheilt (s. Abb. 4.85).



Abb. 4.82: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand vor Bestrahlung mit Aktelite[®]-Lampe (Weißlicht-Aufnahme)



Abb. 4.83: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand vor Bestrahlung mit Aktelite[®]-Lampe (Woodlicht-Aufnahme)



Abb. 4.84: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand direkt nach Bestrahlung mit Aktilite[®]-Lampe (Woodlicht-Aufnahme)



Abb. 4.85: Rechte Hand mit Aktinischer Keratose, Zustand eine Woche nach Bestrahlung mit Aktilite[®]-Lampe (Weißlicht-Aufnahme)

Bei beiden Patienten konnten mit dem Messaufbau nicht nur zweifelsfrei alle vom Dermatologen vorher als keratös erkannten Areale identifiziert werden, sondern es wurde bei Patient 2 auch eine für den Arzt bisher als nicht befallen geltende Hautstelle detektiert.

4.4.1.2 Ausbleichen der PPIX-Fluoreszenz während der PDT

Das Ausbleichen der PPIX-Fluoreszenz wird exemplarisch anhand der Bestrahlung der linken Hand bei Patient 2 mittels Aktilite[®]-Lampe beschrieben. Bereits nach zwei Minuten Bestrahlungsdauer beträgt die PPIX-Fluoreszenzintensität nur noch ca. 10 % des Ausgangswertes (s. Abb. 4.86). Nach der Behandlungsdauer von 444 s ist das vorher akkumulierte PPIX nahezu vollständig abgebaut (vgl. Abb. 4.83, Abb. 4.84). Dies ist bei allen Messungen zu beobachten.

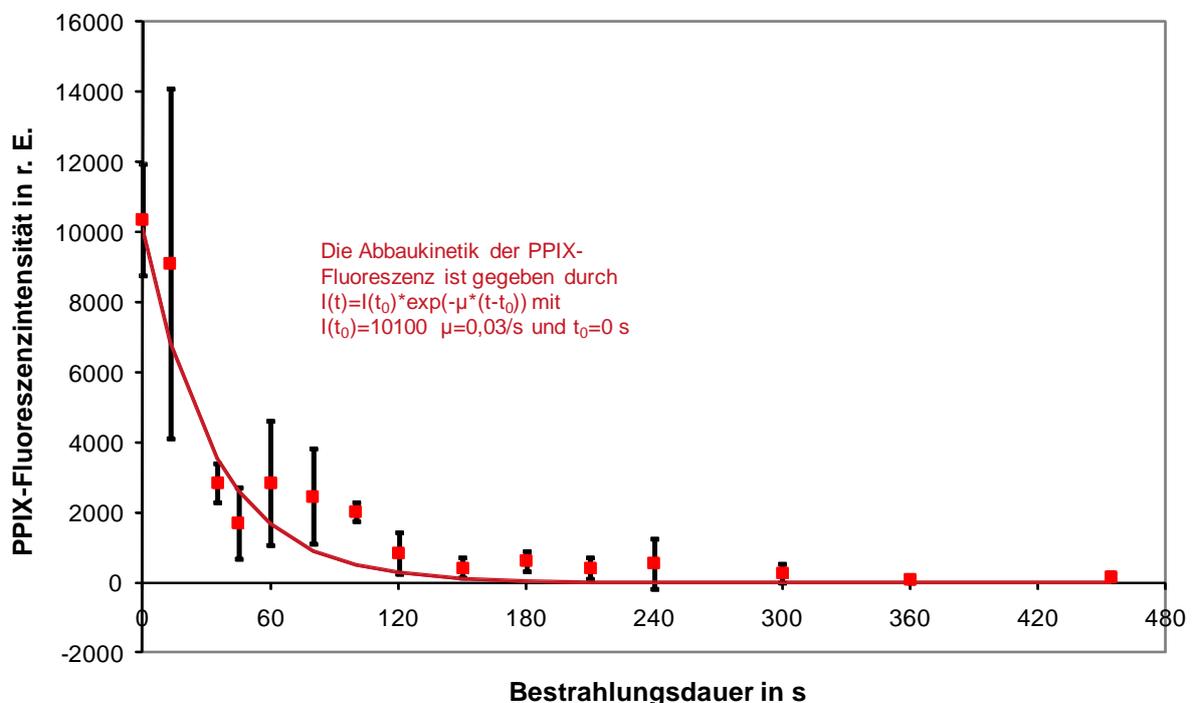


Abb. 4.86: Abbaukinetik des PPIX an der mittels Aktilite[®]-Lampe bestrahlten Hautstelle (linke Hand)

Zusätzlich zur PPIX-Fluoreszenz kann auch die Fluoreszenz des Photoporphyrins mit einem Emissionsmaximum zwischen 670 und 675 nm detektiert werden. Photoporphyrin ist ein Photoprodukt, das während der PDT entsteht (s. Abb. 4.87). Hier bildet es sich nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 90 s aus. Nach Ende der Bestrahlung beträgt dessen Fluoreszenzintensität ebenso wie die des PPIX nur 1 % der Intensität zu Bestrahlungsbeginn.

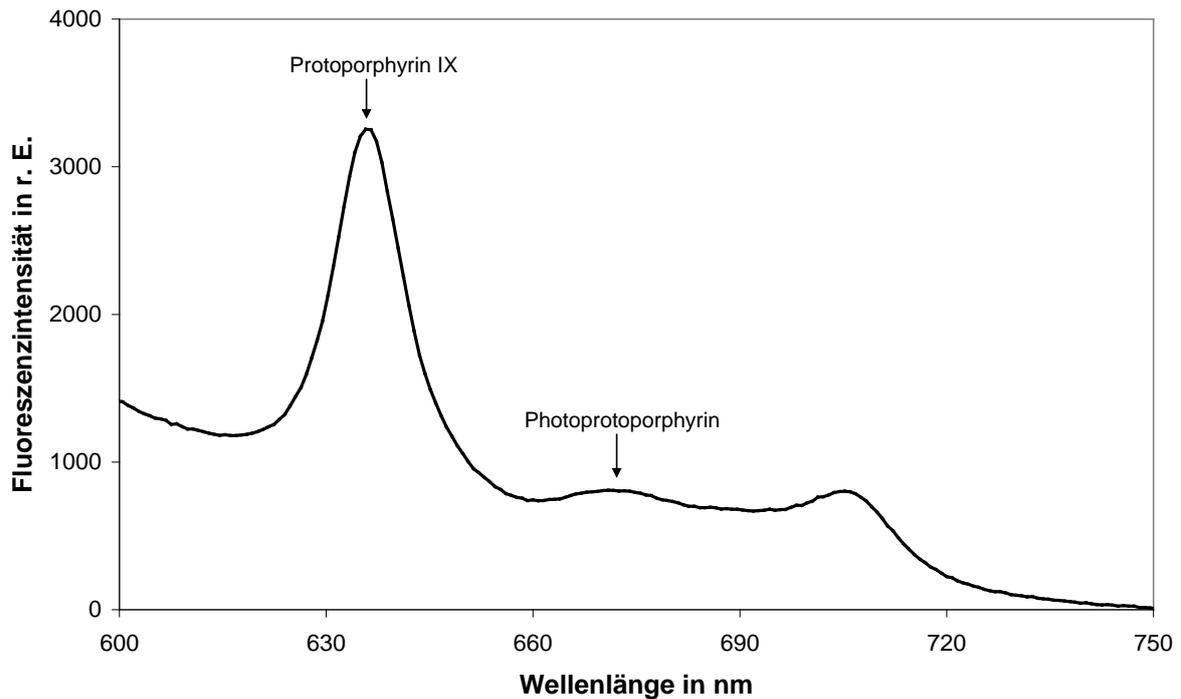


Abb. 4.87: Fluoreszenzspektrum während der PDT, bei der das Abbauprodukt Photoporphyrin entsteht; aufgenommen nach 100 s Bestrahlungsdauer

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in 3.1.1 beschriebene Aufbau geeignet ist, sowohl das Aufbau- als auch das Abbauverhalten von PPIX bei Aktinischer Keratose verfolgen zu können. Des Weiteren kann die Spezifität von Metvix[®] in diesen Messungen bestätigt werden, es ist nahezu keine PPIX-Anreicherung in gesundem, benachbarten Gewebe festzustellen.

Darüber hinaus ist anzunehmen, dass das Maximum der PPIX-Anreicherung erst nach den empfohlenen drei Stunden Einwirkdauer erreicht wird. Der Behandlungserfolg könnte eventuell dadurch gesteigert werden, dass die Bestrahlung später als nach drei Stunden Einwirkdauer erfolgt, da dann eine größere Akkumulation von PPIX im befallenen Gewebe vorliegen könnte.

4.4.2 Fluoreszenzdiagnostik beim Glioblastom im Mausmodell

Die Aufbaukinetik des akkumulierten PPIX wurde an Mäusen, denen humane Glioblastomzellen in eine Rückenhautkammer implantiert worden waren, gemessen. Glioblastome sind Hirntumore und bestehen daher wie Aktinische Keratose aus neoplastischem Gewebe. Statt des Methylesters wurde hier der Butylester der Aminolävulinsäure (butyl-ALA) verwendet. Eine butyl-ALA-Lösung wurde den Mäusen injiziert und über einen Verlauf von über 3,5 h die PPIX-Fluoreszenz gemessen. Als Kontrolle dienten Mäuse ohne implantierte Tumorzellen in die Rückenhautkammer.

Ziel der Messungen war, herauszufinden, ob sich beim Glioblastom gesundes und malignes Gewebe unterscheiden. Zum einen vor Zugabe eines Markers, das heißt, durch Unterschiede bezüglich der endogenen Fluoreszenz, zum anderen nach Zugabe des Präkursors butyl-ALA, der sich im Gegensatz zur freien Säure ALA selektiv im Tumor anreichern sollte.

In Abb. 4.88 ist zu erkennen, dass vor Markergabe keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollmaus festzustellen sind. Damit ist anhand der Autofluoreszenz keine eindeutige Aussage über gesundes oder malignes Gewebe zu treffen. Erst zwei Stunden nach Applikation des butyl-ALA ist ein deutlicher Anstieg der PPIX-Fluoreszenz im Tumor um das Zweifache gegenüber gesundem Gewebe zu verzeichnen. Der Unterschied ist auch nach fast drei Stunden noch vorhanden, wenngleich die PPIX-Fluoreszenzintensität zu diesem Zeitpunkt bereits um 50 % gegenüber dem Zweistundenwert abnimmt und eine Stunde später erneut um 50 % sinkt. Im Gegensatz zur Aktinischen Keratose steigt hier auch die PPIX-Fluoreszenzintensität der Kontrolle um etwa das Vierfache an. Die Ursache könnte in dem verwendeten Butylester liegen, der eventuell eine geringere Spezifität als der Methylester aufweist. Weiterhin könnte der Rückgang der Fluoreszenzintensität nach dem Maximum bei zwei Stunden in dem schnelleren Stoffwechsel der Maus begründet sein.

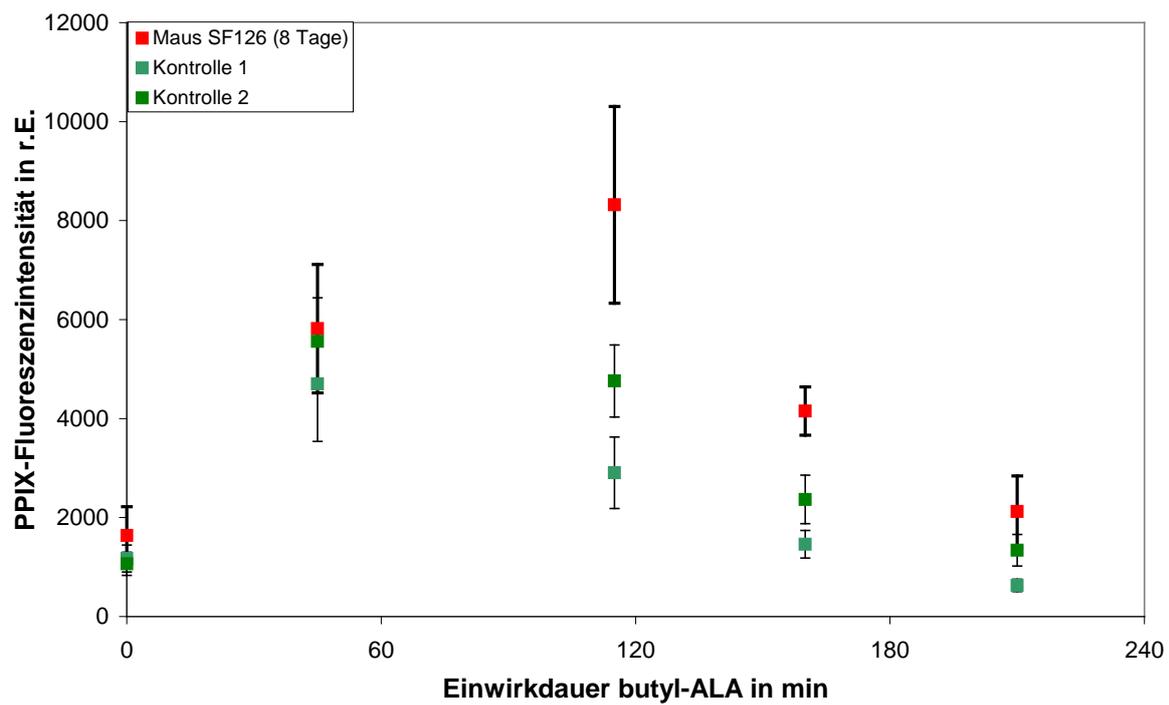


Abb. 4.88: Auf- und Abbaukinetik des gebildeten PPIX nach butyl-ALA Gabe bei Nacktmäusen

4.5 Vergleich der Fluoreszenzmessaufbauten

Der in 3.1.2 beschriebene Mehrkanalsensor wurde entwickelt, um den Aufbau kostengünstiger zu gestalten, gleichzeitig aber den kompakten und robusten Charakter beizubehalten. Des Weiteren bietet der Mehrkanalsensor den großen Vorteil, dass die Messung nicht vom Umgebungslicht beeinflusst wird. Er kann damit universell eingesetzt werden, ohne dass abgedunkelt werden muss. Dies ist insbesondere in der medizinischen Diagnostik von großer Bedeutung.

Analog zur bereits beschriebenen Mehrkomponentenanalyse musste auch für den Mehrkanalsensor ein Algorithmus zur Datenauswertung entwickelt werden. Zunächst wurde ebenfalls ein Referenzsignal (Medium bzw. Inokulumgabe) in allen Kanälen abgezogen. Des Weiteren mussten wie bei der Mehrkomponentenanalyse die Bereiche der Fluoreszenzüberlappung zwischen den Kanälen, das heißt, die Querempfindlichkeit ermittelt und anteilig subtrahiert werden (s. Abb. 4.89). So spricht zum Beispiel der Filter des Porphyrinkanals (635AF30) noch auf 20 % der Flavinfluoreszenz an. Außerdem ist der Flavinkanal (555AF70) durch den breiten Durchlassbereich des hierfür verwendeten Filters etwa um den Faktor 2,5 empfindlicher als der NAD(P)H-Kanal (465AF30) (vgl. Abb. 3.4). Dies muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

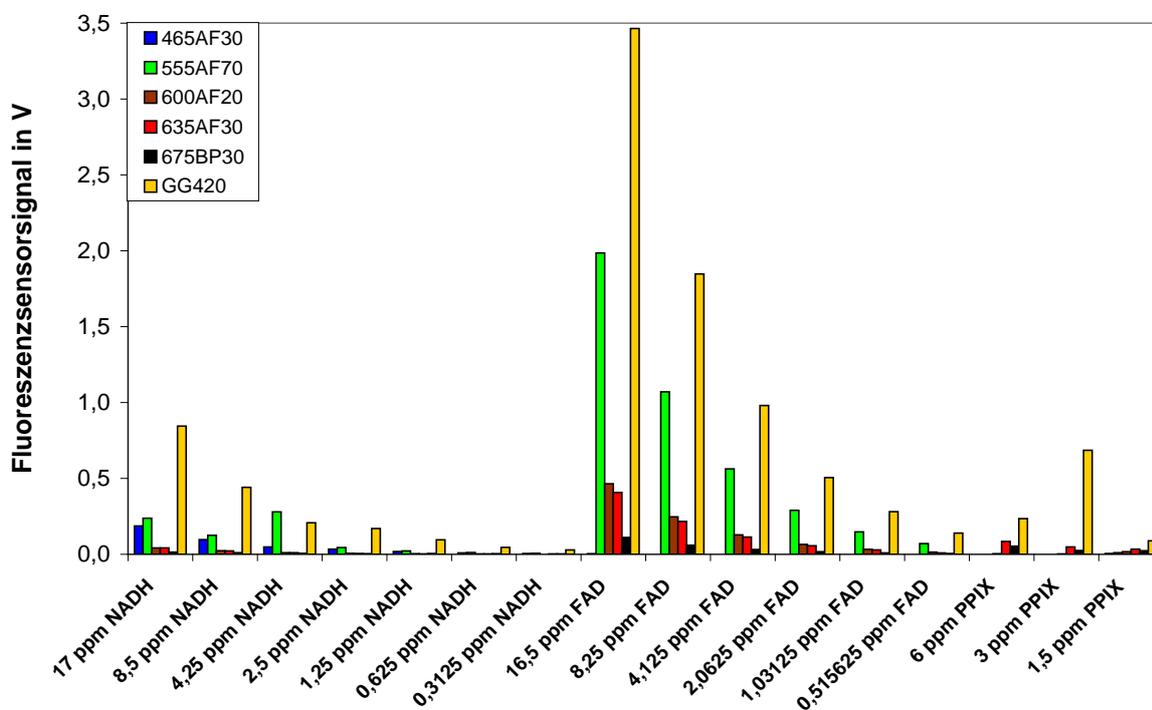


Abb. 4.89: Querempfindlichkeiten des Mehrkanalsensors (Matrix Phosphatpuffer pH 7,0)

In den folgenden Abbildungen sind die Nachweisempfindlichkeiten für NADH, FAD und PPIX der einzelnen optischen Kanäle aufgezeigt. In Abb. 4.90 ist zu erkennen, dass der Flavinkanal eine um den Faktor 1,3 höhere Empfindlichkeit für NADH besitzt als der NAD(P)H-Kanal. Dies ist in dem oben genannten breiten Durchlassbereich des Filters 555AF70 begründet. Dadurch wird die langwellige Flanke der NADH-Fluoreszenzemission vom Flavinkanal detektiert. Alle anderen Kanäle besitzen nur etwa 10–20 % der Nachweisempfindlichkeit des NAD(P)H-Kanals.

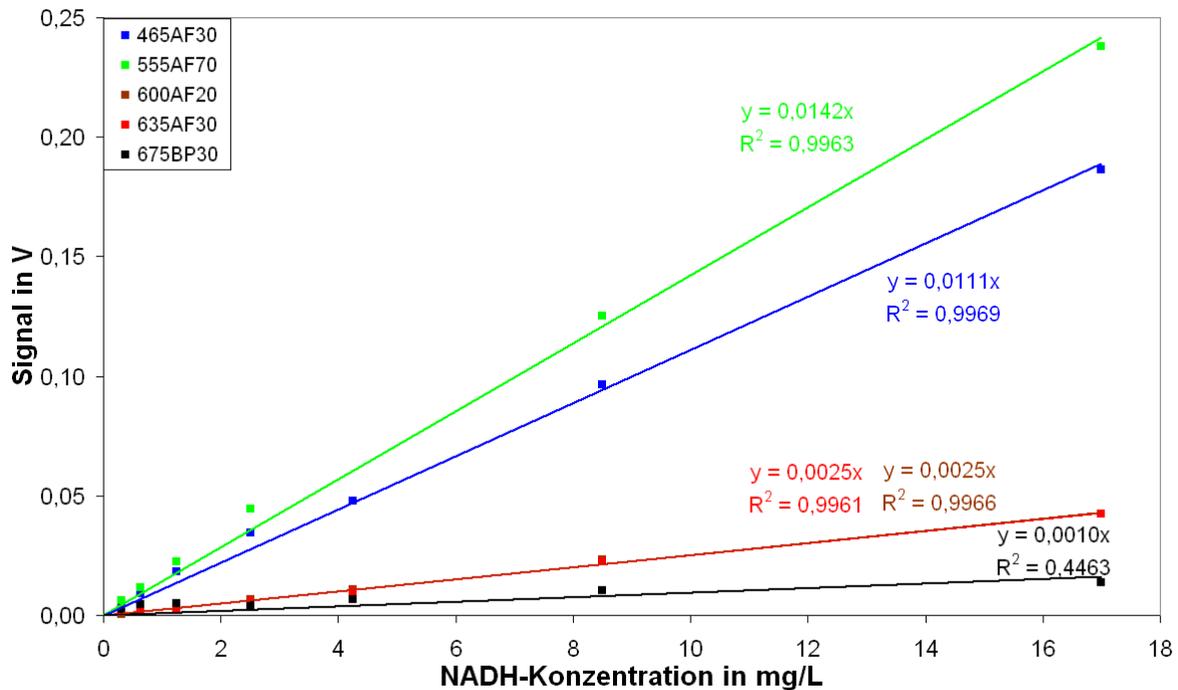


Abb. 4.90: Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für NADH

Abb. 4.91 zeigt die Nachweisempfindlichkeit für FAD der einzelnen Kanäle. Es ist zu sehen, dass der Flavinkanal eine um den Faktor neun höhere Empfindlichkeit für FAD als für NADH besitzt. Die Nachweisempfindlichkeit der anderen Kanäle für FAD beträgt < 20 % der des Flavinkanals.

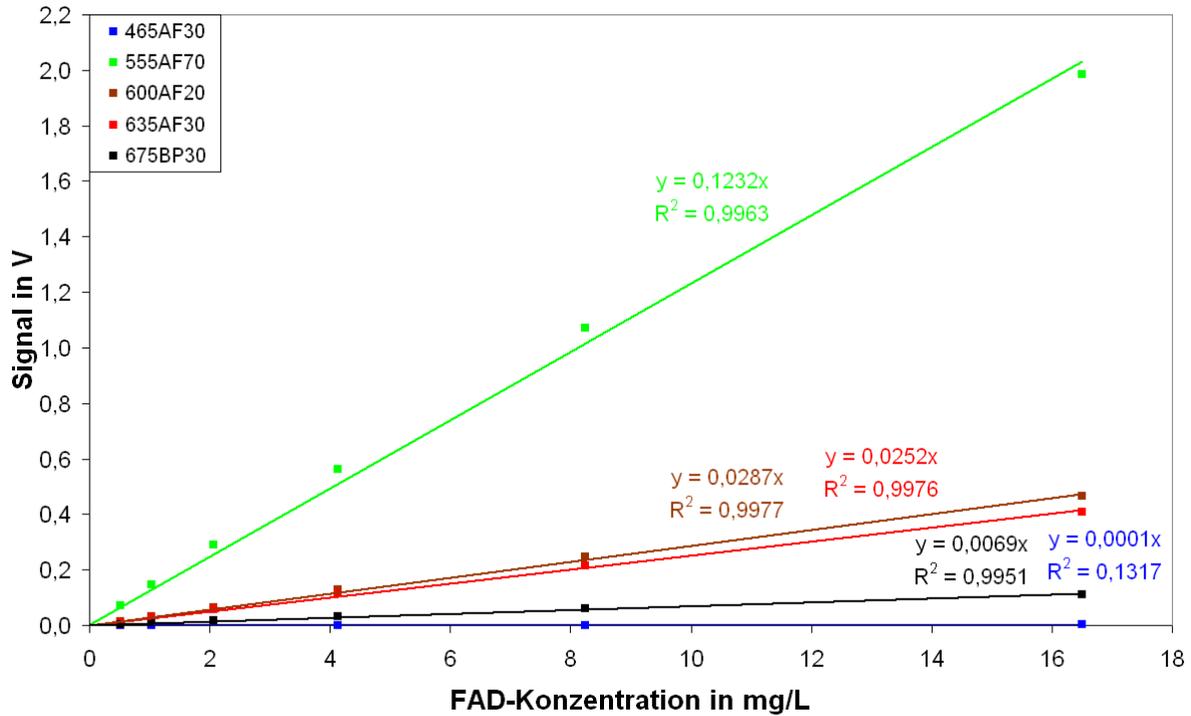


Abb. 4.91: Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für FAD

In der folgenden Abbildung ist die Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für PPIX dargestellt (s. Abb. 4.92).

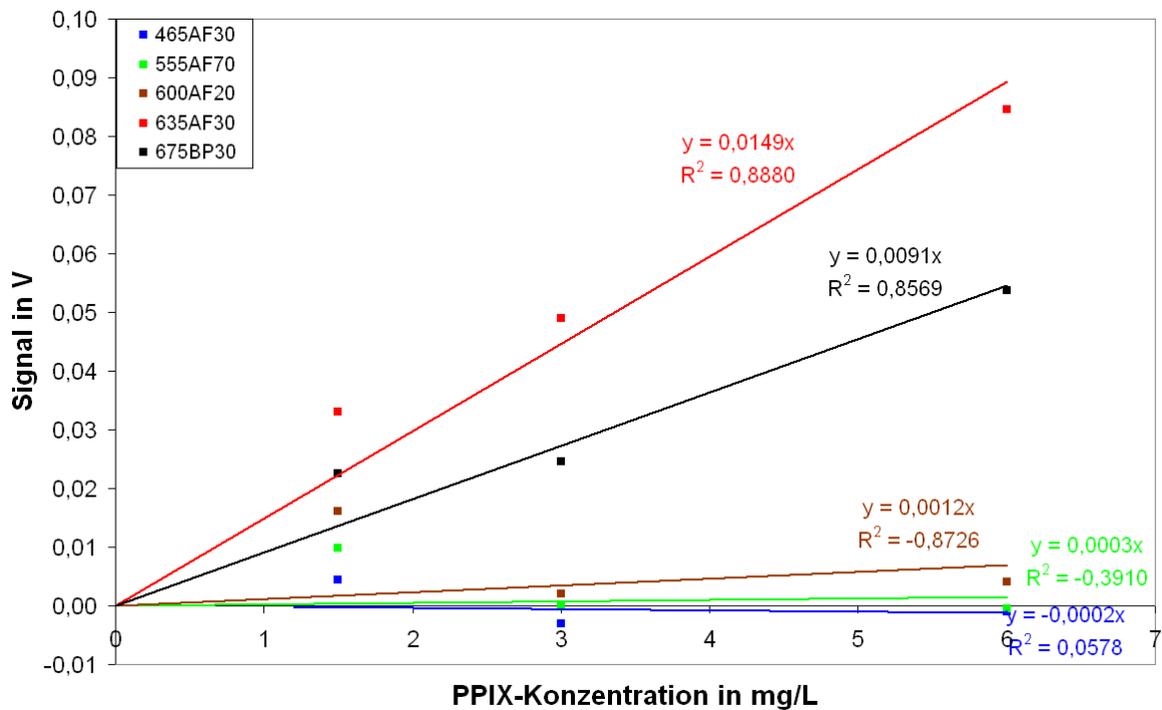


Abb. 4.92: Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Kanäle für PPIX

Dabei fällt auf, dass der Referenzkanal 675BP30 95 % der Nachweisempfindlichkeit des Porphyrinkanals besitzt. Die hohe Empfindlichkeit des Referenzkanals 675BP30 für PPIX ist damit zu erklären, dass offensichtlich ein Teil der Fluoreszenz des Nebenmaximums von PPIX um 700 nm auf diesen Detektor gelangt (vgl. Abb. 3.4).

Ein Vergleich beider Messsysteme am Beispiel einer aeroben Gärung von Backhefe ist in Abb. 4.93 dargestellt. Es wurde mit 1,5 g/L Vital-Gold Hefe von DHW angeimpft.

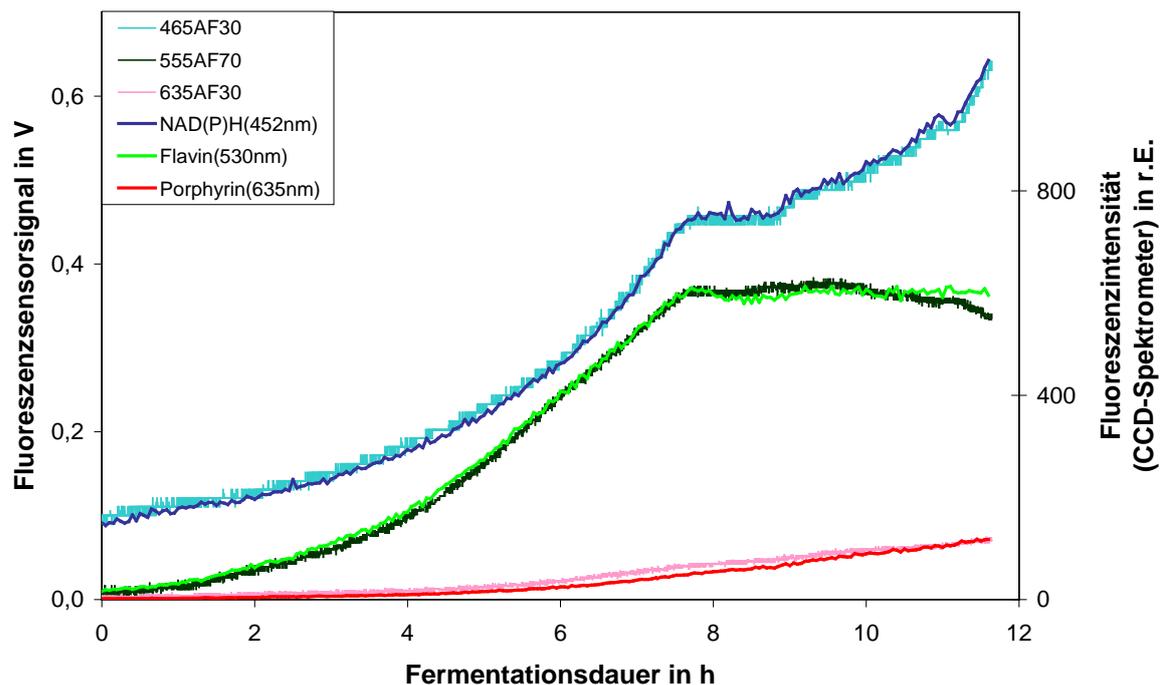


Abb. 4.93: Vergleich zwischen CCD-Spektrometernaufbau und Mehrkanal-Fluoreszenzsensor anhand der zeitlichen Verläufe von NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrin-Fluoreszenz während der Kultivierung von Backhefe (DHW Vital-Gold)

Auch bei einer geringeren Dynamik wie im Falle der aeroben Gärung von Uniform Backhefe mit 10 g/L Animpfdichte ist eine gute Übereinstimmung zwischen Mehrkanalsensor und dem Fluoreszenzmessaufbau mit CCD-Spektrometer zu erkennen (s. Abb. 4.94).

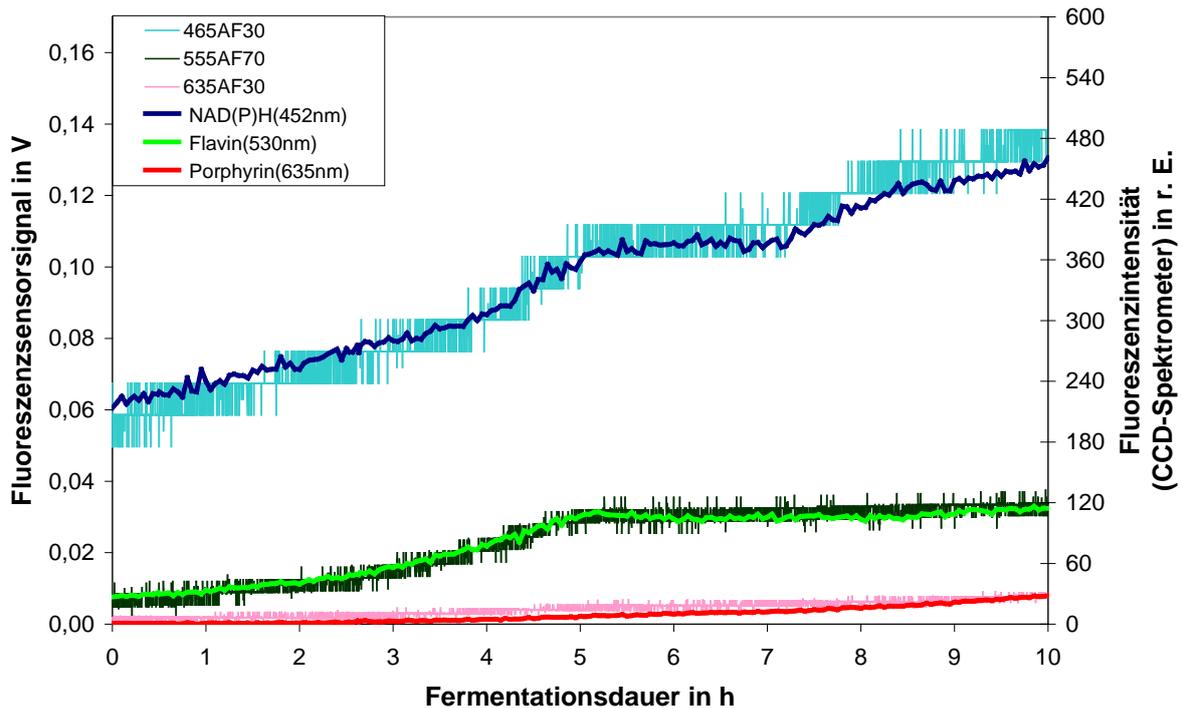


Abb. 4.94: Vergleich zwischen CCD-Spektrometernaufbau und Mehrkanal-Fluoreszenzsensor anhand der zeitlichen Verläufe von NAD(P)H-, Flavin- und Porphyrin-Fluoreszenz während der Kultivierung von Backhefe (Uniferm)

Die Diskrepanz des Porphyrinkanals (635AF30) zur Porphyrinfluoreszenz des CCD-Spektrometers in beiden dargestellten Fällen resultiert daraus, dass der Porphyrinkanal sowohl den Anteil der Porphyrinfluoreszenz bei 635 nm als auch bei 625 nm detektiert (s. Abb. 3.4), während in den Abbildungen der Kultivierungen (Abb. 4.93, Abb. 4.94) nur die bei 635 nm detektierte Fluoreszenzintensität des CCD-Spektrometers dargestellt ist. Dadurch weicht die Porphyrinfluoreszenzintensität des Mehrkanalsensors stellenweise zu höheren Werten hin ab. Würde der gleiche spektrale Bereich mit dem CCD-Spektrometer ausgewertet werden statt nur die Bandenhöhe bei 635 nm, so hätte dies den gleichen Effekt und beide Porphyrinfluoreszenz-Verläufe würden übereinstimmen.

Abgesehen davon sind die Verläufe beider Fluoreszenzmessaufbauten vergleichbar. Damit ist gezeigt, dass der Mehrkanalsensor zur online Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten bei Kultivierungen geeignet ist.

5 Diskussion

Mit dem hier vorgestellten Fluoreszenzmessaufbau ist es möglich, verschiedene in der Zelle enthaltene Fluorophore simultan bei 366 nm anzuregen und deren Fluoreszenzemissionen mittels CCD-Spektrometer zu detektieren. Dieser Aufbau verwendet eine Hochleistungs-UV-LED als Lichtquelle statt der bisher üblichen Xenon- oder Quecksilberlampen (Chance *et al.*, 1979; Li *et al.*, 1991; Skibsted *et al.*, 2001). Der Vorteil der UV-LED ist, dass aufgrund ihrer schmalbandigen Emission bei 366 nm keine optischen Filter benötigt werden und sie außerdem deutlich kostengünstiger und langlebiger ist als herkömmliche Lichtquellen. Dies trägt zur Miniaturisierung und Robustheit der Fluoreszenzmessaufbauten bei.

Des Weiteren wurde anstelle des CCD-Spektrometers ein ebenfalls an der Hochschule Mannheim entwickelter Sechskanalsensor verwendet (Georg, 2007). Erste Versuche mit dem Fluoreszenz-Mehrkanalsensor zeigen vielversprechende Ergebnisse, sodass dieser zur Prozessverfolgung anstelle des CCD-Spektrometers eingesetzt werden kann. Damit können die Kosten des Messsystems deutlich gesenkt werden. Ein wesentlicher Vorteil dieses Fluoreszenzmessaufbaus ist, dass das Fremdlicht (Tageslicht, Deckenbeleuchtung etc.) nicht mehr abgeschirmt werden muss. Das Prinzip der modulierten Fluoreszenzanregung und -detektion zur Fremdlichtunterdrückung ist zum Patent angemeldet (Beuermann *et al.*, 2006).

Beide Systeme können außerdem Fluoreszenzemissionen oberhalb von 600 nm detektieren, was mit den bisher zur Prozessverfolgung verwendeten Messsystemen nicht möglich ist (Li *et al.*, 1991; Marose *et al.*, 1998). Die in diesem Spektralbereich emittierenden Porphyrine tragen neben NAD(P)H und Flavinen zur Charakterisierung des physiologischen Zustandes der Zellen bei.

Ein Nachteil der UV-LED-basierten Fluoreszenzanregung bei 366 nm ist, dass keine Fluoreszenzemissionen unterhalb 400 nm detektiert werden können. Derzeit sind noch keine Hochleistungs-LEDs, die < 300 nm emittieren, verfügbar. So fluoreszieren z. B. Aminosäuren um 350 nm, deren Fluoreszenz von einigen Autoren in Zusammenhang mit der Zelldichte gebracht wird (Horvath *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1991; Marose *et al.*, 1998). Damit trotzdem eine online Verfolgung der Zelldichte durchgeführt werden kann, wurde von der Hochschule Mannheim ein kostengünstiger Streulichtmessaufbau mit einer NIR-LED als Lichtquelle entwickelt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei hohen Zelldichten von über $4 \cdot 10^9$ Zellen/mL ein linearer Zusammenhang zur gemessenen Streulichtintensität gegeben ist. Der Vorteil bei der Verwendung einer NIR-LED ist, dass es nicht zu Störungen mit der Fluoreszenzmessung kommt. So kann mit beiden Lichtquellen gleichzeitig online gearbeitet werden, ohne dass sich die optischen Messungen gegenseitig beeinflussen. Wenn allerdings abiotische Veränderungen, das heißt Abweichungen der Begasungsrate, Rührerdrehzahl,

Temperatur oder Antischaummittelzugabe auftreten, so ändert sich die Streulichtintensität und es kann zu diesem Zeitpunkt keine gesicherte Aussage über die Zelldichte getroffen werden. Die Ursache hierfür dürfte wohl in einer Änderung der Blasengröße bzw. der Blasenanzahl liegen, die neben der Rückstreuung der Zellen ebenfalls zum Streulichtsignal beitragen. Auch die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität wird durch Antischaummittelzugabe beeinflusst. Ähnliche Einflussfaktoren auf die Fluoreszenzmessung sind bei Li & Humphrey beschrieben (Li & Humphrey, 1992). Daher muss während der Fluoreszenzmessung darauf geachtet werden, dass abiotische Veränderungen zu vermeiden sind, damit die Aussagekraft bezüglich des physiologischen Zustandes erhalten bleibt.

Ein weiteres Problem bei der Fluoreszenzmessung stellt die Verwendung fluoreszierender Medien dar. Die Messungen mit dem entwickelten Fluoreszenzmessaufbau fanden zunächst produktionsnah in der Brauerei während der Gärung und Propagation in Bierwürze statt. Dabei zeigte sich, dass die Bierwürze eine ausgeprägte Autofluoreszenz besitzt, die es unmöglich macht, mit dem verwendeten Fluoreszenzmessaufbau die Fluorophorverläufe der Bierhefe aussagefähig zu ermitteln. Andere Autoren haben sich ebenfalls mit der Autofluoreszenz der Bierwürze beschäftigt. So fanden Apperson *et al.* heraus, dass weder durch die Fällung von Proteinen mittels Zugabe von Kieselgel und Tanninsäure noch Polyphenoladsorption durch PVPP das Fluoreszenzsignal vermindern (Apperson *et al.*, 2002). Dies bestätigt die hier vorgestellten Ergebnisse an Bierwürze. Als mögliche Verursacher der Autofluoreszenz von Bier nennen Apperson *et al.* Proteine, komplexe Polyphenole oder die iso- α -Säuren des Hopfens. Die vermessenen Hopfen zeigen bei Apperson *et al.* eine Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum um 440 nm. Ebenso zeigen Messungen an Tee, der wie Bier auch komplexe Polyphenole enthält, eine Autofluoreszenz in diesem Bereich. Im Gegensatz zu Apperson *et al.* gehen Christensen *et al.* bei ihren Untersuchungen zu Bitterstoffen im Bier davon aus, dass die iso- α -Säuren nicht wesentlich zur Fluoreszenz um 440 nm beitragen, da die Fluoreszenzintensitäten bei Bieren mit verschiedenen Bittereinheiten sich in diesem Bereich nicht wesentlich unterscheiden (Christensen *et al.*, 2005). Daher schlagen sie Polyphenole als Verursacher der Autofluoreszenz um 440 nm vor. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die iso- α -Säuren des Hopfens nur gering zur Würzefluoreszenz beitragen. Stattdessen wurde gefunden, dass der Großteil der Autofluoreszenz bereits durch die verwendete Gerste verursacht wird. Dies bestätigen auch Fluoreszenzmessungen an Gerstenkörnern von Courcoux *et al.* Sie zeigen, dass die Zellwände Substanzen wie Lignin und Polyphenole enthalten, die eine Autofluoreszenz aufweisen (Courcoux *et al.*, 2002). Das gesamte Perikarp bei Gerste fluoresziert bei Anregung mit 488 nm-Licht stark. Wird bei 364 nm angeregt, so fluoresziert zusätzlich die Aleuronschicht, bei der bekannt ist, dass die dort enthaltene Ferulasäure die Autofluoreszenz auslöst. Es gibt Hinweise, dass ebenfalls

Phenolsäuren für die Autofluoreszenz der Spelze ursächlich sein könnten. Courcoux *et al.* gehen davon aus, dass mindestens drei verschiedene Bestandteile in Getreidekörnern für deren Autofluoreszenz verantwortlich sind. Beim Weizen verhält es sich ähnlich. So zeigen Jensen *et al.*, dass sowohl Perikarp als auch die Aleuronschicht und zu einem geringeren Teil das Endosperm eine Autofluoreszenz im Bereich 400 - 500 nm (Anregung bei 350 nm) aufweisen, die typisch für Ferluasäure ist (Jensen *et al.*, 1982). Diese Beispiele belegen, dass mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Fluoreszenzmesssystem die Prozessverfolgung in einer Brauerei nicht möglich ist. Die gewonnenen Ergebnisse zur Charakterisierung des Stoffwechsels von Hefezellen beziehen sich daher auf Kultivierungen in fluoreszenzfreien Medien.

Zur Auswertung der Spektren wird mittels Multikomponentenanalyse eine bandenanalytische statt einer chemometrischen Methode herangezogen. Dies ist darin begründet, dass durch die Verwendung unterschiedlicher Matrices/Organismen sich die Lage der Fluoreszenzemissionsbanden ändert, und der Kalibrationsaufwand für eine chemometrische Bestimmung daher enorm wäre. Beispielsweise hat NADH in Phosphatpuffer bei pH 5,0 ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 467 nm, während es in Hefe ein Maximum bei 452 nm aufweist. Diese Verschiebung ist nicht nur auf unterschiedliche Matrices zurückzuführen, sondern wahrscheinlich auch durch Bindung des NADH (oder NADPH) an Enzyme zu erklären. Messungen an Rattenlebermitochondrien zeigen, dass NADH, wenn es an bestimmte Enzyme bindet, gegenüber NADH in Lösung ein kurzweilig verschobenes Fluoreszenzmaximum aufweist, das heißt bei ca. 450 nm statt ca. 470 nm (Chance & Baltscheffsky, 1958; Scholz *et al.*, 1969). Außerdem sind Teile des Spektrums durch das Auftreten unbekannter Fluorophore nicht auswertbar, z. B. der Fluorophor bei 420 nm während der *E. coli* Kultivierung. Mit der hier durchgeführten Multikomponentenanalyse werden relative Signalverläufe erhalten. Bei enger Prozessführung, das heißt ohne Änderung der Umgebungsbedingungen, wären multivariate Methoden vorteilhafter (Skibsted *et al.*, 2001). In dieser Arbeit liegt der Fokus jedoch auf einer breit angelegten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung des Zellstoffwechsels und nicht auf der Vorhersagbarkeit von Prozessgrößen. Für diese Anwendung ist die Multikomponentenanalyse ein geeignetes Mittel.

5.1 Charakterisierung des Zellmetabolismus bei Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden Kultivierungen unter verschiedenen Bedingungen mit Backhefe, Bierhefe und *E. coli* durchgeführt. Dabei wurde online die Fluoreszenz mittels eines miniaturisierten faseroptischen Messaufbaus gemessen, um anhand der Fluorophorverläufe den Stoffwechselzustand der Zellen charakterisieren zu können. Dabei stellten sich folgende Besonderheiten dar:

Die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität nimmt ab, sobald ein Substrat aufgebraucht ist. Dies ist vor allem bei Hefe zu beobachten, wenn die vorgelegte Saccharose oder das von ihr produzierte Ethanol verzehrt ist. Dieses Verhalten wird ebenfalls u. a. von Beyeler *et al.* beobachtet (Beyeler *et al.*, 1981). Im Gegensatz zu Zabriskie & Humphrey (Zabriskie & Humphrey, 1978) fanden sie heraus, dass die NADH-Fluoreszenz nicht nur mit der Biomassekonzentration zusammenhängt, sondern darüber hinaus auch mit metabolischen Größen wie der Substratkonzentration. Desgleichen berichten Horvath *et al.*, dass die NADH-Fluoreszenz nur dann gut mit der Biomassekonzentration korreliert, wenn die Umgebungsbedingungen wie Gelöstsauerstoff, pH-Wert und Temperatur gleich bleiben und die Kohlenstoffquelle im Überschuss vorliegt (Horvath *et al.*, 1993). Durch die Verfolgung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität kann auf die Stoffwechselaktivität der Zellen geschlossen werden, weil ein Rückgang keine weitere Metabolisierung der Kohlenstoffquelle anzeigt. Dieser Rückgang ist nicht zu beobachten, wenn die Hefe mehrere Zucker wie z. B. Glucose, Fructose und Maltose sequenziell nutzt.

Bei der Flavinfluoreszenzintensität ist zu beobachten, dass sie zu Beginn der Kultivierung ansteigt und ab einem gewissen Zeitpunkt nicht weiter zunimmt. Dieses konstante Fluoreszenzsignal könnte mit dem Redoxstatus der Zelle in Zusammenhang gebracht werden, da dieses Verhalten häufig bei Sauerstofflimitation beobachtet werden kann. Dennoch verharrt die Flavinfluoreszenzintensität, meist während des Ethanolabbaus, auf einem konstanten Niveau, auch wenn keine Sauerstofflimitation vorliegt. Dies könnte an der begrenzten Kapazität der Atmungskette liegen. Locher *et al.* beschreiben, dass mit zunehmender Ethanolkonzentration die respiratorische Kapazität abnimmt. Ist kein Ethanol mehr am Ende der Kultivierung vorhanden, so wird die Kapazität der Atmungskette wieder hergestellt (Locher *et al.*, 1993). Zu diesem Zeitpunkt steigt auch die Flavinfluoreszenz wieder an, da mehr Moleküle in der oxidierten Form vorliegen. Dies tritt während der aeroben Gärung und Atmung bei Backhefe auf.

Zu den Porphyrinmessungen während der Kultivierung gibt es - im Gegensatz zu biomedizinischen Anwendungen - nur wenige Aussagen in der Literatur, da die bisher eingesetzten Fluoreszenzmessaufbauten keine Fluoreszenz oberhalb von 600 nm detektieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Verbrauch der Glucose unter

aeroben Bedingungen die Porphyrinfluoreszenzintensität stärker ansteigt als vorher. Dies hängt wahrscheinlich mit der Repression von Genen, die für Bestandteile der Atmungskette kodieren, zusammen (Boumans *et al.*, 1998). Diese Repression wird durch die hohe Glucosekonzentration ausgelöst. Nach Derepression erfolgt die Zunahme der Porphyrinfluoreszenz, da Porphyrine als prosthetische Gruppen der Cytochrome Bestandteile der Atmungskette sind. Ein anderes Bild zeigt sich allerdings bei der Gärung von Bierhefe. Hier nimmt die Porphyrinfluoreszenzintensität bei 625 nm um das Zehnfache zu, noch mehr als während der Propagation, bei der die Intensität um das 1,5-fache zunimmt. Hefen, die anaerob kultiviert werden, akkumulieren Coproporphyrin (Charalampous, 1974). Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der Porphyrinfluoreszenz um 625 nm um Coproporphyrin handelt. Demzufolge fällt die Zunahme dieser Fluoreszenzintensität stärker aus als während der Propagation. Außerdem folgern Fraikin *et al.* aus Fluoreszenzmessungen, dass Hefezellen PPIX und Coproporphyrin enthalten. Des Weiteren zeigen sie, dass sich die Fluoreszenzspektren von an die Plasmamembran gebundenen Porphyrinen und denen in Mitochondrien unterscheiden (Fraikin *et al.*, 1996), wobei sich das PPIX in der Zelle vor allem in den Mitochondrien befindet und nur in geringem Maße in der Plasmamembran zu finden ist (Strakhovskaya *et al.*, 1999). Strakhovskaya *et al.* gehen davon aus, dass Hefe neben PPIX und Coproporphyrin auch Uroporphyrin bildet. Aufgrund der ähnlichen Lage der Fluoreszenzbanden von Uroporphyrin und Coproporphyrin können sie allerdings beide nicht unterscheiden. Des Weiteren detektieren sie eine Fluoreszenzemission um 580 - 590 nm, die auf Zn-Protoporphyrin zurückgeführt werden könnte. Das Zn-PP wird in den Mitochondrien enzymatisch aus PPIX und Zink mittels der Zn-Chelatase-Aktivität der Ferrochelatase synthetisiert (Strakhovskaya *et al.*, 1999).

Zn-PP wird von Hefe in den Mitochondrien akkumuliert, wenn Zinkionen im Medium vorhanden sind (Gilardi *et al.*, 1971). Dies ist bei den in dieser Arbeit verwendeten Medien der Fall. Bei allen Kultivierungen konnte eine gering ausgeprägte Fluoreszenzintensität im Bereich um 585 nm detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass besonders dann, wenn sich während der Kultivierung die Umgebungsbedingungen von anoxisch zu oxisch ändern, die Fluoreszenz des Zn-PP deutlich zutage tritt. Auch bei den Versuchen zur Lagerstabilität der Backhefe bei 50°C konnte eine ausgeprägte Zn-PP-Fluoreszenzemission festgestellt werden. Damit könnte das Zn-PP als Indikator für gealterte Backhefe dienen. Bisher mangelt es an geeigneten Prüfmethode, mit denen die Lagerstabilität der Hefe ermittelt werden kann (Fischer & Rahn, 2005).

Daneben wirken sich auch andere plötzliche Veränderungen der Umgebungsbedingungen auf die Fluorophorverläufe aus. In dieser Arbeit wurden neben Änderungen der Sauerstoff- oder Substratzufuhr ebenso Wechsel des pH-Wertes und der Temperatur untersucht.

Mehrere Autoren haben das Fluoreszenzverhalten von NAD(P)H und/oder Flavinen beim Wechsel oxisch-anoxisch während Hefekultivierungen untersucht (Horvath & Spangler, 1992; Marose *et al.*, 1998; Siano & Mutharasan, 1989). Sie zeigen, dass durch den Wechsel von Luft- zu Stickstoffzufuhr die NAD(P)H-Fluoreszenz ansteigt, während die Flavinfluoreszenz zurückgeht. Dies ist in den unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der Elektronencarrier begründet. Ist kein Sauerstoff vorhanden, so werden NAD(P)H und FMNH₂ bzw. FADH₂ nicht reoxidiert. Nach erneuter Zufuhr von Sauerstoff sinkt die NAD(P)H-Fluoreszenz, während die Flavinfluoreszenz zunimmt. In dieser Arbeit konnte der Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenz bei Stickstoffzufuhr und ebenfalls ein rascher Abfall der Fluoreszenzintensität nach erneuter Sauerstoffzufuhr beobachtet werden. Allerdings nahm die Flavinfluoreszenz während der Stickstoffbegasung nicht deutlich ab, sondern blieb auf einem konstanten Niveau. Dies steht im Einklang mit Siano & Mutharasan, bei denen das Flavinsignal, nachdem es in den ersten fünf Minuten nach Umstellung auf Stickstoffbegasung abnimmt, wieder auf den vorherigen Intensitätswert ansteigt (Siano & Mutharasan, 1989). Nachdem erneut während der Hefekultivierung auf Druckluftbegasung umgestellt wurde, erfolgte erwartungsgemäß ein Anstieg der Flavinfluoreszenz. Ebenso nahm die Porphyrinfluoreszenz zu diesem Zeitpunkt stark zu.

Bei erneuter Saccharosezufuhr während des Ethanolabbaus steigen sowohl NAD(P)H- als auch Flavinfluoreszenz stärker an. Die Verläufe ähneln denen während des ersten Saccharoseabbaus, außer dass die Flavinfluoreszenz direkt nach der zweiten Saccharosegabe noch etwas länger auf ihrem ursprünglichen Niveau verharrt. Siano & Mutharasan zeigen, dass nach Zufütterung geringer Glucosemengen die NAD(P)H-Fluoreszenz ansteigt, während die Flavinfluoreszenz kurzzeitig absinkt, um dann ebenfalls anzusteigen (Siano & Mutharasan, 1989). Auch Horvath *et al.* detektieren einen Anstieg der NADH-Fluoreszenzintensität unmittelbar nach Glucosegabe (Horvath *et al.*, 1993).

Plötzliche Änderungen des pH-Wertes während der Kultivierung führen zu Abweichungen im Fluoreszenzverlauf. Insbesondere die Porphyrinfluoreszenz spricht stark auf Wechsel des pH-Wertes an. Bei einer Senkung des pH-Wertes steigen die Fluoreszenzintensitäten bei 625 und 635 nm, während bei einer pH-Wert-Erhöhung eine Zunahme der Porphyrinfluoreszenz um 612 nm zu beobachten ist. Als Ursache hierfür ist zu sehen, dass sich infolge der pH-Wert-Erhöhung die Spektrenform derart verschiebt, dass anstelle des Emissionsmaximums zwischen 625 und 635 nm ein neues Maximum um 616 nm entsteht. Geringe Veränderungen im Fluoreszenzverlauf sind bei der NAD(P)H- sowie der Flavinfluoreszenzintensität zu beobachten. Eine Senkung des pH-Wertes führt zur Zunahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität, während bei einigen Kultivierungen eine Erhöhung des pH-Wertes die Zunahme der Flavinfluoreszenzintensität verursacht.

Wird während der Kultivierung die Temperatur geändert, so kann beobachtet werden, dass eine Temperaturerhöhung zu einem kurzzeitigen Abfall der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität sowie zu einem Anstieg der Flavinfluoreszenzintensität führt. Außerdem kann bei einigen Hefen eine Zunahme der Porphyrinfluoreszenz beobachtet werden. Bei Senkung der Temperatur kehren sich die Verläufe stellenweise um. So erfolgen ein kurzzeitiger Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenz bzw. teilweise ein Rückgang der Porphyrinfluoreszenz.

Ähnlich wie beim pH-Wert muss auch bei Temperaturänderung berücksichtigt werden, dass dadurch Lage und Intensität der Fluoreszenzemissionsbanden beeinflusst werden können. Li & Humphrey beschreiben, wodurch eine Änderung der Fluoreszenzsignale nach einer Verschiebung des pH-Werts während einer Kultivierung hervorgerufen wird. Es kann an der Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Fluorophore liegen, oder die pH-Wert-Abweichung führt zu einem veränderten Stoffwechselzustand der Zellen, was wiederum zu einer Konzentrationsänderung der Fluorophore führen kann (Li & Humphrey, 1992). Somit ist es wichtig, unterscheiden zu können, ob die Abweichungen im Fluoreszenzverlauf während der Kultivierung durch modifizierte Fluoreszenzeigenschaften – hervorgerufen durch die Matrix - oder durch den veränderten physiologischen Zustand der Zellen ausgelöst werden.

Dies wirft die Frage auf, ob die gemessenen Fluorophore sich innerhalb oder außerhalb der Zellen befinden. Li *et al.* ist es nicht bekannt, ob das Kulturfluoreszenzsignal den intrazellulären oder extrazellulären Fluorophoren entstammt, oder sich aus beiden zusammensetzt, insbesondere, wenn das Medium (vgl. Bierwürze) schon Fluorophore enthält (Li *et al.*, 1991). Untersuchungen von Zabriskie & Humphrey an Batch-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass ca. 50 % der von ihnen gemessenen NADH-Fluoreszenz intrazellulären Ursprungs ist (Zabriskie & Humphrey, 1978). Pretlow & Sherman beschreiben, dass bei anaeroben Hefekultivierungen die intrazelluläre Fluoreszenz vor allem durch Protoporphyrin IX bestimmt wird, während im Überstand vorwiegend Coproporphyrin vorliegt (Pretlow & Sherman, 1967). Dies spricht ebenfalls dafür, dass die starke Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 625 nm, die während der Bierhefe-Gärung beobachtet wurde, durch Coproporphyrin verursacht wurde. Auch in dieser Arbeit wurden Messungen bei Hefekultivierungen durchgeführt, um die intra- und extrazelluläre Verteilung der beobachteten Fluorophore einschätzen zu können. Dabei zeigt sich, dass ca. 50-60 % der Flavinfluoreszenzintensität bereits wenige Stunden nach Fermentationsbeginn im Überstand gemessen wird, während NAD(P)H und Porphyrine zu diesem Zeitpunkt weitgehend intrazellulär vorhanden sind; das heißt, dass 60-70 % bzw. etwa 90 % der Fluoreszenzintensität im Zellpellet detektiert wird. Am Ende der Kultivierungen werden ca. 60–80 % der Flavin-, 30-50 % der NAD(P)H- und 10-30 % der Porphyrinfluoreszenzintensität im Überstand gemessen. Bei den Messungen wurde eine Anpassung aufgrund der unterschiedlichen Eindringtiefe des Fluoreszenzlichtes in Überstand und Suspension bzw.

resuspendiertem Zellpellet zwar berücksichtigt, trotzdem können diese Werte noch Abweichungen erfahren. Dieses Thema ist bisher bezüglich Bioprozesskontrolle durch Fluoreszenzmessung noch nicht ausreichend behandelt worden. Da jedoch die Fluorophorverläufe weitgehend mit den Daten anderer Autoren vergleichbar und auch meist durch den metabolischen Zustand erklärbar sind, kann angenommen werden, dass ein für die Bioprozesskontrolle ausreichendes Maß an intrazellulärer Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Die Untersuchungen an verschiedenen Back- und Bierhefen zeigen, dass die Konzentrationsverhältnisse der Fluorophore untereinander durchaus abweichen können. Dies gilt insbesondere, wenn verschiedene Mikroorganismen verglichen werden. So zeigt die Kultivierung von *E. coli*, dass wesentlich mehr Flavin als bei Hefekultivierungen gebildet wird. Dennoch sind einige Abschnitte in den Fluoreszenzverläufen mit Hefe vergleichbar. Auch bei *E. coli* nimmt bei Substratmangel die NAD(P)H-Fluoreszenz ab und der Verlauf der Porphyrinfluoreszenz scheint auf eine ähnliche Repression der Atmungskette durch Glucose hinzudeuten. Tatsächlich entspricht die Bildung des Acetats unter aeroben Bedingungen bei *E. coli* der Ethanolbildung bei Hefe während des Glucoseabbaus bei aerober Gärung (Majewski & Domach, 1990). Demzufolge gehen Majewski & Domach davon aus, dass sowohl Acetatbildung bei *E. coli* als auch die Ethanolproduktion bei *S. cerevisiae* ähnlichen regulatorischen Prozessen unterliegen.

Ein Anwendungsgebiet der Fluoreszenzspektroskopie bei *E. coli* Kultivierungen könnte die pharmazeutische Industrie sein. Auch dort ist eine online Charakterisierung des Zellstoffwechsels vorteilhaft, da hiermit z. B. der richtige Erntemoment oder der Zeitpunkt zur optimalen Induktion der Zielproduktsynthese ermittelt werden kann. Dadurch können in teils erheblichem Maße Zeit und Kosten gespart werden. Es sind bereits Fluoreszenzmessungen bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit GFP als Reporter gen durchgeführt worden (Reischer *et al.*, 2004).

5.2 Biomedizinische Anwendungen

Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie sind nichtinvasive Methoden, die zur Erkennung und Behandlung von Krebs und Krebsvorstufen verwendet werden. Mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Messaufbau werden nicht nur alle vom Dermatologen vorher als keratös eingestuftene Areale identifiziert, sondern auch für den Arzt bisher nicht erkannte befallene Hautstellen detektiert. Des Weiteren lassen sich sogar bereits einmal behandelte Stellen deutlich von gesunden Arealen abgrenzen. Gleichzeitig ist damit ein erster Behandlungserfolg in Form von niedriger ausgeprägter PPIX-Fluoreszenzintensität erkennbar.

Die erhaltenen Daten lassen darauf schließen, dass das Maximum der PPIX-Konzentration im zu behandelnden keratösen Gewebe nach drei Stunden Einwirkzeit noch nicht erreicht sein dürfte. Der Metvix[®]-Hersteller Photocure empfiehlt, zu diesem Zeitpunkt mit der Photodynamischen Therapie zu beginnen. Ackermann *et al.* empfehlen nach topischer Applikation einer 20%igen 5-ALA-Creme eine Einwirkdauer von 3-4 h bei der Diagnostik von Basalzellkarzinomen. Ein Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten zeigt, dass die Fluoreszenzintensität, nachdem sie nach 4 h ihr Maximum erreicht hat, nicht weiter ansteigt. Bereits nach 3 h ist der Kontrast zwischen gesundem und neoplastischen Gewebe zur Durchführung der Fluoreszenzdiagnostik ausreichend (Ackermann *et al.*, 2000). Für Aktinische Keratose werden Inkubationszeiten zwischen drei und acht Stunden nach topischer Applikation einer 20%igen 5-ALA-Creme genannt (Fritsch *et al.*, 1998). Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass bei Verwendung einer 10%igen methyl-ALA Creme ein optimales PPIX-Fluoreszenzsignal nach 2-4 h erreicht wird (Juzeniene *et al.*, 2002). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, obwohl das Maximum der PPIX-Anreicherung wahrscheinlich nach drei Stunden noch nicht erreicht ist, zu diesem Zeitpunkt ein für die Fluoreszenzdiagnostik ausreichend großes Fluoreszenzsignal vorhanden ist. Daher kann dennoch von einem Behandlungserfolg ausgegangen werden.

Während der Photodynamischen Therapie bei Aktinischer Keratose zeigt sich, dass bereits nach ein bis zwei Minuten Bestrahlungsdauer die PPIX-Fluoreszenzintensität *in vivo* nur noch ca. 10 % beträgt. Bei Juzenas *et al.* sind im Mausmodell mit 5-ALA zu diesem Zeitpunkt noch 50 % der PPIX-Fluoreszenzintensität vorhanden (Juzenas *et al.*, 2001). Ebenfalls eine ähnliche Kinetik zeigen *in vitro* Messungen von Moan *et al.* (Moan *et al.*, 1997). In Übereinstimmung mit der Literatur (Bagdonas *et al.*, 2000; Juzenas *et al.*, 2001; Klinteberg *et al.*, 1999) kann zusätzlich zur PPIX-Fluoreszenz auch die Fluoreszenz eines Photoproduktes mit einem Emissionsmaximum zwischen 670 und 675 nm detektiert werden. Dieses Photoprodukt ist sehr wahrscheinlich Photoporphyrin und entsteht während der PDT aus PPIX. Bei der Behandlung der Aktinischen Keratose bildet es sich nach einer

Bestrahlungsdauer von ca. 90 s deutlich erkennbar aus und ist nach wenigen Minuten ebenso wie das PPIX nahezu vollständig abgebaut. Klinteberg *et al.* beziffern den Anteil der Photoporphyrin-Fluoreszenzintensität direkt nach der PDT auf etwa 2 % der vor der PDT vorhandenen PPIX-Fluoreszenzintensität (Klinteberg *et al.*, 1999).

Die Fluoreszenzmessungen an Patienten mit Aktinischer Keratose sowie an humanen Glioblastomen im Mausmodell lassen erkennen, dass der verwendete Aufbau sowohl zur Fluoreszenzdiagnostik als auch zur Erfolgskontrolle während der Photodynamischen Therapie geeignet ist. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass für Aktinische Keratose und Glioblastomzellen die intrinsische Porphyrinfluoreszenz (Autofluoreszenz) nicht ausreicht, um Tumorgewebe von gesundem Gewebe zu unterscheiden. Jedoch ist dies nach Zugabe eines Präkursors der Protoporphyrinsynthese (methyl-ALA bzw. butyl-ALA) zweifelsfrei möglich.

6 Zusammenfassung

Bisher mangelt es an prozesstauglichen Technologien, mit denen sich der Stoffwechselzustand von Zellen in Echtzeit bestimmen lässt. Eine hierfür geeignete Methode ist die Fluoreszenzspektroskopie. In dieser Arbeit wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie während Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* die Fluoreszenzintensitäten von NAD(P)H, Flavinen und Porphyrinen online bestimmt. Dafür wurde ein miniaturisierter faseroptischer Aufbau verwendet, der an der Hochschule Mannheim in Zusammenarbeit mit der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin entwickelt wurde. Eine Einschränkung von Fluoreszenzmessungen ist, dass sie nur dann zur online Bioprozesskontrolle einsetzbar sind, wenn die Matrix nicht oder nur in geringem Maße fluoresziert.

Da sich je nach Stoffwechselstatus die Fluorophor-Zusammensetzung in der Zelle ändert, ist es anhand von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit möglich, Rückschlüsse auf den momentanen metabolischen Zustand der Zelle zu ziehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der NAD(P)H-Fluoreszenzverlauf unmittelbar die Stoffwechselaktivität der Zelle widerspiegelt. So signalisiert eine Abnahme des NAD(P)H-Fluoreszenzsignals, dass kein Substrat mehr im Medium vorhanden ist bzw. eine Stoffwechselumstellung aufgrund des Wechsels von einer Kohlenstoffquelle zur nächsten erfolgt. Der zeitliche Verlauf der Flavinfluoreszenz lässt wahrscheinlich Rückschlüsse zu, ob die Zelle mit genügend Sauerstoff versorgt wird bzw. ob die Kapazität der Atmungskette erschöpft ist. Herrscht z. B. Sauerstofflimitation erfolgt kein weiterer Anstieg der Flavinfluoreszenz, da nur die oxidierten Flavine fluoreszieren. Weiterhin könnte der Verlauf der Porphyrinfluoreszenz mit der Katabolitrepression der Glucose korrespondieren. Erst nach Ende der Repression nimmt die Porphyrinfluoreszenz erkennbar zu. Außerdem erfolgen bei wechselnden Umgebungsbedingungen wie pH-Wert- oder Temperaturänderungen deutliche Veränderungen im Verlauf der Porphyrinfluoreszenz. Ergänzend kann angemerkt werden, dass sich bei *S. cerevisiae* die Porphyrinfluoreszenz aus mehreren Porphyrinen, sehr wahrscheinlich Protoporphyrin IX, Uroporphyrin und Coproporphyrin sowie Zn-Protoporphyrin zusammensetzt, die mit dem verwendeten Aufbau detektiert werden können.

Außerdem zeigten Untersuchungen an verschiedenen Back- und Bierhefen, dass die Konzentrationsverhältnisse der Fluorophore untereinander durchaus abweichen können. Dies gilt insbesondere, wenn unterschiedliche Mikroorganismen (*S. cerevisiae* und *E. coli*) verglichen werden.

Des Weiteren wurde der Fluoreszenzmessaufbau auch bei biomedizinischen Anwendungen wie Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamischer Therapie eingesetzt. Messungen bei Patienten mit Aktinischer Keratose sowie an humanen Glioblastomzellen im Mausmodell zeigten, dass der verwendete Aufbau auch für diese Anwendungen geeignet ist.

Zusätzlich lassen erste Ergebnisse mit einem an der Hochschule Mannheim entwickelten Fluoreszenz-Mehrkanalsensor erkennen, dass auch dieser zur Prozessverfolgung anstelle des teureren CCD-Spektrometers verwendet werden kann. Neben der Kostenreduktion besitzt dieser Aufbau den Vorteil, unempfindlich für Fremdlicht zu sein. Damit ist ein weiterer Schritt Richtung Anwenderfreundlichkeit getan.

7 Quellenverzeichnis

- Ackermann, G., Abels, C., Karrer, S., Bäuml, W., Landthaler, M., & Szeimies, R.M. (2000). Fluoreszenzgestützte Biopsie von Basalzellkarzinomen. *Der Hautarzt*, 51(12), 920-924.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J.D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle* (3 ed.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Annemüller, G., Manger, H.J., & Lietz, P. (2008). *Die Hefe in der Brauerei* (2 ed.). Berlin: VLB Berlin.
- Apperson, K., Leiper, K.A., McKeown, I.P., & Birch, D.J.S. (2002). Beer Fluorescence and the Isolation, Characterisation and Silica Adsorption of Haze-Active Beer Proteins. *J. Inst. Brew.*, 108(2), 193-199.
- Back, W. (2005). *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl.
- Bagdonas, S., Ma, L.-W., Iani, V., Rotomskis, R., Juzenas, P., & Moan, J. (2000). Phototransformations of 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX *in vitro*: A Spectroscopic Study. *Photochemistry and Photobiology*, 72(2), 186-192.
- Baumgartner, R., Huber, R.M., Schulz, H., Stepp, H., Rick, K., Gamarra, F., et al. (1996). Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36(2), 169-174.
- Beuermann, T., Raedle, M., Elzenhans, F., Heller, C., Maldonado, L., & Pruss, K. (2006). Fiber optical fluorescence sensor system (Vol. PCT/EP2006/012303).
- Beyeler, W., Einsele, A., & Fiechter, A. (1981). On-line measurements of culture fluorescence: Method and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 10-14.
- Boehl, D., Solle, D., Hitzmann, B., & Scheper, T. (2003). Chemometric modelling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess characterization. *J Biotechnol*, 105(1-2), 179-188.
- Borisov, S.M., & Wolfbeis, O.S. (2008). Optical Biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 423-461.
- Boumans, H., Grivell, L.A., & Berden, J.A. (1998). The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem*, 273(9), 4872-4877.
- Brakel, M. (2006). *Online-Fluoreszenzspektroskopie mit Multikomponentenanalyse und insitu-Mikroskopie zur Bioprozesskontrolle*. Diplomarbeit, Hochschule Mannheim.
- Bundesamt, S. (2009). *Produzierendes Gewerbe Fachserie 4, Reihe 3.1*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
- Chance, B., & Baltscheffsky, H. (1958). Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. *J Biol Chem*, 233, 736-739.
- Chance, B., Estabrook, R.W., & Ghosh, A. (1964). Damped Sinusoidal Oscillations of Cytoplasmic Reduced Pyridine Nucleotide in Yeast Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(6), 1244-1251.
- Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F., & Nakase, Y. (1979). Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem*, 254(11), 4764-4771.

- Charalampous, F.C. (1974). Coproporphyrin III, Inhibitor of the Synthesis of Cytochrome Oxidase in Anaerobic Yeast Protoplasts. *J. Biol. Chem.*, 249(4), 1014-1021.
- Christensen, J., Ladefoged, A.M., & Norgaard, L. (2005). Rapid Determination of Bitterness in Beer Using Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics. *J. Inst. Brew.*, 111(1), 3-10.
- Clementschtisch, F., & Bayer, K. (2006). Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. *Microb Cell Fact*, 5, 19.
- Clementschtisch, F., Kern, J., Pötschacher, F., & Bayer, K. (2005). Sensor combination and chemometric modelling for improved process monitoring in recombinant *E. coli* fed-batch cultivations. *J Biotechnol*, 120(2), 183-196.
- Courcoux, P., Devaux, M.-F., & Bouchet, B. (2002). Simultaneous decomposition of multivariate images using three-way data analysis: Application to the comparison of cereal grains by confocal laser scanning microscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 62(2), 103-113.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M.L.A., Daran, J.-M., van Gulik, W., de Winde, J.H., & Pronk, J.T. (2004). Role of Transcriptional Regulation in Controlling Fluxes in Central Carbon Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: A Chemostat Culture Study. *J. Biol. Chem.*, 279(10), 9125-9138.
- DeLisa, M.P., Li, J., Rao, G., Weigand, W.A., & Bentley, W.E. (1999). Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1), 54-64.
- DeRisi, J.L., & Iyer, V.R. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. (Cover story). *Science*, 278(5338), 680.
- Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D., & Jain, R.K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 380-387.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., et al. (1998). Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(12), 889-905.
- Dragieva, G., Schärer, L., Dummer, R., & Kempf, W. (2004). Photodynamic Therapy - a New Treatment Option for Epithelial Malignancies of the Skin. *Onkologie*, 27(4), 407-411.
- Dünnebier, G., & Tups, H. (2007). FDA PAT Initiative - Eine Anwendersicht zu technischen Möglichkeiten und aktueller industrieller Umsetzung. *Chemie Ingenieur Technik*, 79(12), 2019-2028.
- Duysens, L.N., & Ames, J. (1957). Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. *Biochim Biophys Acta*, 24(1), 19-26.
- Ferreira, A.P., Alves, T.P., & Menezes, J.C. (2005). Monitoring complex media fermentations with near-infrared spectroscopy: Comparison of different variable selection methods. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(4), 474-481.
- Fischer, K., & Rahn, J. (2005). Rohstoff- und verfahrensintegrierte Beurteilung der Haltbarkeit und Lagerstabilität von Backhefe (No. 1). Berlin: Versuchsanstalt der Hefeindustrie.
- Fraikin, G., Strakhovskaya, M.G., & Rubin, A.B. (1996). The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *J Photochem Photobiol B*, 34(2-3), 129-135.
- Fritsch, C., Becker-Wegerich, P.M., Menke, H., Ruzicka, T., Goerz, G., & Olbrisch, R.R. (1997). Successful Surgery of Multiple Recurrent Basal Cell Carcinomas Guided by Photodynamic Diagnosis. *Aesthetic Plastic Surgery*, 21(6), 437-439.

- Fritsch, C., Lang, K., Neuse, W., Ruzicka, T., & Lehmann, P. (1998). Photodynamic Diagnosis and Therapy in Dermatology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 11(6), 358-373.
- Fritsche, W. (2002). *Mikrobiologie* (3 ed.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Galland, P., & Senger, H. (1988). New trends in photobiology the role of flavins as photoreceptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1(3), 277-294.
- Georg, D. (2007). Entwicklung eines Mehrkanal-Fluoreszenzensors mit Fremdlichtunterdrueckung. Diplomarbeit, Hochschule Mannheim.
- Gilardi, A., Djavadi-Ohanian, L., Labbe, P., & Chaix, P. (1971). Effect of Zn-protoporphyrin accumulation in yeast cells on synthesis and activity of their respiratory system. *Biochim Biophys Acta*, 234(3), 446-457.
- Harms, P., Kostov, Y., & Rao, G. (2002). Bioprocess Monitoring. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 124-127.
- Harrison, D.E.F., & Chance, B. (1970). Fluorometric Technique for Monitoring Changes in the Level of Reduced Nicotinamide Nucleotides in Continuous Cultures of Microorganisms. *Applied Microbiology*, 19(3), 446-450.
- Hisiger, S., & Jolicoeur, M. (2005). A multiwavelength fluorescence probe: Is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *Journal of Biotechnology*, 117(4), 325-336.
- Horvath, J.J., Glazier, S.A., & Spangler, C.J. (1993). In situ fluorescence cell mass measurements of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular tryptophan. *Biotechnol. Prog.*, 9(6), 666-670.
- Horvath, J.J., & Spangler, C.J. (1992). In Situ On-line Optical Fiber Sensor for Fluorescence Monitoring in Bioreactors. In P. Todd, S.K. Sikdar, & M. Bier (Eds.), *Frontiers in Bioprocessing II* (pp. 99-109). Washington: American Chemical Society.
- Huebner, A., & Klug, K.I. (2005). Verfolgung der Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* mittels Online-Fluoreszenzspektroskopie und In-Situ-Mikroskopie. Studienarbeit, Hochschule Mannheim.
- Humphrey, A.E., Brown, K., Horvath, J.J., & Semerjian, H. (1989). The Use of Fluorometry in Monitoring and Control of Cell Cultures. In A. Fiechter, H. Okada, & R.D. Tanner (Eds.), *Bioproducts and Bioprocesses* (pp. 309-320). Berlin: Springer-Verlag.
- Janelt, G., Gerbsch, N., & Buchholz, R. (2000). A novel fiber optic probe for on-line monitoring of biomass concentrations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 22(3), 275-279.
- Jarute, G., Kainz, A., Schroll, G., Baena, J.R., & Lendl, B. (2004). On-Line Determination of the Intracellular Poly(β -hydroxybutyric acid) Content in Transformed *Escherichia coli* and Glucose during PHB Production Using Stopped-Flow Attenuated Total Reflection FT-IR Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(21), 6353-6358.
- Jensen, S.A., Munck, L., & Martens, H. (1982). The Botanical Constituents of Wheat and Wheat Milling Fractions. I. Quantification by Autofluorescence. *Cereal Chemistry*, 59(6), 477-484.
- Juzenas, P., Iani, V., Bagdonas, S., Rotomskis, R., & Moan, J. (2001). Fluorescence spectroscopy of normal mouse skin exposed to 5-aminolaevulinic acid and red light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 61(1-2), 78-86.
- Juzenas, P., Sharfaei, S., Moan, J., & Bissonnette, R. (2002). Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical

- application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 67(1), 11-17.
- Juzeniene, A., Juzenas, P., Iani, V., & Moan, J. (2002). Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid and its Methyl ester, Hexylester and Octylester Derivatives: Considerations for Dosimetry in Mouse Skin Model. *Photochemistry and Photobiology*, 76(3), 329-334.
- Kennedy, J.C., & Pottier, R.H. (1992). New trends in photobiology : Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14(4), 275-292.
- Kleber, H.P., & Schlee, D. (1991). *Biochemie* (2 ed.). Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Klinterberg, C.a., Enejder, A.M.K., Wang, I., Andersson-Engels, S., Svanberg, S., & Svanberg, K. (1999). Kinetic fluorescence studies of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in basal cell carcinomas. *J Photochem Photobiol B*, 49, 120-128.
- Koenig, K., & Schneckenburger, H. (1994). Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *Journal of Fluorescence*, 4(1), 17-40.
- Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuchel, R., Stepp, H., Hofstadter, F., & Hofstetter, A. (1996). Detection of Early Bladder Cancer by 5-Aminolevulinic Acid Induced Porphyrin Fluorescence. *The Journal of Urology*, 155(1), 105-110.
- Kunze, W. (2007). *Technologie Brauer & Mälzer* (9 ed.). Berlin: VLB Berlin.
- Lehmann, P. (2007). Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*, 156(5), 793-801.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). New York: W.H. Freeman.
- 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(1), 21-27.
- Li, J.K., & Humphrey, A.E. (1992). Factors affecting culture fluorescence when monitoring bioreactors. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(2), 104-111.
- Lim, M., Ye, H., Panoskaltsis, N., Drakakis, E.M., Yue, X., Cass, A.E., et al. (2007). Intelligent bioprocessing for haematopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments. *Biotechnol Adv*, 25(4), 353-368.
- Lischke, H.H., Brandes, L., Wu, X., & Schügerl, K. (1993). Influence of acetate on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM103 and product formation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 9(4), 155-157.
- Locher, G., Hahnemann, U., Sonnleitner, B., & Fiechter, A. (1993). Automatic bioprocess control. 4. A prototype batch of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 29(1-2), 57-74.
- Lohmann, W., Mumann, J., Lohmann, C., & Künzel, W. (1989). Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 31(3), 249-253.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., & Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms* (10 ed.). Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.
- Majewski, R.A., & Domach, M.M. (1990). Simple Constrained-Optimization View of Acetate Overflow in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 732-738.

- Marose, S., Lindemann, C., & Scheper, T. (1998). Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnol Prog*, 14(1), 63-74.
- Mazarevica, G., Diewok, J., Baena, J.R., Rosenberg, E., & Lendl, B. (2004). On-Line Fermentation Monitoring by Mid-infrared Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 58(7), 804-810.
- Michal, G. (1999). *Biochemical Pathways*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Moan, J., Peng, Q., Sorensen, R., Iani, V., & Nesland, J.M. (1998). The Biophysical Foundations of Photodynamic Therapy. *Endoscopy*, 30, 387-391.
- Moan, J., Streckyte, G., Bagdonas, S., Bech, Ø., & Berg, K. (1997). Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *International Journal of Cancer*, 70(1), 90-97.
- Moesta, K.T., Ebert, B., Handke, T., Nolte, D., Nowak, C., Haensch, W.E., et al. (2001). Protoporphyrin IX Occurs Naturally in Colorectal Cancers and Their Metastases. *Cancer Res*, 61(3), 991-999.
- Narziss, L. (2005). *Abriss der Bierbrauerei* (7 ed.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Nilsson, A., Norbeck, J., Oelz, R., Blomberg, A., & Gustafsson, L. (2001). Fermentative capacity after cold storage of baker's yeast is dependent on the initial physiological state but not correlated to the levels of glycolytic enzymes. *Int J of Food Microbiol*, 71(2-3), 111-124.
- Oppel, T., & Korting, H.C. (2004). Actinic Keratosis: The Key Event in the Evolution from Photoaged Skin to Squamous Cell Carcinoma. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(2), 67-76.
- Otto, M. (2000). *Analytische Chemie* (2 ed.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Pariser, D.M., Lowe, N.J., Stewart, D.M., Jarratt, M.T., Lucky, A.W., Pariser, R.J., et al. (2003). Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol*, 48(2), 227-232.
- Podrazký, O., Kuncová, G., Krasowska, A., & Sigler, K. (2003). Monitoring the growth and stress responses of yeast cells by two-dimensional fluorescence spectroscopy: First results. *Folia Microbiologica*, 48(2), 189-192.
- Pretlow, T.P., & Sherman, F. (1967). Porphyrins and zinc porphyrins in normal and mutant strains of yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 148(3), 629-644.
- Ramanujam, N. (2000). Fluorescence Spectroscopy In Vivo. In R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (Vol. 15, pp. 20-56). Chichester: John Wiley & Sons.
- Rehm, H.-J. (1980). *Industrielle Mikrobiologie* (2 ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Reischer, H., Schotola, I., Striedner, G., Pötschacher, F., & Bayer, K. (2004). Evaluation of the GFP signal and its aptitude for novel on-line monitoring strategies of recombinant fermentation processes. *Journal of Biotechnology*, 108(2), 115-125.
- Richards-Kortum, R., & Sevick-Muraca, E. (1996). Quantitative Optical Spectroscopy for Tissue Diagnosis. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47(1), 555-606.
- Riesenberger, D. (1991). High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(3), 380-384.
- Schatzmann, H. (1975). *Anaerobes Wachstum von Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, ETH Zürich.

- Schenk, J., Marison, I.W., & von Stockar, U. (2007). Simplified Fourier-transform mid-infrared spectroscopy calibration based on a spectra library for the on-line monitoring of bioprocesses. *Analytica Chimica Acta*, 591(1), 132-140.
- Scheper, T., Lorenz, T.H., Schmidt, W., & Schügerl, K. (1987). On-Line Measurement of Culture Fluorescence for Process Monitoring and Control of Biotechnological Processes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506(Biochemical Engineering V), 431-445.
- Scheper, T., & Schügerl, K. (1986). Characterization of bioreactors by in-situ fluorometry. *Journal of Biotechnology*, 3(4), 221-229.
- Schmidt, W. (2005). *Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences*. Weinheim: Wiley-VCH
- Scholz, R., Thurman, R.G., Williamson, J.R., Chance, B., & Bücher, T. (1969). Flavin and Pyridine Nucleotide Oxidation-Reduction Changes in Perfused Rat Liver. *J Biol Chem*, 244(9), 2317-2324.
- Schügerl, K. (1997). *Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen*. Basel: Birkhäuser Verlag AG.
- Schulman, S.G. (1985). Luminescence Spectroscopy: An Overview. In S.G. Schulman (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy Methods and Applications Part 1* (Vol. 77, pp. 1-28). New York: John Wiley & Sons.
- Siano, S.A., & Mutharasan, R. (1989). NADH and flavin fluorescence responses of starved yeast cultures to substrate additions. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(5), 660-670.
- Sivakesava, S., Irudayaraj, J., & Demirci, A. (2001). Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 185-190.
- Skibsted, E., Lindemann, C., Roca, C., & Olsson, L. (2001). On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration. *J Biotechnol*, 88(1), 47-57.
- Stärk, E., Hitzmann, B., Schügerl, K., Scheper, T., Fuchs, C., Köster, D., et al. (2002). In-Situ-Fluorescence-Probes: A Useful Tool for Non-invasive Bioprocess Monitoring. In *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science* (pp. 21-38).
- Stich, W. (1950). Eine neue Funktion des Lactoflavins. Steuerung des biologischen Dualismus der Porphyrine und Katalyse der Hämsynthese. *Naturwissenschaften*, 37(9), 212-213.
- Strakhovskaya, M.G., Shumarina, A.O., Fraikin, G.Y., & Rubin, A.B. (1999). Endogenous porphyrin accumulation and photosensitization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 2,2'-dipyridyl. *J Photochem Photobiol B*, 49, 18-22.
- Tahkonieni, H., Helmja, K., Menert, A., & Kaljurand, M. (2006). Fermentation reactor coupled with capillary electrophoresis for on-line bioprocess monitoring. *J Pharm Biomed Anal*, 41(5), 1585-1591.
- Tartakovsky, B., Sheintuch, M., Hilmer, J.M., & Scheper, T. (1996). Application of Scanning Fluorometry for Monitoring of a Fermentation Process. *Biotechnology Progress*, 12(1), 126-131.
- Van Hoek, P., Van Dijken, J.P., & Pronk, J.T. (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl Environ Microbiol*, 64(11), 4226-4233.
- Vojinovic, V., Cabral, J.M.S., & Fonseca, L.P. (2006). Real-time bioprocess monitoring: Part I: In situ sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 1083-1091.

- Wagnieres, G.A., Star, W.M., & Wilson, B.C. (1998). In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications. *Photochemistry and Photobiology*, 68(5), 603-632.
- Walker, G.M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Weber, G. (1950). Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide. *Biochem J*, 47(1), 114-121.
- Wills, C. (1990). Regulation of Sugar and Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(4), 245-280.
- Woehrer, W., M. Roehr (1981). Regulatory aspects of baker's yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(3), 567-581.
- Wolfbeis, O.S. (2008). Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(12), 4269-4283.
- Xiong, Z.-Q., Guo, M.-J., Guo, Y.-X., Chu, J., Zhuang, Y.-P., & Zhang, S.-L. (2008). Real-Time Viable-Cell Mass Monitoring in High-Cell-Density Fed-Batch Glutathione Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* T65 in Industrial Complex Medium. *The Society for Biotechnology, Japan*, 105(4), 409-413.
- Zabriskie, D.W., & Humphrey, A.E. (1978). Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence. *Appl Environ Microbiol*, 35(2), 337-343.
- Zamani, J., Pournia, P., & Seirafi, H.A. (2008). A novel feeding method in commercial Baker's yeast production. *J Appl Microbiol*, 105(3), 674-680.
- Zenzen, V., & Zankl, H. (2003). Protoporphyrin IX-accumulation in human tumor cells following topical ALA- and h-ALA-application in vivo. *Cancer Letters*, 202(1), 35-42.
- http://www.genome.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=sce&mapno=00860
abgerufen am 09.02.2009
- <http://pathway.yeastgenome.org//YEAST/NEW-IMAGE?type=NIL&object=PWY30-69>
abgerufen am 09.02.2009

8 Anhang

Kalibrationsgeraden der Standards für die HPLC:

Acetat

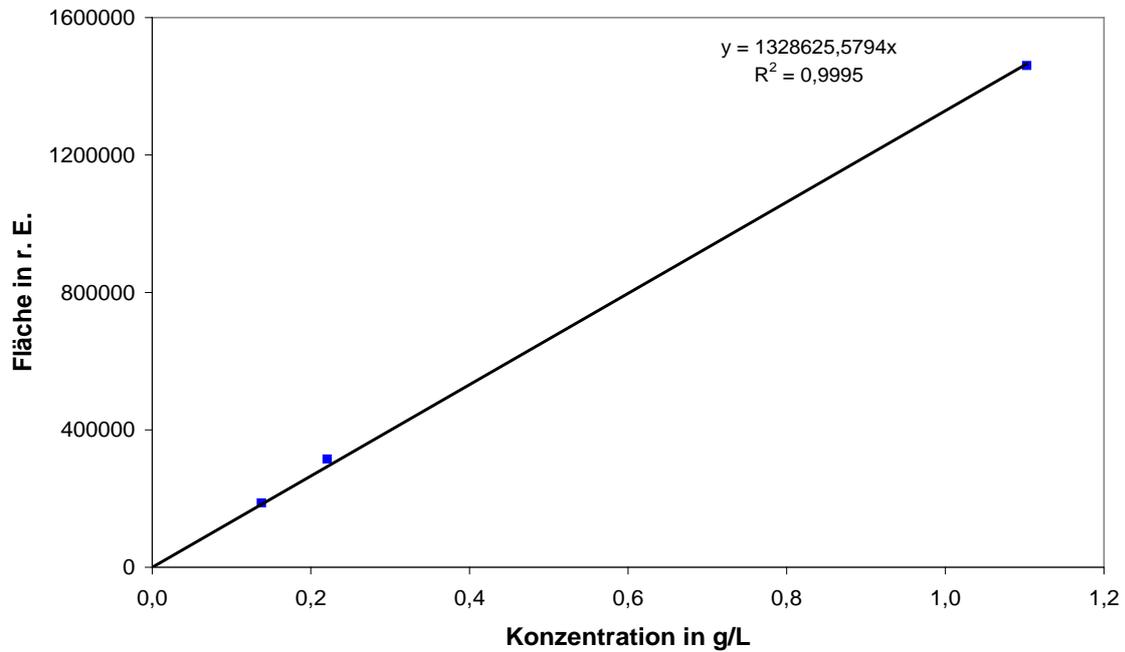


Abb. 8.1: Kalibrationsgerade für Acetat

Ethanol

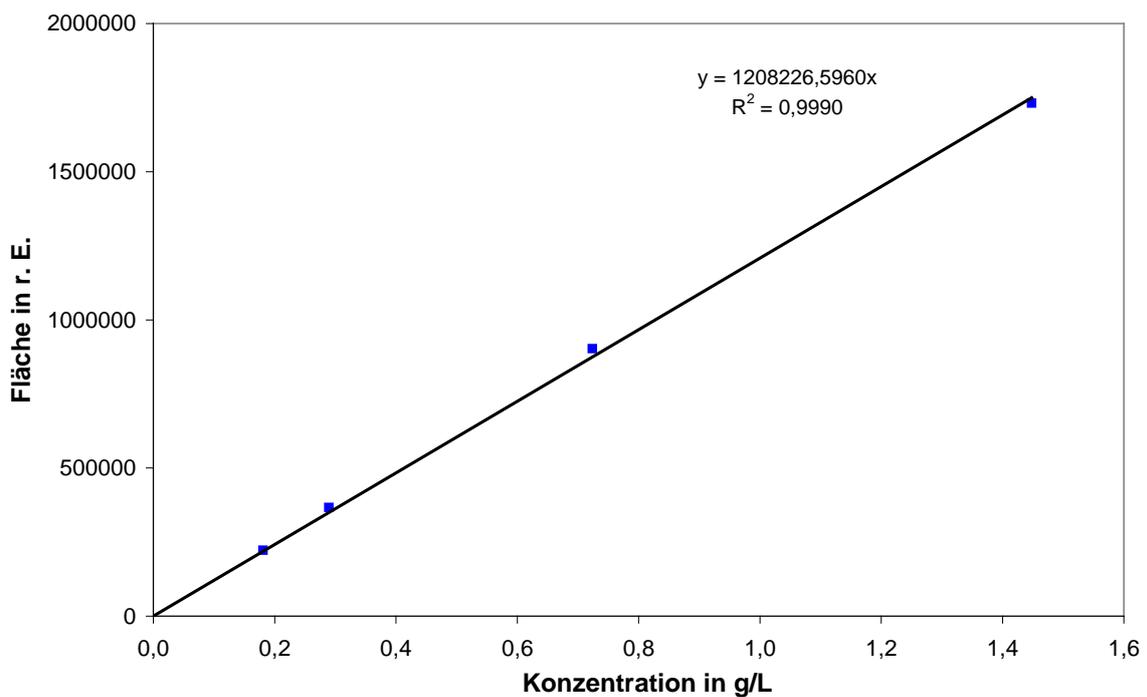


Abb. 8.2: Kalibrationsgerade für Ethanol

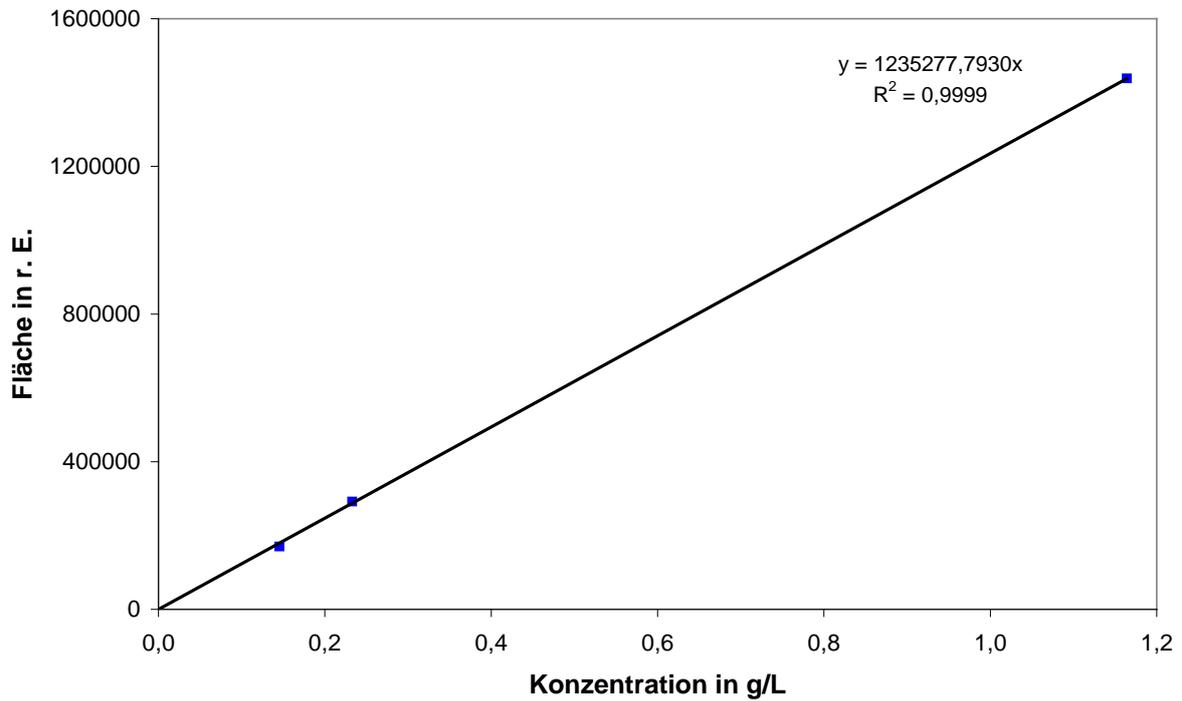
Formiat

Abb. 8.3: Kalibrationsgerade für Formiat

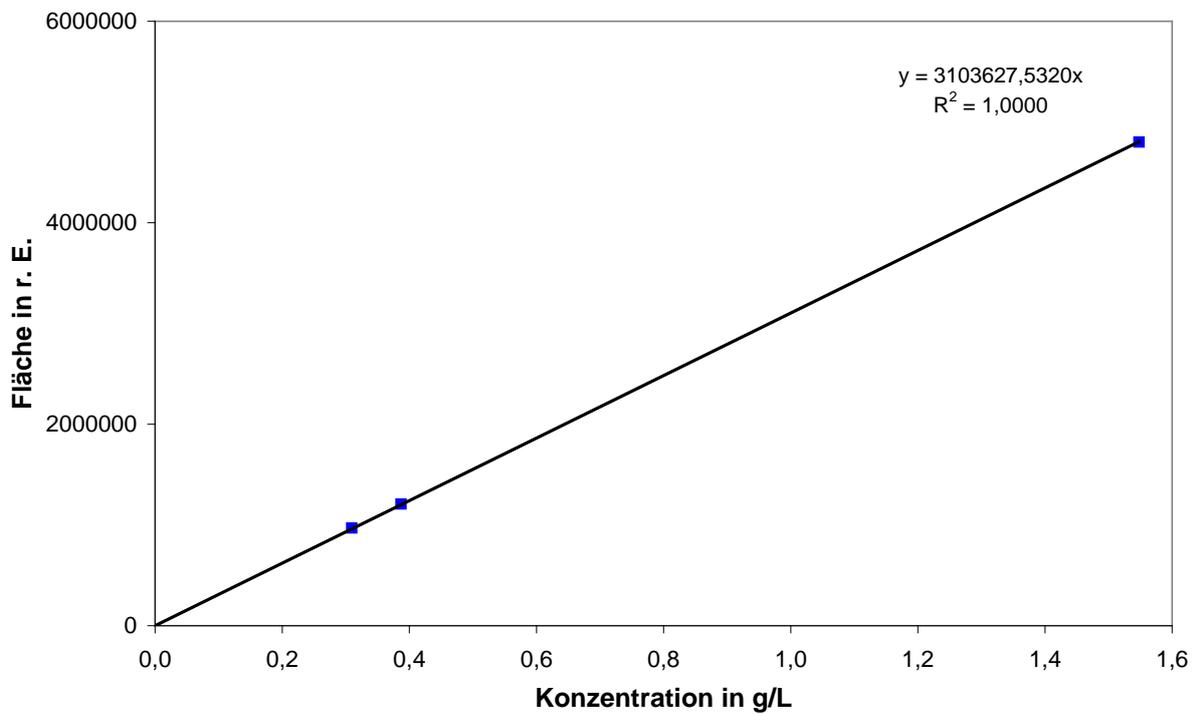
Fructose

Abb. 8.4: Kalibrationsgerade für Fructose

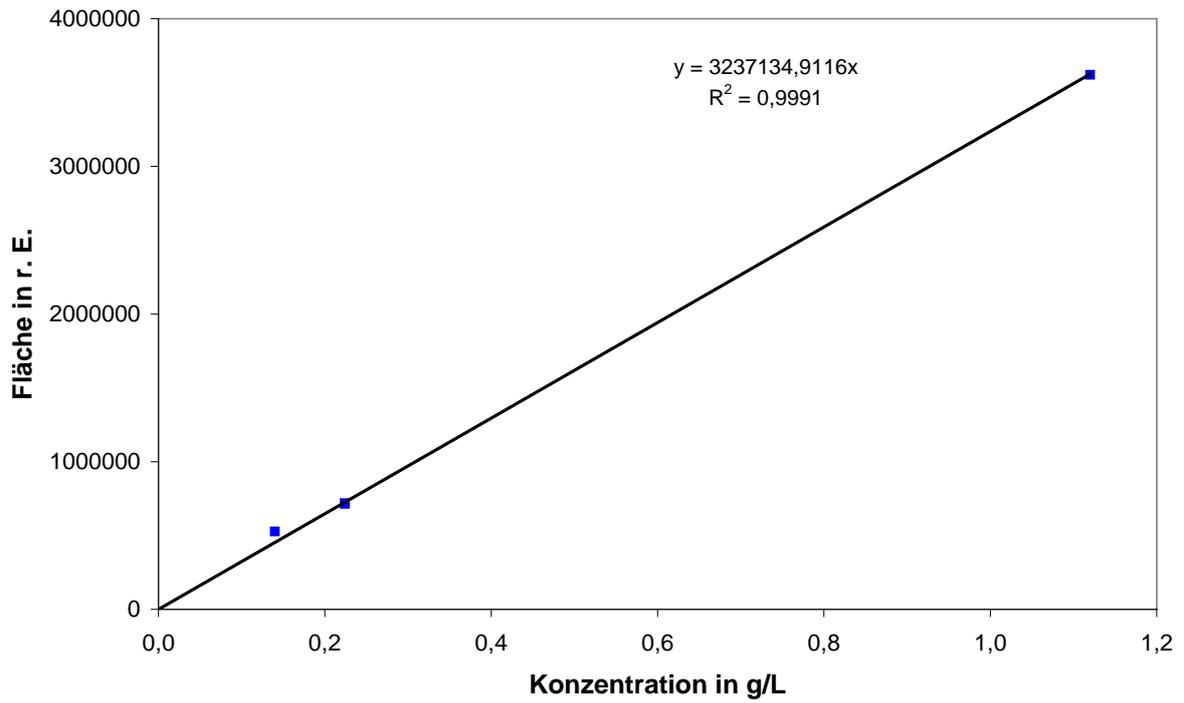
Galactose

Abb. 8.5: Kalibrationsgerade für Galactose

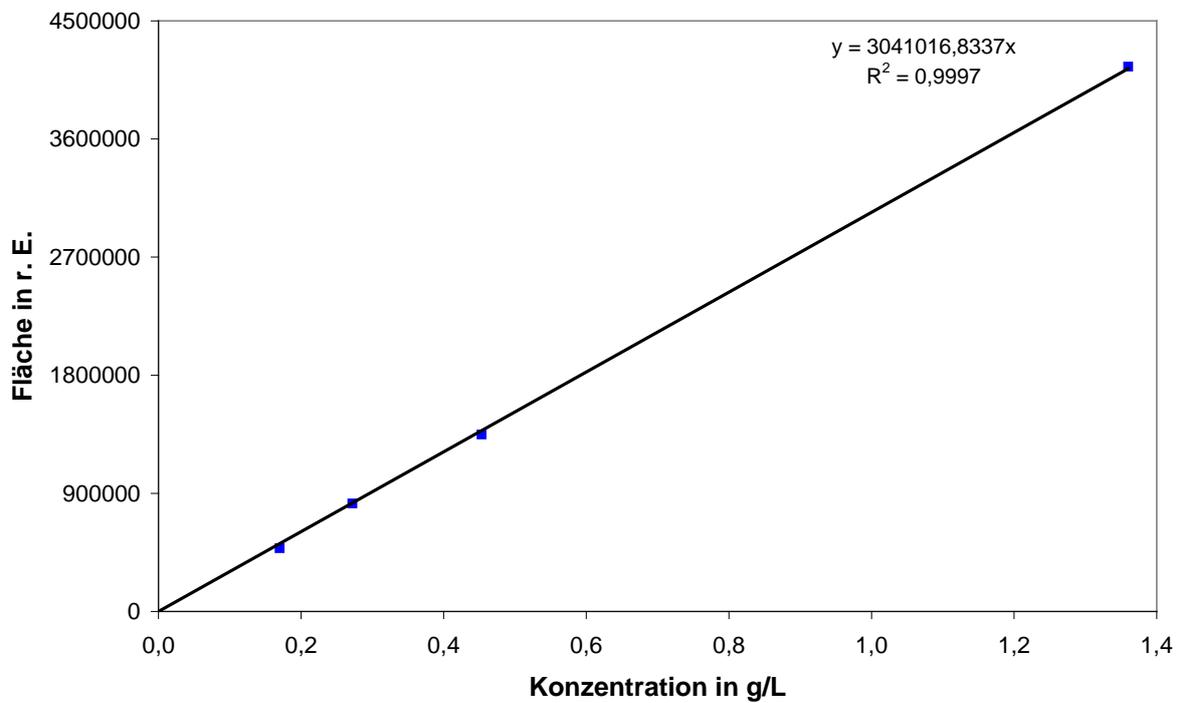
Glucose

Abb. 8.6: Kalibrationsgerade für Glucose

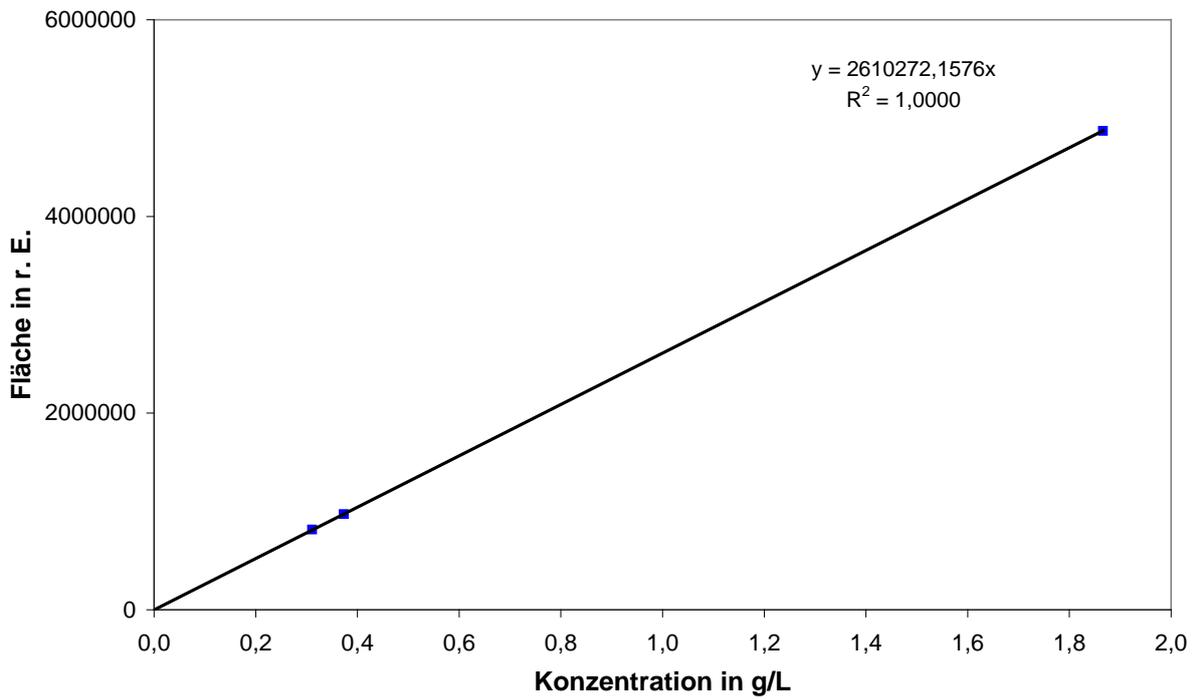
Glycerin

Abb. 8.7: Kalibrationsgerade für Glycerin

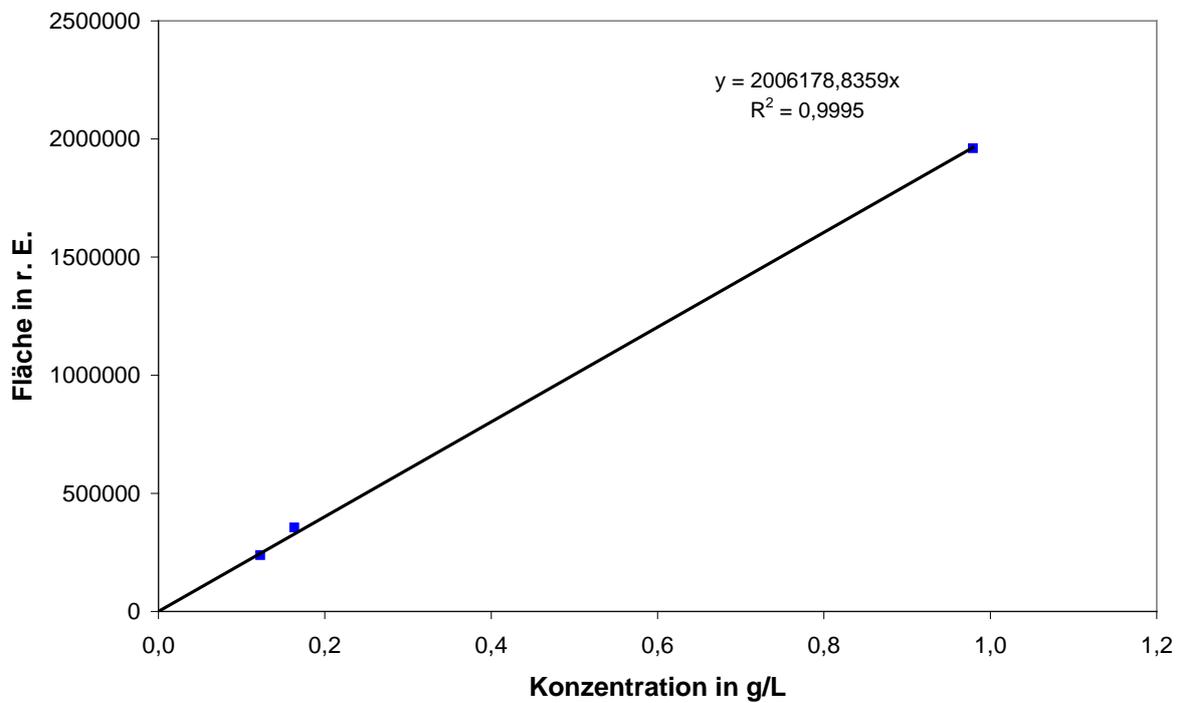
Lactat

Abb. 8.8: Kalibrationsgerade für Lactat

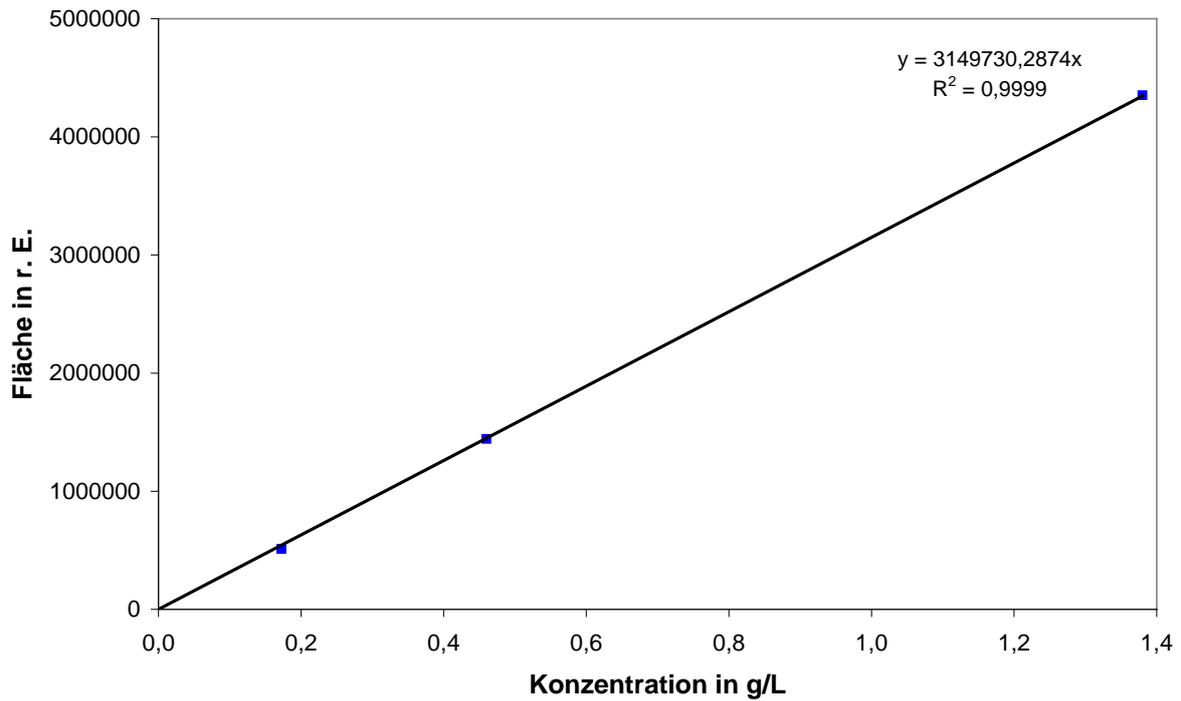
Lactose

Abb. 8.9: Kalibrationsgerade für Lactose

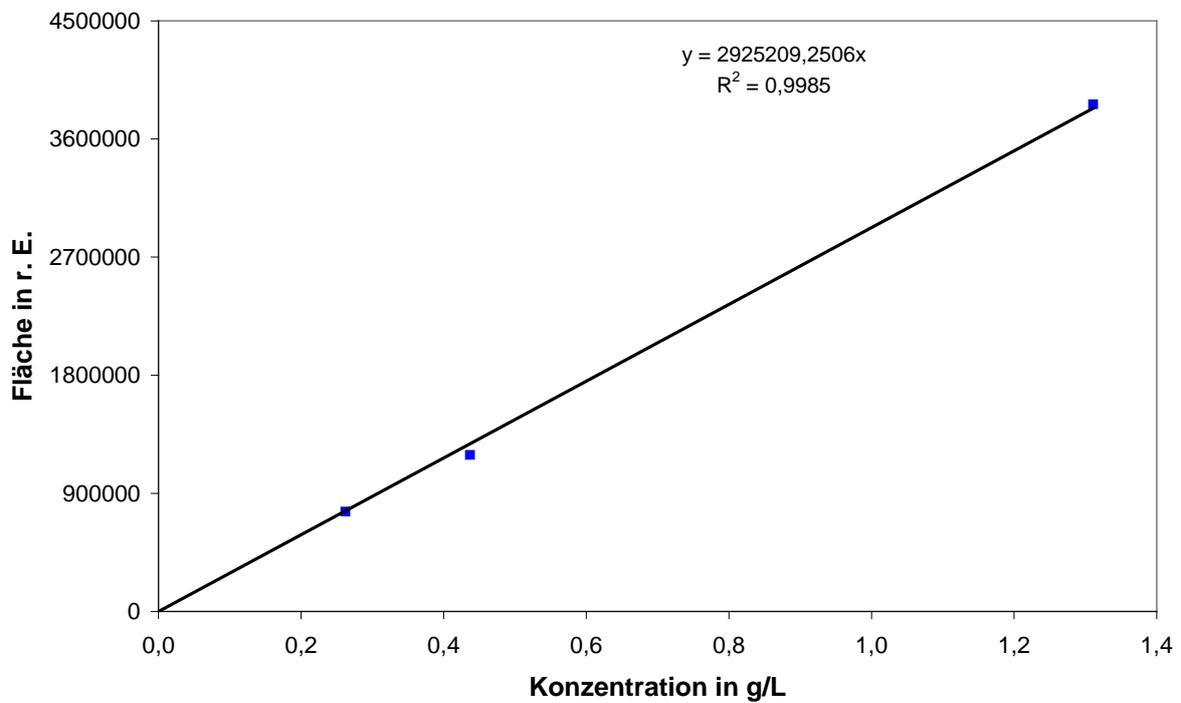
Maltose

Abb. 8.10: Kalibrationsgerade für Maltose

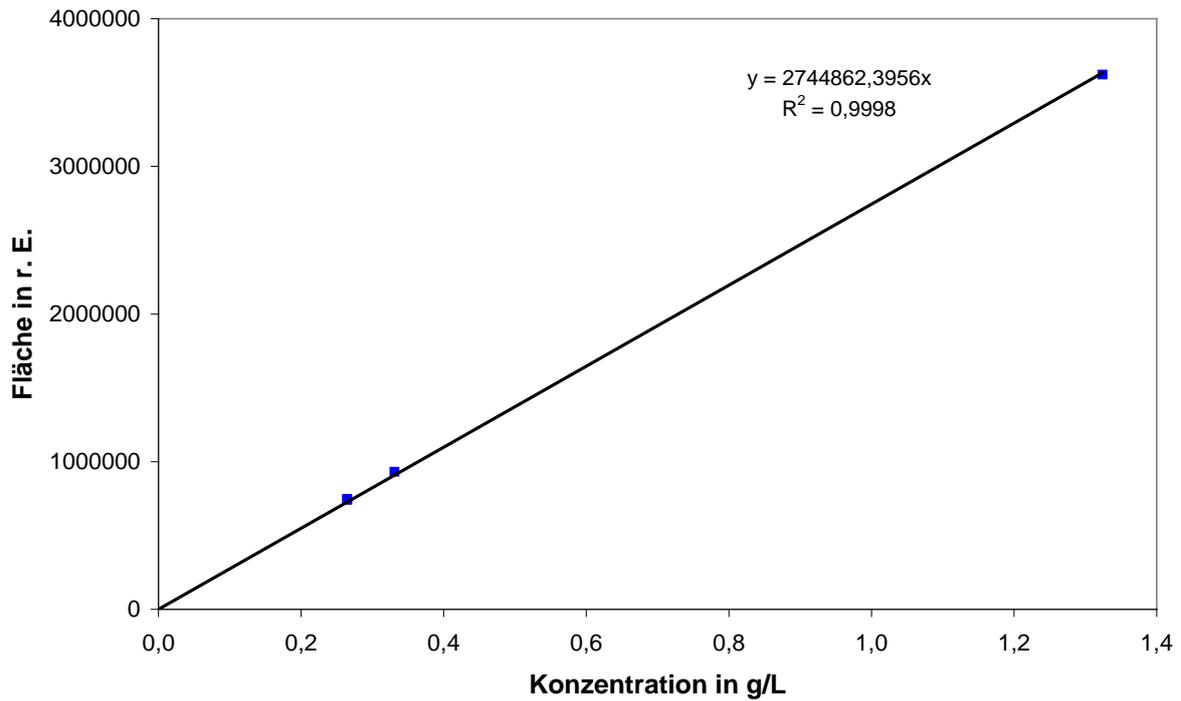
Saccharose

Abb. 8.11: Kalibrationsgerade für Saccharose

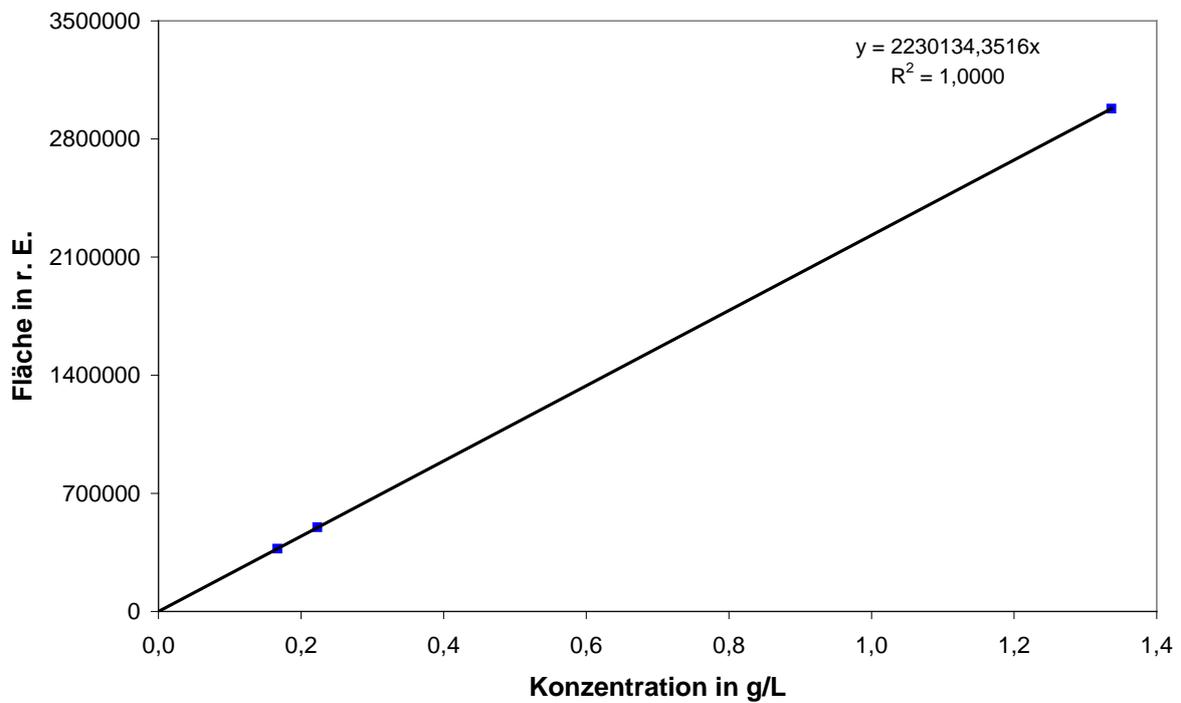
Succinat

Abb. 8.12: Kalibrationsgerade für Succinat